

СКРИНІНГ *IN SILICO* ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ 11-ГІДРОКСИСТЕРОЇДДЕГІДРОГЕНАЗИ 1*

Ліпсон В. В.^{1,3}, Бородіна В. В.¹, Редькін Р. Г.², Світлична Н. В.¹, Зубатюк Т. О.³

¹ ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків;

² Національний фармацевтичний університет, м. Харків;

³ ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України», м. Харків
lipson@ukr.net

Наприкінці минулого століття із поширенням технологій високопродуктивного скринінгу час, що витрачається на проведення доклінічного вивчення потенційних кандидатів у лікарські засоби, значно скоротився. Втім, оскільки доступні масиви сполук (так звані бібліотеки) стають все більшими, вартість такого скринінгу зростає, збільшується й частка сполук-«хітів», активність яких дорівнює або перевищує референтний препарат. Виникає проблема критеріїв подальшого відбору. Певною мірою, її можна уникнути, якщо експериментально перевіряти не всі доступні сполуки, а невелику їх частину, відібрану за ознакою високої вірогідності зв'язування з біологічною мішенню [1]. Розрахункові методи оцінки такої вірогідності і вибору за цим критерієм перспективних речовин з електронних баз даних одержали назву скринінгу *in silico* або віртуального скринінгу. Одним зі способів його проведення є молекулярний докінг. В основу такого підходу покладено відбір сполук, які за рахунок певної просторової структури здат-

ні утворювати стійкі комплекси з протеїновою мішенню. У даному випадку це фермент 11-гідроксистероїддегідрогеназа 1 (11 β -HSD1).

Інтерес до зазначеної мішені обумовлений тим, що низкою клінічних і епідеміологічних досліджень доведено зв'язок між ожирінням, цукровим діабетом (ЦД) 2 типу і серцево-судинними захворюваннями [2–5]. У першу чергу, в цьому зв'язку заслуговують на увагу гормональні чинники метаболічних порушень і розладів серцево-судинної системи — глюкокортикоїди — гормони кори наднирникових залоз. Фермент 11 β -HSD1 відіграє ключову роль у дорецепторному локальному обміні цих гормонів. У людини 11 β -HSD1 каталізує перетворення неактивного кортизону в активний кортизол [6, 7]. При ЦД 2 типу причиною локального надлишку кортизолу і його негативного впливу на розвиток інсулінорезистентності є підвищена активність 11 β -HSD1 у вісцеральній жировій тканині та печінці [8, 9].

За останні десять років з'явилася велика кількість повідомлень, присвячених вивчен-

*Роботу виконано в рамках прикладної НДР ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» «Пошук біологічно активних сполук, здатних гальмувати дію судинних чинників ризику, пов'язаних із цукровим діабетом 2 типу, шляхом модулювання позанадиркового метаболізму глюкокортикоїдів» (№ держреєстрації — 0113U001283).

Установою, що фінансує дослідження, є НАМН України.

Автори гарантують колективну відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості.

Рукопис надійшов до редакції 26.01.2016.

ню фармакодинаміки нестероїдних інгібіторів 11β -HSD1 [6, 10–14]. Основні вимоги до потенційних засобів гальмування експресії 11β -HSD1 — висока селективність зв'язування з мішенню, видова та тканинна специфічність, достатня ліпофільність у сполученні із метаболічною стабільністю, задля забезпечення проникнення до місця дії — жирової тканини, і низька токсичність. Натепер лише два-три ймовірних кандидати у лікарські засоби знаходяться на різних стадіях

клінічних випробувань. Тому активний пошук нових сполук-«лідерів» продовжується. Фермент 11β -HSD1 є однією з найбільш вживаних мішеней у конструюванні антидіабетичних засобів [12–14].

Мета цього дослідження полягала у виявленні методами молекулярного докінгу серед оригінальних похідних нітрогено- та сульфуровмісних гетероциклів сполук, здатних виступати інгібіторами 11β -HSD1.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Скринінг *in silico* складався з чотирьох основних етапів: підготовки бібліотеки сполук, докінгу, оцінки результатів та процедури фільтрації. Бібліотеки потенційних інгібіторів 11β -HSD1 формували шляхом введення широкого розмаїття замісників у певні положення піразоло[3,4-*b*]піридинової, тетрагідротіазоло[2,3-*a*]піримідинової, сульфоніліпіперазинової, спіро-2-оксіндольної, тіазолідинової молекулярних платформ. Для генерації 3D-структур та проведення конформаційного аналізу лігандів використано програму Omega2 [1, 15, 16]. Для первинного скринінгу 27 000 потенційних інгібіторів 11β -HSD1 застосовано програму AutoDock 4.2 [17]. Цей метод дозволяє визначити геометрію комплексу ліганд-рецептор і оцінити вільну енергію зв'язування ліганду з активним центром мішені. Він враховує енергії електростатичних та ван-дер-ваальсових взаємодій, водневих зв'язків, десольватації, а також втрату ентропії при утворенні комплексу. Для процедури докінгу розраховано заряди молекул рецептора і лігандів за методом Гастейгера-Марсилі [18] за допомогою програми AutoDock Tools [17].

Джерело даних щодо структури комплексу фермент-інгібітор — Protein Data Bank

(PDB). На момент початку цієї роботи в цій базі даних було представлено понад двох десятків структур кристалічних комплексів 11β -HSD1 з малими органічними молекулами або стероїдами, 18 з них містили фермент людини, а 5 відповідали аналогічним структурам експериментальних тварин (мишей та морських свинок) [19]. З цього набору нами в якості моделі рецептора відібрано кристалічну структуру комплексу 11β -HSD1 з кофактором NADP та інгібітором тіазолонового ряду (PDB ID 3BZU), розрізнення 2.25 Е. Активний центр рецептора обмежено кубом зі стороною 22.5 Е, розташування якого визначається координатами ліганду у вибраній кристалічній структурі. У середині цієї області визначено сітку для побудови мап енергетичних потенціалів атомів з інтервалом 0.375 Е. Пошук оптимальної геометрії комплексів проводився з використанням нерухливого активного центру і гнучких лігандів. Рухливість останніх визначалася обертанням навколо одинарних зв'язків, що не входять до складу циклу. Для контролю результатів віртуального скринінгу використано структури сполук, з експериментально визначеним рівнем активності, відомі з літературних джерел [11–13].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами докінгу на 3D моделі 11β -HSD1 людини з 27 000 структур із зазначених вище груп гетероциклічних сполук відібрано 300 структур для подальшої розрахункової оцінки їх спроможності

зв'язуватися з 11β -HSD1 експериментальних тварин, зокрема, мишей (PDB ID 1Y5M). Співставлення результатів скринінгу *in silico* за обома мішенями PDB ID 3BZU та PDB ID 1Y5M засвідчило перспектив-

ність подальшої оцінки здатності до зв'язування з досліджуваним ферментом похідних спіро(піролідин-3,2'-оксіндолів). Саме цей структурний тип виявив найбільшу спорідненість до 3D моделі 11 β -HSD1 як людини, так і мишей. Розрахований виграш в енергії при утворенні відповідного комплексу складає $E_{Doc} = -9,7 \div 11,4$ ккал/моль.

З метою обґрунтування доцільності дослідження спіро(піролідин-3,2'-оксіндолів) 1 створено фокусну віртуальну бібліотеку відповідних структур (рис. 1).

При конструюванні перевагу було віддано тим, що містять залишки сульфуровмісних аліфатичних α -амінокислот — метіоніну, етіоніну, цистеїну та алкілпохідних цистеїну. У такий спосіб можна суттєво вплинути на ліпофільність цільових сполук.

В результаті докінгу цієї фокусної бібліотеки з 318 структур для 305 (95,9%) одержано менші значення вільної енергії взаємодії з **A** та **B** сайтами молекули 11 β -HSD1 ($E_{Doc} = -5,47$ ккал/моль), ніж для комплексу такого нестероїдного інгібітора 11 β -HSD1 як S-28 (рис. 2), і лише

13 сполук виявилися неактивними, бо мали значення вільної енергії від $-0,2$ до $-5,46$ ккал/моль для сайту **A**, та від $-0,9$ до $-5,39$ ккал/моль — для сайту **B**.

За структурними ознаками найбільш потенційно активні сполуки (табл. 1) містять залишки арилалкіл сульфуровмісних амінокислот за положенням 6' піролідинового циклу. З огляду на доцільність подальшого експериментального вивчення спіро(піролідин-3,2'-оксіндолів), важливо зазначити, що відібрані структури відповідають правилам Ліпінські для потенційних лікоподібних молекул [20].

Зокрема, молекулярна маса всіх структур (див. табл. 1) не перевищує 500 одиниць. Показник ліпофільності LogP, розрахований за програмою MOE 1998.10 з пакету ChemOffice, що характеризує розподіл речовини в системі октанол-вода, знаходиться для наведених структур в прийнятному діапазоні 0.1 LogP 5, окрім сполук LigH 0242 та LigH 0318. Найбільшу спорідненість за результатами докінгу до сайту **A** ферменту 11 β -HSD1 людини має сполу-

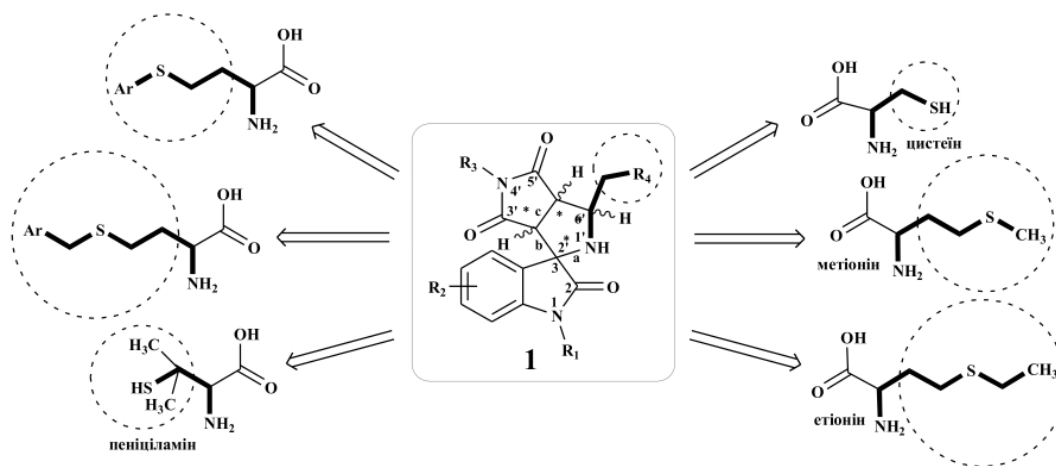


Рис. 1. Базовий остов спіро(піролідин-3,2'-оксіндолів) 1 з амінокислотними фрагментами у структурі.

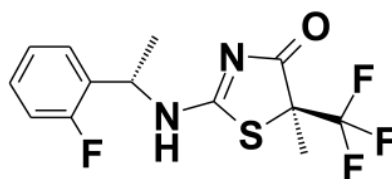


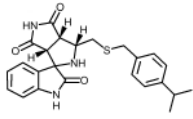
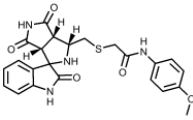
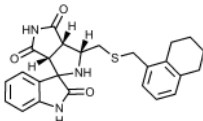
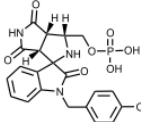
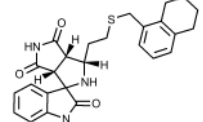
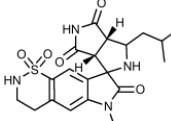
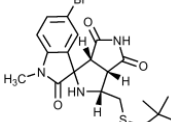
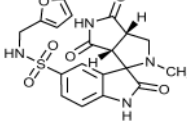
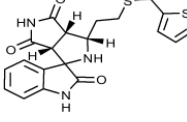
Рис. 2. Структура референтної сполуки S-28.

ка LigH 0076 (розрахована константа інгібування $K_i = 4,67$ нМ). Зв'язування молекули LigH 0076 з мішенню (рис. 3) забез-

печується за рахунок Н-зв'язку між групою N^1H та залишком Pro178A, а також ліпофільної взаємодії між арилетіонільним

Таблиця 1

Розрахункові параметри найбільш активних похідних спіро(піролідин-3,2'-оксіндолу) за результатами докінгу

№ з/п	Код	Структура	Молекулярна маса	LogP	E _{Дос} , ккал/моль*	
					А	В
1	LigH 0076	 $K_i = 4,67$ нМ	435,54	2,32	-11,37	-8,11
2	LigH 0082	 $K_i = 9,76$ нМ	466,52	1,35	-9,68	-10,93
3	LigH 0077		447,56	2,40	-11,24	-10,03
4	LigH 0153		491,82	1,69	-11,27	-7,93
5	LigH 0028		461,58	2,50	-10,94	-9,51
6	LigH 0242		432,50	0,531	-10,72	-7,98
7	LigH 0127		484,43	2,05	-10,66	-6,87
8	LigH 0318		430,44	-1,48	-10,35	-10,37
9	LigH 0023		413,52	1,18	-10,02	-10,35

Примітка. *E_{Дос} — вільна енергія зв'язування з відповідним сайтом 11β-HSD1 при T = 298,15 К.

фрагментом і Tyr183A (цей амінокислотний залишок входить до активного центру ферменту) та арильного кільця індольної системи і арилу Tyr177A. Візуалізацію взаємодії структур виконано за допомогою програми Pose View [21].

В той же час, найбільшу спорідненість до сайту B виявлено у структури LigH 0082

($K_i = 9,76$ нМ) (рис. 4). Ця молекула утворює стійкий комплекс з ферментом за рахунок трьох Н-зв'язків: між групою NH амідного фрагмента та Met179B протеїну, карбонілом цього ж амідного фрагмента та двома амінокислотними залишками Tyr183B і Thr124B.

Отже, в обох випадках ліганд-фермент-

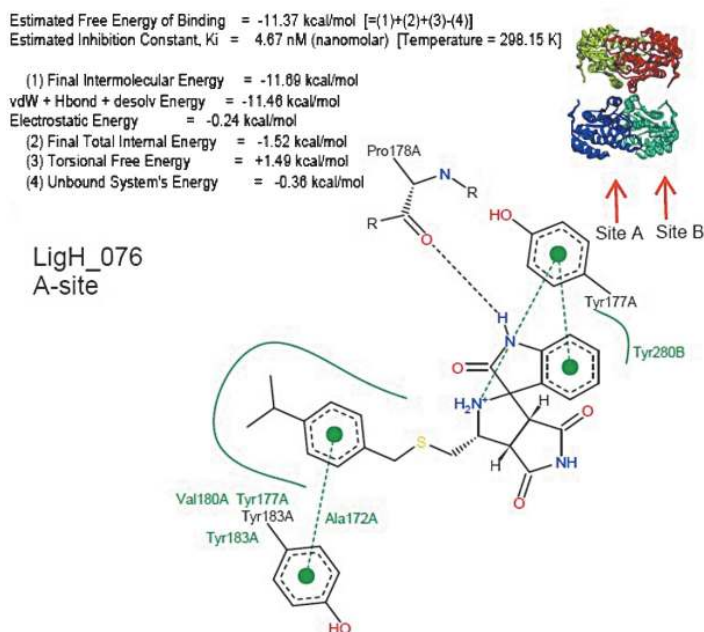


Рис. 3. Візуалізація зв'язування молекули сполуки LigH 0076 з сайтом А 11β-HSD1 за результатами докінгу.

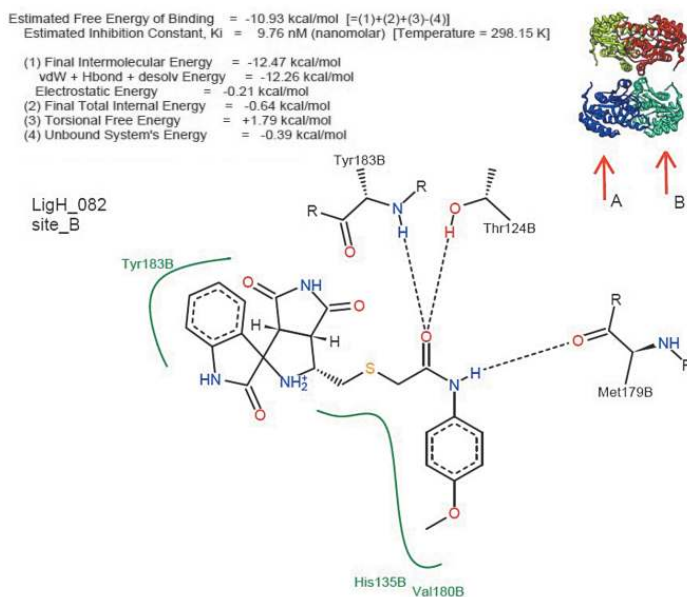


Рис. 4. Візуалізація зв'язування молекули сполуки LigH 0082 з сайтом В 11β-HSD1 за результатами докінгу.

ний комплекс утворюється за участю амінокислотного залишку Туг183, що входить до активного центру 11 β -HSD1. В цілому, як свідчать наведені у табл. результати розрахунків вільної енергії зв'язування та K_i , для переважної більшості структур одержано значення $E_{D_{oc}}$ на рівні відомих інгібіто-

рів 11 β -HSD1. Тобто, найактивніші сполуки мають наномолярний рівень константи інгібування, що засвідчує перспективність пошуку нових інгібіторів 11 β -HSD1 серед похідних спіро(піролідин-3,2'-оксіндолу) та експериментальної оцінки їх активності на моделях *in vivo*.

ВИСНОВКИ

За результатами докінгових досліджень виявлено наступні закономірності, які будуть використані у подальшому конструюванні та оптимізації сполук-лідерів:

1. Включення до складу молекул спіро(піролідин-3,2'-оксіндолу) залишків аліфатичних сірковмісних α -амінокислот (цистеїну, метіоніну та етіоніну) за положенням 6' піролідинового циклу сприяє підвищенню активності.
2. Введення ліпофільних замісників (найактивніші *S*-4-ізопропілбензиліден- та 2-*S*-N-(4-метоксифеніл)-ацетамідопохідні) за меркаптогрупою цистеїну підвищує активність модельних сполук, ймовірно, за рахунок взаємодії *S*-бен-

зиліденових фрагментів із залишком Туг183A або ацетамідного фрагмента з Туг183B у 11 β -HSD1.

3. Введення такого електронодонорного замісника як NH₂-група в 5-положення 2-оксіндольного ядра знижує прогнозовану активність, а наявність атома бром у ньому, навпаки, сприяє прояву активності. Введення 5-сульфогрупи знижує активність, а 5-сульфамідна функція підвищує її.
4. Серед фрагментів несірковмісних амінокислот позитивний вплив чинять залишки: аланіну, лейцину, фенілаланіну, 3,5-дигідротирозину, серину та його O-фосфатил похідної.

ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Perola E, Charifson PS. *J Med Chem* 2004; 47(10):2499-2510.
2. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*, 6th ed., Brussels, 2013.
3. Pulgaron ER, Delamater AM. *Curr Diab Rep* 2014; 14(8):508-514.
4. Day C. *Diabetes Vasc Dis Res* 2007; 4:32-38.
5. Bays HE, Chapman RH, Grandy S. *Int J Clin Pract* 2007; 61:737-747.
6. Fotsch C, Wang M. *J Med Chem* 2008; 51:4851-4857.
7. Cooper MS, Stewart PM. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 4645-4654.
8. Atanasov AG, Odermatt A. *Endocr Metab Immune Dis Drug Targ* 2007; 7:125-140.
9. Bezverha TP, Tron'ko MD. *Endokrynologija* 2008; 13(1):117-135.
10. Stewart PM. *Clin Med* 2005; 5:142-146.
11. Wamil M, Seckl JR. *Drug Discovery Today* 2007; 12:504-520.
12. Hughes KA, Webster SP, Walker BR. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 481-496.
13. Boyle CD, Kowalski TJ. *Expert Opin Ther Patents* 2009; 19:801-825.
14. Ge R, Huang Y, Liang G, Li X. *Curr Med Chem* 2010; 17:412-422.
15. Boström J, Greenwood JR, Gottfries J. *J Mol Graph Mod* 2003; 21:449-462.
16. Kristam R, Gillet VJ, Lewis RA, et al. *Chem Inf Mod* 2005; 45(2):461-476.
17. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. *J Comput Chem* 2009, available at: www.interscience.wiley.com.
18. Michel FS. *J Mol Graph Mod* 1999; 17(2): 57-61.
19. Thomas MP, Potter BVL. *Future Med Chem* 2011; 3:367-390.
20. Lipinski CA. *Drug Discovery Today: Technologies* 2004; 1(4):337-341.
21. Stierand K, Maass PC, Rarey M. *Bioinformatics* 2006; 22:1710-1716.

СКРИНІНГ *IN SILICO* ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБИТОРІВ 11-ГІДРОКСИСТЕРОЇДДЕГІДРОГЕНАЗИ 1

Ліпсон В. В.^{1,3}, Бородіна В. В.¹, Редькін Р. Г.², Світлична Н. В.¹, Зубатюк Т. О.³

¹ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків;

²Національний фармацевтичний університет, м. Харків;

³ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України», м. Харків
lipson@ukr.net

Проведено віртуальний скринінг методом молекулярного докінгу за програмою AutoDoc 4.2. 27 000 структур нітрогено- та сульфуровмісних гетероциклічних сполук, з метою виявлення серед них інгібіторів ферменту 11-гідроксистероїддегідрогенази (11 β -HSD1). Встановлено, що найбільшу спорідненість до зазначеної мішені *in silico* виявили похідні спіро(піролідін-3,2'-оксіндолу), які містять у складі молекули залишки сульфуровмісних амінокислот. Зроблено висновок про доцільність синтезу цих речовин і експериментальну оцінку їх антидіабетичних властивостей.

К л ю ч о в і с л о в а: молекулярний докінг, 11-гідроксистероїддегідрогеназа, спіро(піролідін-3,2'-оксіндоли), антидіабетичні властивості.

СКРИНІНГ *IN SILICO* ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ 11-ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ 1

Липсон В. В.^{1,3}, Бородина В. В.¹, Редькин Р. Г.², Светличная Н. В.¹, Зубатюк Т. А.³

¹ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины», г. Харьков;

²Национальный фармацевтический университет, г. Харьков;

³ГНУ «НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины», г. Харьков
lipson@ukr.net

Проведен виртуальный скрининг методом молекулярного докинга с помощью программы AutoDoc 4.2. 27 000 структур азот- и серосодержащих гетероциклических соединений, с целью выявления среди них ингибиторов фермента 11-гидроксистероиддегидрогеназы (11 β -HSD1). Установлено, что наибольшее сродство к указанной мишени *in silico* обнаружили производные Spiro(пирролидин-3,2'-оксиндола), в состав молекулы которых входят остатки серосодержащих аминокислот. Сделан вывод о целесообразности синтеза этих веществ и экспериментально оценены их антидиабетические свойства.

К л ю ч е в ы е с л о в а: молекулярный докинг, 11-гидроксистероиддегидрогеназа, Spiro(пирролидин-3,2'-оксиндола), антидиабетические свойства.

THE SCREENING *IN SILICO* OF POTENTIAL 11-HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASE 1 INHIBITORS

V. V. Lipson^{1,3}, V. V. Borodina¹, R. G. Redkin², N. V. Svetlichnaya¹, T. A. Zubatyuk²

¹SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv;

²National Pharmaceutical University, Kharkiv;

³SSI «NTK «Institute for Single Crystals» of NAS of Ukraine», Kharkiv
lipson@ukr.net

It was conducted the virtual screening by molecular docking with the program AutoDoc 4.2. for 27 000 structures of nitrogen and sulfur containing heterocyclic compounds has been carried out in order to identify of the enzyme 11 β -hydroxysteroiddehydrogenase (11 β -HSD1) inhibitors among them. It was established that spiro(pyrrolidin-3,2'-oxindoles), molecules of which have the residues of sulfur-containing amino acids have been demonstrated *in silico* the greatest affinity to the specified target. We concluded of the expediency of these substances synthesis, and their anti-diabetic properties were experimentally estimated.

К e y w o r d s: molecular docking, 11 β -hydroxysteroiddehydrogenase, spiro(pyrrolidin-3,2'-oxindoles), and anti-diabetic properties.