

Компьютерный дизайн ингибиторов протеинкиназы MST1 – прямого регулятора апоптоза β -клеток

К.М. Пац¹, Е.В. Федорова¹, M.S. Johnson², Xiang-Guo Li³

¹ – ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

² – Aboakademi university, Turku, Finland

³ – University of Turku and Turku PET Centre, Turku, Finland

Контактная информация: Федорова Елена Викторовна, elena.fedorova@pharminnotech.com

С целью поиска активных соединений, способных оказывать ингибирующее действие на протеинкиназу MST1 (Mammaliansterile 20-like kinase 1), мы провели компьютерный дизайн, применяя методы, основанные на структуре макромолекулы-мишени (Target-Based Drug Design), и методы, основанные на структуре лигандов (Ligand-Based Drug Design). Для оценки нежелательных эффектов использовали программу PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), для построения количественных зависимостей «структура-активность» QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) и оценки ингибирующей активности – компьютерную программу GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships). В результате эксперимента было отобрано 6 потенциальных ингибиторов MST1, относящихся к различным классам органических соединений.

Ключевые слова: сахарный диабет, ингибиторы MST1, insilico, QSAR, PASS, GUSAR.

Введение

В настоящее время сахарный диабет 1 типа (СД1) рассматривается как полигенное, мультифакторное заболевание, при котором генетическая предрасположенность в сочетании с триггерами окружающей среды запускает активацию специфических аутоиммунных процессов, приводящих к гибели β -клеток. Ведущими звеньями в патогенезе аутоиммунного поражения β -клеток поджелудочной железы являются дисрегуляция иммунитета и программированная гибель клеток. Основопологающими в развитии заболевания становятся нарушения процессов инициации и реализации апоптоза [2, 6, 7]. Лечение, направленное на подавление инициации процесса апоптоза, является

перспективным. Белок MST1 (рис. 1) недавно был идентифицирован как ключевой медиатор клеточного апоптоза, а последние исследования показали, что он может служить в качестве мишени для разработки новых препаратов для лечения диабета. MST1 активируется в бета-клетках мышей и человека, индуцируя митохондриально-зависимый путь развития апоптоза. MST1 фосфорилирует транскрипционный фактор PDX1, необходимый для созревания β -клеток и развития поджелудочной железы, тем самым вызывая его деградацию и нарушение секреции инсулина (PDX1 активирует несколько генов, связанных с метаболизмом глюкозы, в т.ч. инсулина, и PDX1 мутации связаны с развитием диабета в детском возрасте).

При дефиците MST1 полностью восстанавливается нормогликемия, функция бета-клеток и их выживаемость в пробиотике и в естественных условиях [5].



Рис. 1. Структура Mammalian Sterile 20-like kinase 1 (MST1).

Среди различных свойств химических соединений биологическая активность занимает особое место, поскольку ее наличие может стать основанием для применения веществ в медицине. С другой стороны, проявление соединением побочных и токсических эффектов является препятствием для использования химических соединений в практике. Таким образом, крайне важно оценить на ранних стадиях исследования возможное наличие у химических соединений как полезных фармакологических свойств, так и токсических эффектов. Компьютерные методы дизайна лекарств позволяют во многих случаях ограничить пространство исследования сравнительно небольшим числом мишеней (видов биологической активности). Компьютерное выявление активных структур органических молекул в отношении протеинкиназы MST1 прово-

дили, используя методы, основанные на структуре макромолекулы-мишени TBDD (Target-Based Drug Design), и методы, основанные на структуре лигандов LBDD (Ligand-Based Drug Design).

Материалы и методы

Исследование *in silico*. Прогнозирование профиля биологической активности и оценка нежелательных эффектов 4337 химических соединений (находящихся в свободном доступе и зарегистрированных в международном регистре CAS) проводились с помощью компьютерной программы PASS (Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ PASS № 2006613275 от 15 сентября 2006 г., Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам). Использование PASS позволяет получить оценки наиболее вероятных видов биологической активности химических соединений уже на стадии планирования их синтеза. В обучающей выборке PASS версии содержится около 250 тыс. БАВ, и с ее помощью возможен прогноз около 4000 фармакологических эффектов, механизмов действия, мутагенности, канцерогенности и т.д. со средней точностью около 95% (скользящий контроль с исключением по одному). Детальное описание методики компьютерного прогнозирования спектров биологической активности представлено в работах [8, 10]. Полученный спектр биологической активности отражает результат взаимодействия химического соединения с различными биологическими объектами. Результаты предсказания основаны на информации о структуре хи-

Таблица 1

Параметры QSAR моделей

	N	R2	F	SD	Q2	V
Модель 1 (lgIC50)	24	0,917	9,045	0,542	0,814	5
Модель 2 (% ингибирования)	185	0,684	11,138	13,788	0,613	18

Примечания: N – количество соединений в обучающей выборке; R2 – коэффициент детерминации; F – критерий Фишера; SD – стандартное отклонение; Q2 – коэффициент корреляции; V – число переменных в конечном регрессионном уравнении.

мического соединения, описываемой в виде MNA-дескрипторов (Multilevel Neighborhoods of Atoms – множественные атомные окрестности), и прогнозируемых для него видах биологической активности с оценками вероятности проявления активности: P_a – соединение активно; P_i – неактивно. Соединения отбрасывали при наличии в спектре нежелательных эффектов (мутагенность, тератогенность, канцерогенность, раздражающее действие).

Количественный прогноз ингибирующей активности на мишень MST1 был выполнен в программе GUSAR, в которой, помимо MNA-дескрипторов, вводятся QNA-дескрипторы (Quantitative Neighborhoods of Atoms – количественные атомные окрестности). Для построения QSAR-моделей с приемлемыми статистическими характеристиками ($R^2 > 0,6$, $Q^2 > 0,5$) [9] можно использовать консенсусные модели, объединяющие QSAR-модели, построенные как на одном определенном типе, так и на обоих типах дескрипторов (QNA или MNA). Для построения QNA и MNA моделей нами использовались тестовые выборки соединений с уже известными количественными

характеристиками, находящиеся в свободном доступе информационной системы BRENDA. Окончательная предсказательная оценка строилась с учетом средневзвешенных предсказанных значений от каждой полученной QSAR модели. Таким образом, было создано две консенсусные модели (табл. 1), экспериментальные данные в которых были представлены значениями IC50 (мМ) (обучающая выборка – 24 структуры, значения были переведены в логарифмы) и % ингибирования MST1 (обучающая выборка – 185 структур). Для прогноза использовали только модели, отвечающие указанным выше статистическим характеристикам.

В качестве референтного соединения был выбран стауроспорин (рис. 2), не обладающий выраженной селективностью по отношению к какому-либо соединению семейства неспецифичных серин-треониновых киназ [4]. Стауроспорин был отобран обеими моделями как потенциальный ингибитор MST1. Значение логарифма IC50 для него составило $2,5 \times 10^{-6}$, а значение процента ингибирования – 40% (модель 2), что совпадает с уже известными данными [3].

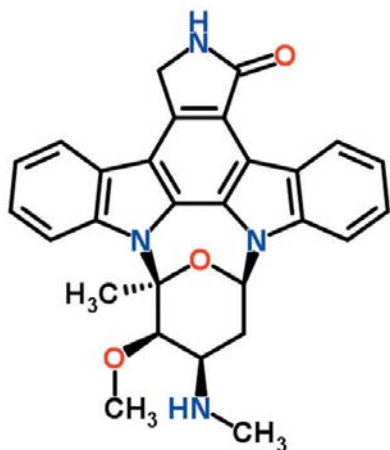


Рис. 2. Структурная формула стауроспорина.

На рис. 3 представлен пример оценки органических соединений с помощью программы GUSAR: слева изображена структура прогнозируе-

мого исследуемого вещества; справа – консенсусная модель, построенная на соединениях из обучающей выборки; справа сверху указаны параметры модели; слева сверху – предсказанная активность для исследуемого соединения (в нашем примере 45% ингибирования).

С целью оценки селективности отобранных соединений на родственные киназы (PAK1, PAK4, PIM1, GSK3-beta) нами был осуществлен молекулярный докинг отобранных органических соединений в активный центр белка-мишени. Молекулярный докинг проводили, используя программу предсказания белок-лигандных взаимодействий AutoDock Vina. Критерием оценки взаимодействия между исследу-

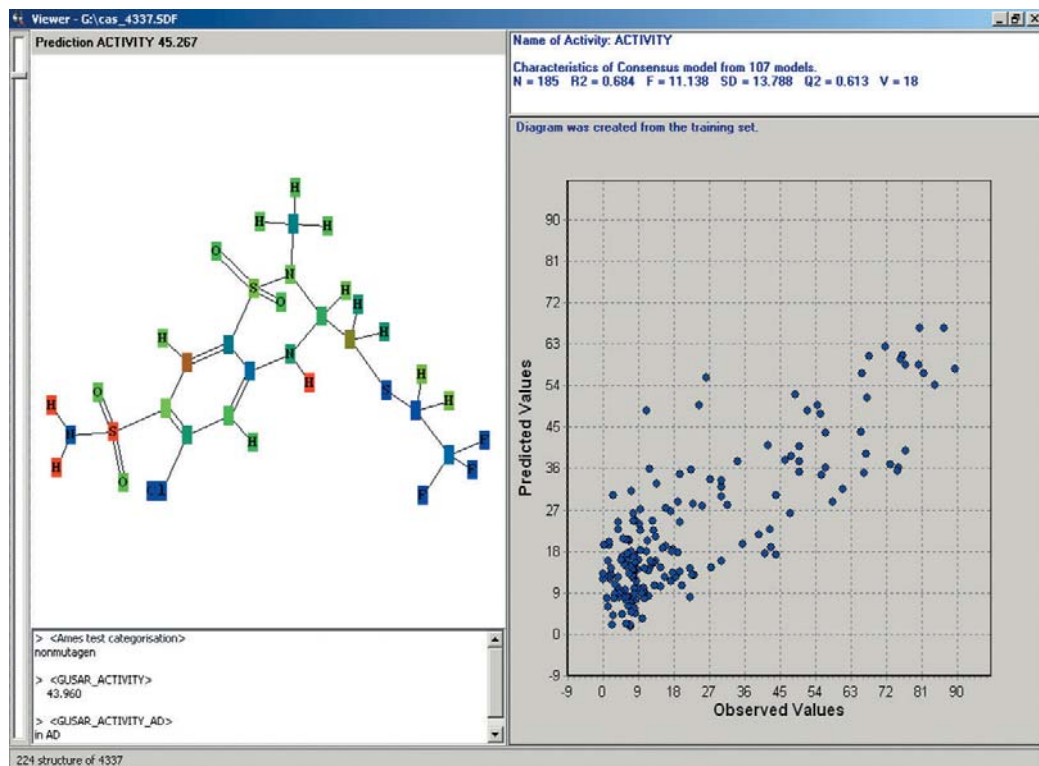


Рис. 3. Пример предсказания активности с помощью GUSAR (модель 2).

дваемыми соединениями и мишенью служила величина оценочной функции (скоринг-функция), выраженная в ккал/моль и определяемая как энергия взаимодействия лиганда с ферментом. Также учитывали пространственный характер связывания вещества с мишенью посредством образования связей с ключевыми аминокислотами в сравнении с известными референтными ингибиторами.

Результаты и их обсуждение

Методами QSAR, используя модели 1 и 2, из 4337 CAS структур было отобрано 55 органических соединений, которые показали высокую ингибирующую активность. Среди 55 структур,

отобранных двумя моделями, 9 совпали по химическому строению. Таким образом, для дальнейшего рассмотрения были отобраны 9 соединений, маркированные следующими номерами в базе данных CAS: **#163**, **#224**, **#497**, **#935**, **#1091**, **#1187**, **#1220**, **#1224**, **#3446**. Темным шрифтом выделены соединения, для которых программой PASS прогнозировались нежелательные эффекты, которые также были исключены из дальнейшего рассмотрения. Структурные формулы шести оставшихся в рассмотрении соединений, которые по нашим оценкам должны проявлять ингибирующую активность в отношении MST1, приведены на рис. 4.

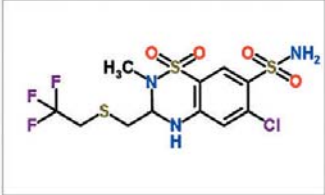
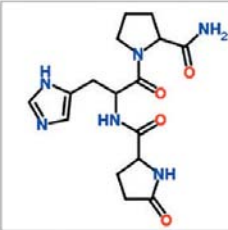
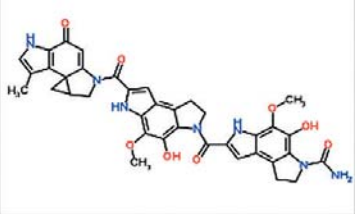
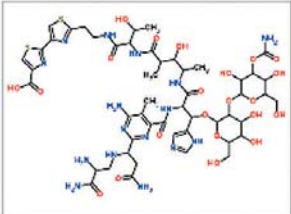
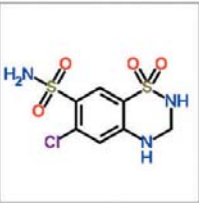
		
#224	#497	#1091
		
#1187	#1220	#1224

Рис. 4. Структуры соединений из базы CAS.

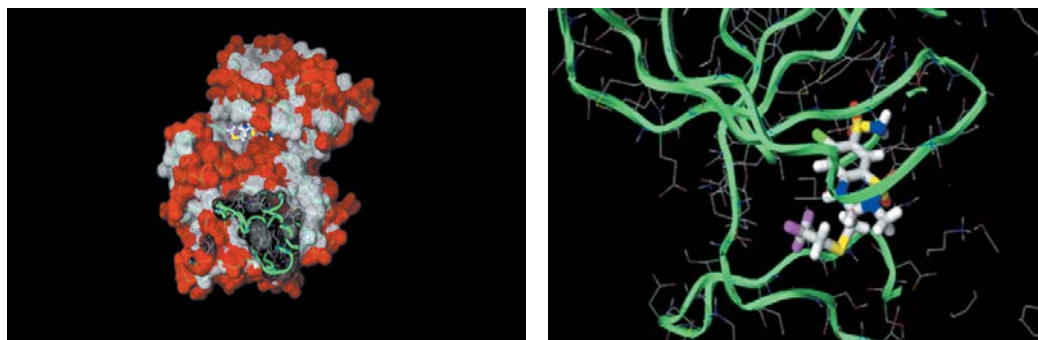


Рис. 5. Пример оценки селективности отобранных соединений с помощью молекулярного докинга (соединение #224, мишень – PAK1). Слева изображена поверхность белка-мишени, справа – связывание лиганда с мишенью крупным планом.

Согласно данным молекулярного докинга (рис. 5), отобранные соединения, как и референтное, не проявляют селективного действия в отношении родственных киназ. Величины скоринг-функции оказались практически одинаковыми для всех лигандов в отношении всех мишеней (PAK1, PAK4, PIM1, GSK3-beta).

Выводы

С помощью компьютерных методов, применяющихся для дизайна биологически активных соединений и лекарственных средств, нам удалось осуществить поиск потенциальных ингибиторов протеинкиназы MST1, являющейся ключевым медиатором клеточного апоптоза. На базе программ PASS и GUSAR были отобраны шесть активных структур, способных, по нашим прогнозам, эффективно ингибировать MST1, не проявляя при этом нежелательных эффектов. Для данных веществ прогнозируется достаточно высокая активность по сравнению с референтными соединениями, поэтому можно сделать вывод о целесообразности их синтеза и *in vitro* скрининга. Ранее такой комбинированный подход, основанный на сочетании

in silico и *in vitro* методов, показал эффективность при поиске потенциальных ингибиторов сериновых протеаз [1].

Список литературы

1. Баранова Н.И., Алексеева П.А., Чистяков К.С., Юсковец В.Н., Оковитый С.В., Бурякина А.В., Федорова Е.В. Поиск синтетических антикоагулянтов – ингибиторов сериновых протеаз: сочетание *in silico* и *in vitro* методов // Биомедицина. 2014. № 2. С. 17-24.
2. Пекарева Е.В., Никонова Т.В., Смирнова О.М. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа // Сахарный диабет. 2010. № 1. С. 45-49.
3. Akita S., Umezawa N., Kato N., Higuchi T. Array-based fluorescence assay for serine/threonine kinases using specific chemical reaction // Bioorg Med Chem. 2008. V16. № 16. P. 7788-94.
4. Anand R., Maksimoska J., Pagano N., Wong E.Y., Gimotty P.A., Diamond S.L., Meggers E., Marmorstein R. Toward the Development of a Potent and Selective Organoruthenium Mammalian Sterile 20 Kinase Inhibitor // J. Med. Chem. 2009. № 52. P. 1602-1611.
5. Ardestani A., Paroni F., Azizi Z., Kaur S., Khobragade V., Yuan T., Frogne T., Tao W., Oberholzer J., Pattou F., Kerr J. Conte & Kathrin Maedler Nature Medicine. 2014. № 20. P. 385-397.
6. Fedorova E., Buryakina A., Zakharov A., Filimonov D., Lagunin A., Poroikov V. Design Synthesis and Pharmacological Evaluation of

- Novel Vanadium-Containing Complexes as Antidiabetic Agents // PloS one. 2014. DOI10.1371 / Journal. pone. 0100386.
7. **Fedorova E.V., Buryakina A.V., Vorobieva N.M., Baranova N.I.** The vanadium compounds: Chemistry, synthesis, insulinomimetic properties // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2013. V. 7 (4). P. 259-270.
 8. **Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V.** Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource // Chemistry of Heterocyclic Compounds. 2014. № 50 (3). P. 444-457.
 9. **Filimonov D.A., Zakharov A.V., Lagunin A.A., Poroikov V.V.** QNA based 'Star Track' QSAR approach // SAR QSAR Environ. Res. 2009. № 20. P.679-709.
 10. **Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V.** QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction // Mol. Informatics. 2011. № 30 (2-3). P. 241-250.

Computer design of inhibitors of protein kinase MST1 – the key regulator of apoptosis of β -cells

K.M. Pats, E.V. Fedorova, M.S. Johnson, Li Xiang-Guo

At present time, diabetes is regarded as polygenic, multifactorial disease: genetic predisposition in combination with environmental triggers activates specific autoimmune processes, which lead to the death of β -cells. Therefore, violations in the processes of initiation and implementation of apoptosis are fundamental in the development of the disease. Preservation or restoration of pancreatic β -cells in diabetic patients is an ultimate therapy for diabetes, but is an unmet medical challenge. Protein kinase MST1 has been recently identified as a key mediator of cell apoptosis, and recent studies have shown that it could serve as a target for developing new drugs to treat diabetes. In order to find active compounds capable to inhibit MST1 (Mammalian sterile 20-like kinase 1), we carried out a computer-aided design, using methods based on the structure of macromolecule-target (Target-Based Drug Design) and methods based on the structure of ligands (Ligand-Based Drug Design). To assess the undesirable effects we used the computer program PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances); for construction of quantitative relationships «structure-activity» (Quantitative Structure-Activity Relationship) and evaluation of inhibitory activity computer program GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships) was used. As a result of experiment, 6 potential inhibitors of MST1 were selected. These compounds do not exhibit mutagenic or toxic properties but have high level of activity in comparison with already known inhibitors. This fact makes it possible to suppose, that our compounds are suitable for future synthesis and *in vitro* screening.

Key words: diabetes mellitus, inhibitors of MST1, *in silico*, QSAR, PASS, GUSAR.