

УДК 57.088.5

Идентификация новых ингибиторов киназной активности IGF1R методами молекулярного моделирования и высокоэффективного скрининга

Р. Морев¹, А. Васильченко¹, М. Платонов¹, А. Григоренко^{1,2}, Е. Волкова¹, С. Зозуля^{1*}¹Енамин, 02094, Киев, ул. Красноткацкая, 78, Украина²Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, 01601, Киев, ул. Владимирская, 64, Украина

*E-mail: s.zozulya@enamine.net

Поступила в редакцию 04.12.2012

РЕФЕРАТ Проведен поиск низкомолекулярных ингибиторов киназной активности рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R), представленных новыми хемотипами, которые могут быть использованы для создания лекарственных средств, превосходящих известные экспериментальные блокаторы IGF1R. С помощью виртуального скрининга с использованием методов молекулярного моделирования и докинга, а также лиганд-ориентированного фармакофорного подхода созданы фокусированные библиотеки веществ. Способность отобранных в результате молекулярного моделирования соединений ингибировать активность IGF1R-киназы проверена экспериментально с использованием высокоэффективного биохимического скрининга. Найдены новые хемотипы ингибиторов IGF1R, которые могут стать основой для разработки высокоэффективных терапевтических средств, подавляющих активность IGF1R.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рецептор инсулиноподобного фактора роста-1, ингибитор киназной активности, противоопухолевые средства, высокоэффективный скрининг, виртуальный скрининг.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ADP – аденозиндифосфат; ATP – аденозинтрифосфат; IGF1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста-1; InsR – рецептор инсулина; ВЭС – высокоэффективный скрининг.

ВВЕДЕНИЕ

Рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R) принадлежит к классу трансмембранных рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью. IGF1R широко представлен в различных клетках и тканях большинства позвоночных, это ключевой регулятор роста как в ходе развития, так и во взрослом организме. Филогенетически IGF1R очень близок к рецептору инсулина (InsR), который регулирует гомеостаз углеводов, а также метаболизм жиров и белков. Эукариотические IGF1R и InsR имеют около 60% гомологии на уровне полной аминокислотной последовательности и более 90% в зоне каталитических доменов.

Сигнальный путь IGF1R вовлечен в патогенез онкологических заболеваний. Так, высокий уровень IGF1R, его лигандов IGF-1 и IGF-2 и/или аутокринная активация этого сигнального пути характерны для рака молочной и предстательной железы, печени, легких, мочевого пузыря, щитовидной железы, почек, саркомы Юинга, рабдомиосаркомы, лимфом, лейкозов, множественной миеломы и т.д.

[1–3]. IGF1R необходим для трансформации клеток онкогенами, повышение его уровня может привести к лиганд-зависимой злокачественной трансформации клеток и образованию опухолей [4]. Случаи гиперактивации мутантных форм IGF1R как причины опухолевого роста до сих пор не описаны, что противоречит классическим механизмам онкогенеза с участием большинства других тирозинкиназ. При ингибировании IGF1R снижается пролиферативная активность клеток, а также развивается проапоптотический эффект. IGF1R экспрессируется в опухолевых клетках различного типа, что позволяет рассматривать его в качестве потенциальной мишени для комбинированной противоопухолевой терапии. Роль сигнального пути IGF в канцерогенезе подтверждена экспериментально, поэтому разработка стратегий, в основе которых лежит подавление активности IGF1R как низкомолекулярными ингибиторами киназы, так и моноклональными антителами, находится в фокусе исследований многих фармацевтических и биотехнологических компаний в течение последних 10–15 лет. Не менее 10 низко-

молекулярных и белковых ингибиторов IGF1R проходят поздние доклинические либо клинические испытания.

Каталитические домены IGF1R и InsR обладают высоким сходством, поэтому практически все известные низкомолекулярные ингибиторы IGF1R в значительной степени подавляют и активность InsR. Подобные низкоселективные ингибиторы могут влиять на гомеостаз глюкозы, приводя к гипергликемии с высокой вероятностью развития диабетических состояний. Гипергликемические эффекты низкомолекулярных ингибиторов IGF1R действительно наблюдали в ходе доклинических, а в последние годы и клинических испытаний, что вызвало сомнения в возможности их успешного применения в клинической практике. В последнее десятилетие очевидная проблема селективности малых молекул – ингибиторов IGF1R, привела к определенному сдвигу интересов ученых в направлении белковых ингибиторов IGF1R или антител, высокоспецифичных к рецептору либо его лигандам. Однако, поскольку сигнальные пути IGF1R и InsR в существенной степени пересекаются, присущая ингибиторам IGF1R способность частично подавлять и рецептор инсулина может быть полезной при использовании таких соединений в качестве противоопухолевых средств [5, 6]. С другой стороны, необходимо отметить, что соединения, высокоселективно подавляющие активность IGF1R *in vitro*, совсем не обязательно проявляют подобную селективность в организме. Так, оказалось, что ряд активных и высокоселективных *in vitro* терапевтических антител против IGF1R вызывают гипергликемию и проявляют низкую терапевтическую эффективность в поздних доклинических и клинических испытаниях [4, 7]. Отсутствие у высокоселективных *in vitro* ингибиторов IGF1R способности ингибировать данный рецептор *in vivo* можно объяснить перекрестной активацией рецептора IGF-1 инсулином (и наоборот), связыванием антител к IGF1R с гетеродимерами IGF1R-InsR, а также действием таких компенсаторных механизмов, как индукция экспрессии InsR или биосинтеза IGF-1 и инсулина при снижении количества IGF-1/IGF1R в организме [7, 8]. Кроме проблем, связанных с селективностью, существуют и механизмы, определяющие резистентность к терапии, направленной на IGF1R, что может привести к необходимости коингибирования других молекулярных мишеней для достижения эффективности [9].

Таким образом, можно сказать, что, несмотря на многочисленные экспериментальные данные, указывающие на IGF1R как на перспективную мишень для противоопухолевой терапии, а также на многолетние поиски эффективных блокаторов сигнального

пути IGF1R различной природы и механизмов действия, результаты клинических испытаний на сегодняшний день не вызывают оптимизма [7, 10]. Поэтому поиск клинически более эффективных ингибиторов IGF1R, включая и малые молекулы, остается актуальной задачей. Предполагается, что новые ингибиторы могут отличаться от уже известных механизмом действия, коингибированием других мишеней, лучшей органо- и тканеселективностью распределения, фармакодинамическими свойствами и соотношением селективности ингибирования IGF1R и InsR.

В результате скрининга 2935 химических соединений, отобранных путем как лиганд-, так и мишень-ориентированного виртуального скрининга, в представленной работе найдено несколько низкомолекулярных ингибиторов IGF1R. Эти вещества отличаются от описанных ранее структурно, что наряду с параметрами их активности и селективности делает возможной разработку на основе данных хемотипов клинически конкурентоспособных противоопухолевых соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты

Все реагенты для скрининга, включая универсальный тест-набор для определения активности киназ ADP-Glo™ Kinase Assay (Кат. V9401), а также тест-системы для отдельных киназ – IGF1R (Кат. V3581), InsR (Кат. V9411), Met (Кат. V3361), Syk (Кат. V3801) и Btk (Кат. V2941), предоставлены компанией Promega Corp. (Мэдисон, Висконсин, США) и использовались согласно инструкциям производителя. Стандартные ингибиторы киназ PQ401 (Кат. P0113), AG538 (Кат. T7697), стауроспорин (Кат. S5921), а также натриевая соль поли-(Glu4,Tyr1) (Кат. P0275) и диметилсульфоксид (ДМСО) (Кат. 41640) были производства Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

Белые 384-луночные планшеты для малых объемов с U-образным дном (Кат. 3673) производства Corning (Лоуэлл, Массачусетс, США) использовали при применении люминесцентных методов детекции. Роботизированные автоматические жидкостные дозаторы на 96 и 384 канала (Кат. 5316) произведены Thermo Scientific/Matrix (Гудзон, Нью-Гэмпшир, США). Полипропиленовые 384-луночные планшеты с V-образным дном (Кат. 784201) производства Greiner Bio-One (Монро, Северная Каролина, США) и 96-луночные планшеты производства Matrix (Кат. 4271) или подобные им использовали для хранения и растворения веществ. Реагенты и буферные растворы хранили в одноразовых резервуарах (Кат. N372790) производства Beckman Coulter (Индианаполис, Индиана, США).

Все исследуемые соединения получены из компании Enamine, Ltd. (www.enamine.net, Киев, Украина) в виде замороженных 10 мМ растворов в ДМСО в запечатанных 96- или 384-луночных полипропиленовых планшетах.

Молекулярное моделирование и хемоинформатика

Все расчеты были осуществлены с использованием пакета программного обеспечения QXP/Flo+ разработки McMartin и др. [11]. Использовали кластер конфигурации HPC Linux (164 CPU ядер в пяти нодках). Всю работу с химическими структурами веществ и базами данных проводили с использованием программы Instant JChem (ChemAxon, версия ПО 5.10.1).

Высокоэффективный скрининг (ВЭС)

Высокоэффективный скрининг на мишени IGF1R осуществляли с использованием коммерческих наборов для определения активности киназ ADP-Glo™ Kinase Assay и IGF1R-киназы (Promega). Киназные реакции (конечный объем 7 мкл) проводили в 384-луночном планшете. Роботизированные пипетки PlateMate Plus использовали для разведений и добавления всех реагентов. Так, каждая лунка планшета содержала 3 мкл смеси фермент/субстрат (1 мкг субстрата (пептид IGF1Rtide) и 4 нг рекомбинантной IGF1R-киназы) в 0.66-кратном реакционном буфере. Однократный буфер содержал 40 мМ Трис-НСI; 20 мМ хлорида магния; 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; 2 мМ хлорида марганца и 250 мкМ дитиотреитола (ДТТ). Перед добавлением к киназной смеси стоковые 10-мМ растворы веществ в ДМСО разбавляли ДМСО до 2 мМ, после чего аликвоты разведений (3 мкл) переносили в реакционный буфер (83 мкл) и перемешивали. По 2 мкл полученных водных растворов соединений переносили в соответствующие лунки до конечной концентрации вещества в 20 мкМ и 1% ДМСО в реакционной смеси. Планшеты преинкубировали в течение 10 мин при 27°C и перемешивании при 300 об/мин. Киназную реакцию запускали, добавляя 2 мкл раствора АТР, при этом рабочая концентрация АТР составляла 50 мкМ. Через 90 мин (27°C, 300 об/мин) в реакционную смесь добавляли 7 мкл реагента ADP-Glo, инкубировали в течение 40 мин и добавляли реагент для детекции (14 мкл). После заключительной инкубации (20 мин, 27°C) люминесценцию измеряли на спектрофотометре-ридере PolarStar Omega (время интегрирования – 0.2 с, усиление сигнала = 3500).

Соединения тестировали в четырех или двух повторностях. В каждом планшете использовали контрольный ингибитор стауроспорин в четырех повторностях (2 мкМ). В колонках 1, 2 каждого планшета

смесь киназа/субстрат и тестируемые соединения заменяли 0.66-кратным буфером и однократным буфером с ДМСО (конечная концентрация ДМСО – 1%) соответственно для создания позитивного контроля. Колонки 23, 24 также не содержали соединений (вместо них добавляли однократный буфер с ДМСО) и считали их негативным контролем. Перед тем как приступить к определению селективности ингибирования и зависимости доза–эффект, все хиты, обнаруженные в первичном скрининге, вторично проверяли в тех же условиях. Стоковые растворы повторно тестируемых соединений готовили заново из независимых сухих навесок для исключения ошибок при взвешивании (подтверждение «из порошков»).

Оборудование для скрининга и анализ данных

При подготовке образцов для скрининга использовали роботизированные 96- или 384-канальные пипетки PlateMate Plus, применяемые в высокоэффективном режиме, или многоканальные электронные пипетки Matrix Impact (Thermo Scientific, Гудзон, Нью-Гэмпшир, США). Данные высокоэффективного скрининга (ВЭС), а также исследований селективности ингибирования киназ и зависимостей доза–эффект (IC_{50}) для наиболее сильных ингибиторов получены методом люминесцентной детекции с использованием планшетных ридеров PolarStar Omega (BMG Labtech, Ортенберг, Германия) и SpectraMax M5 (Molecular Devices Corp., Саннивейл, Калифорния, США).

Данные об активности киназ с детекцией в системе ADP-Glo, полученные с планшетных ридеров, выражали в условных единицах люминесценции (у.е.л.). Относительную киназную активность рассчитывали, используя следующую формулу: Активность, % = $100 \times (\text{люминесценция исследуемого образца} - \text{среднее значение люминесценции для негативного контроля (без киназы)}) / (\text{среднее значение люминесценции для позитивного контроля (киназа без ингибитора)} - \text{среднее значение люминесценции для негативного контроля})$. Фактор Z' – показатель достоверности и воспроизводимости ВЭС – определяли, используя следующую формулу:

$$Z' = 1 - [3 \times (SD_{\text{образец}} + SD_{\text{контроль}}) / |M_{\text{образец}} - M_{\text{контроль}}|] \quad [12],$$

где SD – стандартное отклонение, M – среднее значение люминесцентного сигнала для образца и контроля соответственно. Результаты скрининга обрабатывали с использованием шаблонов Microsoft Excel, разработанных для подсчета уровня ингибирования, Z'-фактора, а также программы GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., Ла-Хойя, Калифорния,

США) для визуализации кривых зависимостей доза–эффект (IC_{50}). Кривые зависимости доза–эффект, представленные в процентах активности соответствующей киназы, были построены и аппроксимированы при использовании программы Prism, где показатели максимальной и минимальной активности были приведены к 100 и 0% соответственно. Перед началом высокоэффективного скрининга условия проведения экспериментов были оптимизированы и валидированы, в частности, определены процент превращения АТФ (не превышал 20%), приемлемое «окно эксперимента» (соотношение сигнал/фон) – как минимум 6, приемлемый Z'-фактор – не менее 0.6, а также воспроизводимость скрининга изо дня в день и от планшета к планшету. Первичный скрининг проводили при концентрации исследуемых соединений, равной 20 мкМ; далее некоторые слабые хиты (соединения, показавшие активность в тест-системе) тестировали дополнительно, используя более высокие их концентрации (40 или 80 мкМ). Статистически значимым хитом считали соединение, активность которого в первичном скрининге была как минимум на три стандартных отклонения ниже, чем среднее значение активности соединений по планшету (не принимая во внимание контроль). Графики Лайнуивера–Берка строили в Excel или Prism с использованием стандартных алгоритмов [13]. Оптимизацию и валидацию тест-системы для высокоэффективного скрининга и сам скрининг проводили согласно общим положениям и инструкциям, опубликованным на сайте Национального центра химической геномики США (NCGC Assay Guidance Manual and High-throughput Assay Guidance Criteria, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>).

Кривые зависимости доза–эффект (IC_{50}) и исследование селективности ингибирования

Селективность ингибирования отобранных хитов проводили на панели киназ Met, Syk, Btk, InsR при одной фиксированной концентрации ингибитора (за исключением InsR – в данной тест-системе изучали также зависимость доза–эффект). Ферментативную реакцию всех перечисленных киназ проводили в кинетических условиях, близких к описанным для IGF1R. Во всех случаях эффективность киназной реакции определяли люминесцентным методом с использованием набора ADP-Glo (Promega).

Зависимость доза–эффект и значения IC_{50} для подтвержденных хитов определяли с использованием IGF1R- и InsR-киназ. Условия эксперимента были близкими к условиям при ВЭС, за исключением того, что соединения добавляли к планшетам в формате восьмиточечных серийных разведений 1 : 2, начиная с высшей концентрации (100 мкМ), при постоянной

конечной концентрации ДМСО (1%) и в четырех повторях. Реакции для обеих киназ проводили при 27°C в присутствии 500 мкМ ДТТ, в разных экспериментах время инкубации составляло 2.5 или 4.5 ч. Использовали 4 и 2 нг киназы IGF1R и InsR на лунку соответственно. Обычно двукратные серийные разведения стоковых растворов делали сначала в чистом ДМСО, начиная с 10 мМ и заканчивая 19.5 мкМ, что соответствовало рабочим концентрациям от 100 до 0.019 мкМ в реакционном буфере с 1% содержанием ДМСО после переноса.

Количество киназ Met, Syk и Btk в реакциях определяли таким образом, чтобы превращение АТФ в АДФ в выбранных условиях не превышало 20%. Соотношение сигнал/фон в тест-системах для данных киназ составляло 3–5. Объем киназной реакции для Met, Syk и Btk (5 мкл) получали последовательным смешением 2 мкл раствора фермента (6, 8 и 4 нг фермента на лунку соответственно), 1 мкл водного раствора вещества в двукратном буфере (5% ДМСО) и 2 мкл смеси АТФ/субстрат поли-(Glu4,Tyr1) в 0.5-кратном буфере. Содержание АТФ и субстрата в рабочем растворе – 50 мкМ и 0.2 мг/мкл соответственно. Состав однократного буфера для киназ – 40 мМ Трис-НСl, 20 мМ хлорида магния, 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 2 мМ хлорида марганца (только для Btk) и 500 мкМ ДТТ, рН 7.5. При изучении селективности использовали соединения в концентрации 40 мкМ. В каждом опыте по шесть лунок отводили под положительный и отрицательный контроль, еще в шесть лунок вместо соединения добавляли стауроспорин (0.5–1 мкМ). Все соединения проверяли в четырех–шести повторностях. Время инкубации киназы, субстрата и ингибиторов перед добавлением АТФ составляло 20 мин (25°C), ферментативная реакция продолжалась 25 мин (37°C). После этого в реакционную смесь добавляли 5 мкл реагента ADP-Glo, а через 40 мин – реагент для детекции (10 мкл). После 30 мин инкубации (25°C) люминесценцию измеряли на спектрофотометре PolarStar Omega (время интегрирования – 0.5 с, усиление сигнала = 4095).

Кинетика ферментативной реакции, уравнение Михаэлиса–Ментен

В координатах Лайнуивера–Берка строили графики для наиболее эффективных ингибиторов L1 и T4. С этой целью активность данных ингибиторов проверяли при разных концентрациях субстрата и АТФ в тест-системе IGF1R-киназы.

При изучении конкуренции ингибиторов с АТФ использовали соединение L1 (100, 50, 25, 12 и 0 мкМ) в комбинации с АТФ в восьми разных концентрациях (от 519 до 4 мкМ). Соединение T4 тестировали

в таких же концентрациях, как и L1, в присутствии АТФ в диапазоне от 1 мМ до 8 мкМ (восемь концентраций). В качестве субстрата использовали пептид IGF1Rtide (143 мкг/мл). Значения во всех точках определяли в четырех повторностях. Содержание киназы IGF1R в лунке составляло 1 нг, концентрация ДТТ – 500 мкМ; реакция продолжалась в течение 4 ч при 27°C. При построении графиков для L1 с целью лучшей линейной аппроксимации учитывали только шесть концентрационных точек АТФ.

При изучении конкуренции ингибитор/субстрат использовали восемь двукратных разведений субстрата поли-(Glu4, Tyr1) – от 0.9 до 114.3 мкМ, принимая среднюю молекулярную массу субстрата за 12.5 кДа. L1 тестировали при 50, 25, 0 мкМ и T4 – при 50, 12.5, 0 мкМ. Концентрация АТФ в киназной реакции – 250 мкМ, ДТТ – 250 мкМ, IGF1R – 2 нг на лунку. При построении графиков учитывали только пять концентрационных точек субстрата, попадающих в линейный диапазон. Во всех экспериментах перед добавлением АТФ реакционную смесь инкубировали в течение 20 мин при 27°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Виртуальный скрининг. Мишень-ориентированная выборка

Общей концепцией этой работы было применение стратегии рационального скрининга, опирающейся на итеративный скрининг небольших фокусированных библиотек соединений, отобранных из обширной коллекции, содержащей более 1.9 млн соединений, «Енамина» (www.enamine.net). Исходя из опубликованных данных об ингибиторах IGF1R и о кристаллической структуре киназного домена этого рецептора, отбор осуществляли по двум независимым направлениям виртуального скрининга – мишень- и лиганд-ориентированному. Соединения, содержащие потенциальные токсифорные и реакционноспособные структурные фрагменты, удаляли при помощи фильтрации, основанной на критериях медицинской химии [14]. Такой подход помогает быстро идентифицировать новые фармакологически активные соединения, не прибегая к крупномасштабному скринингу больших наборов, объединенных по принципам случайного химического разнообразия. Основной идеей был поиск соединений, отличных от известных хемотипов ингибиторов IGF1R и выходящих за рамки парадигмы связывания в каталитическом сайте киназы и прямой конкуренции с АТФ. Мы использовали несколько подходов к моделированию *in silico* для создания мини-библиотек, состоящих из нескольких сотен соединений каждая, которые затем экспериментально протестировали в биохимической

кеназной тест-системе. В общей сложности в ходе этой работы проверили около 4000 соединений, включая аналоги активных соединений, найденных при первичном скрининге. Два из упомянутых вычислительных подходов, основанных на тестировании 2935 молекул, привели к открытию описанных ниже нескольких новых хемотипов с привлекательными свойствами и структурной новизной.

Недавно была описана серия аллостерических ингибиторов киназного домена IGF1R [15]. Механизм работы этих соединений основан на связывании с аллостерическим карманом, который не пересекается с каталитическим сайтом и пространственно расположен недалеко от киназной «активационной петли», фосфорилируемой в трех положениях в процессе активации фермента [16, 17]. Активность данных соединений не очень высока, но селективность части из них в отношении ингибирования киназной активности IGF1R была до 10 раз выше по сравнению с InsR. Такие результаты позволили нам предположить, что этот сайт связывания представляет интерес для создания селективных ингибиторов IGF1R. Для создания библиотеки ингибиторов на основании рентгеноструктурных данных (PDB-код 3LWO) мы построили фармакофорную модель (рис. 1) взаимодействия описанной серии соединений с аллостерическим сайтом. В ее состав вошли Н-донор, Н-акцептор, ароматическое/псевдоароматическое кольцо и любая группа, пространственно удаленная от основного молекулярного кластера.

Один из ключевых моментов связывания молекулы в аллостерическом сайте – водородная связь с карбонильной группой Val1063. Для этого в молекуле должен быть фрагмент, идентифицируемый как сильный донор водородной связи. Неоднозначность трактовки этого термина в различных программах химического поиска вынудила нас подобрать такой алгоритм самим.

Перед дальнейшим виртуальным фильтрованием доступной коллекции (~1900000 соединений, www.enamine.net) мы отобрали из нее все сильные доноры водородной связи. Сильными донорами считали соединения следующих типов: все алифатические амины, включая третичные амины, способные стать донорами водородной связи при протонировании, а также другие соединения с неамидными и несulfонамидными NH-группами. Отбор соединений последней группы производили с использованием SMART ($[*1][*7;H1]([!$([*6,*16;X3,X4] = [O])])!$([*6,*16;X3,X4] = [O])])$), автоматически выбирающего удачные, с нашей точки зрения, фрагменты. В дальнейшем отбросили все соединения, у которых не было ароматического кольца или Н-акцептора. Далее полученную базу соеди-

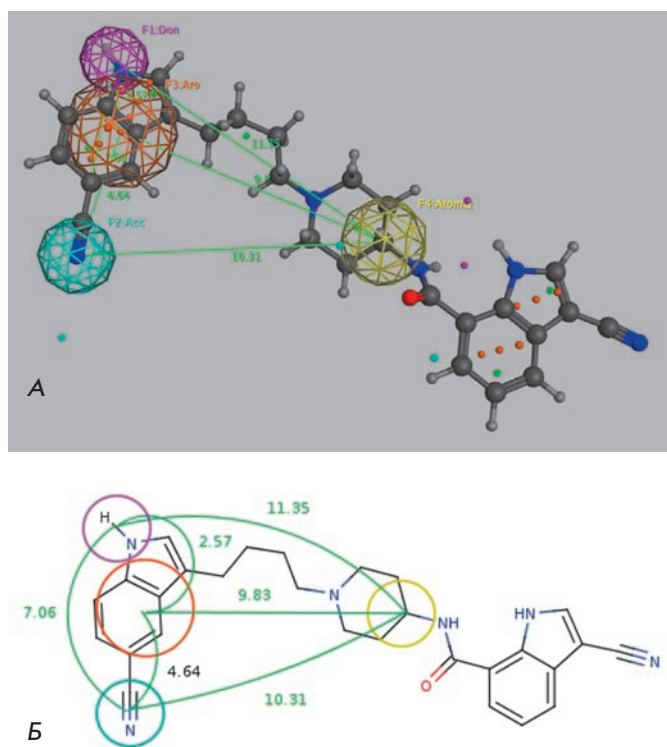


Рис. 1. Фармакофорная модель, использованная при виртуальном скрининге. А – Фармакофорная модель ингибитора IGF1R, созданная на основе данных рентгеноструктурного анализа, для 3-циано-N-{1-[4-(5-циано-1H-индол-3-ил)-бутил]пиперидин-4-ил}-1H-индол-7-карбоксамид. Ингибитор IGF1R показан в шаро-стержневом отображении. Б – Общая фармакофорная модель с указанными расстояниями между ключами поиска. Пурпурный – донор водородной связи; голубой – акцептор водородной связи; оранжевый – ароматическое кольцо; желтый – любой тяжелый атом; зеленый – расстояния между центрами фармакофорных групп

нений (около 400000) фильтровали на соответствие построенной фармакофорной модели. При этом были доступны все степени свободы для вращаемых связей, а также наложено дополнительное правило «запрещенного объема» на атомы белка. После обработки исходной базы по данным правилам найдено 42031 соединения, которые строго отвечают параметрам модели. Эти соединения поступили на следующий этап обработки – молекулярный докинг.

Докинг проводили с использованием модели гибкого лиганда и фиксированного рецептора, используя алгоритм систематического докинга (SDOCK+), который обладает достаточной способностью воспроизведения конформаций лигандов с минимальным

среднеквадратичным отклонением (RMSD) относительно кристаллографических данных [18]. Максимальное число шагов расчета устанавливали на 300 и 20 лучших полученных комплексов (исходя из внутренних скоринг-функций QXP) сохраняли для анализа. Модель сайта связывания формировалась исходя из рентгеноструктурных данных комплекса 3LWO. При создании модели сайта связывания учитывали аминокислотные остатки в радиусе 1.0 нм вокруг исходного ингибитора, попадающие в этот объем хотя бы частью атомов.

Обработку данных после докинга и анализ результатов осуществляли по принципу максимального следования логике фармакофорной модели, создавая которую мы определили ключевые параметры, влияющие на силу связывания лиганда с сайтом. Применяли следующие основные геометрические фильтры – водородную связь с Val1063, стекинг-взаимодействие с Met1054 и Met1079, а также ряд второстепенных – электростатическое взаимодействие с Lys1033 и/или образование водородных связей с Asp1153 и/или Glu1050, Arg1134 (нумерация по PDB-коду 3LWO). При выборке соединений в полном объеме учитывали основные фильтры, а также один или несколько второстепенных. После автоматического фильтрования проводили визуальную инспекцию для проверки соответствия правил фильтрования выбранной модели. Отобранные 1746 соединений, по механизму формирования выборки обозначенные как группа Т (target – мишень), рекомендовали для высокопроизводительного скрининга. Как пример можно привести взаимодействие производного 1,2-дигидропиридин-2-тиона (соединение Т2) с моделью аллостерического сайта связывания (рис. 2). В этом случае были выполнены все основные требования модели, три дополнительных взаимодействия, а именно, реализуются водородные связи/стекинг с Arg1134, His1133 и Asp1154. Эти условия, по нашему мнению, достаточны для проявления ингибиторной активности по постулированному выше механизму.

Виртуальный скрининг. Лиганд-ориентированная выборка

Выборка потенциальных ингибиторов IGF1R была создана с использованием лиганд-ориентированного подхода и с учетом характеристик ингибиторов IGF1R, описанных группой Левицкого [19]. Так как показано, что ряд исследованных соединений имеют АТР-неконкурентный механизм ингибирования IGF1R и проявляют существенную селективность к IGF1R в сравнении с InsR, на их основе предприняли поиск структурно удаленных аналогов из коллекции веществ «Енамина». Анализ соотноше-

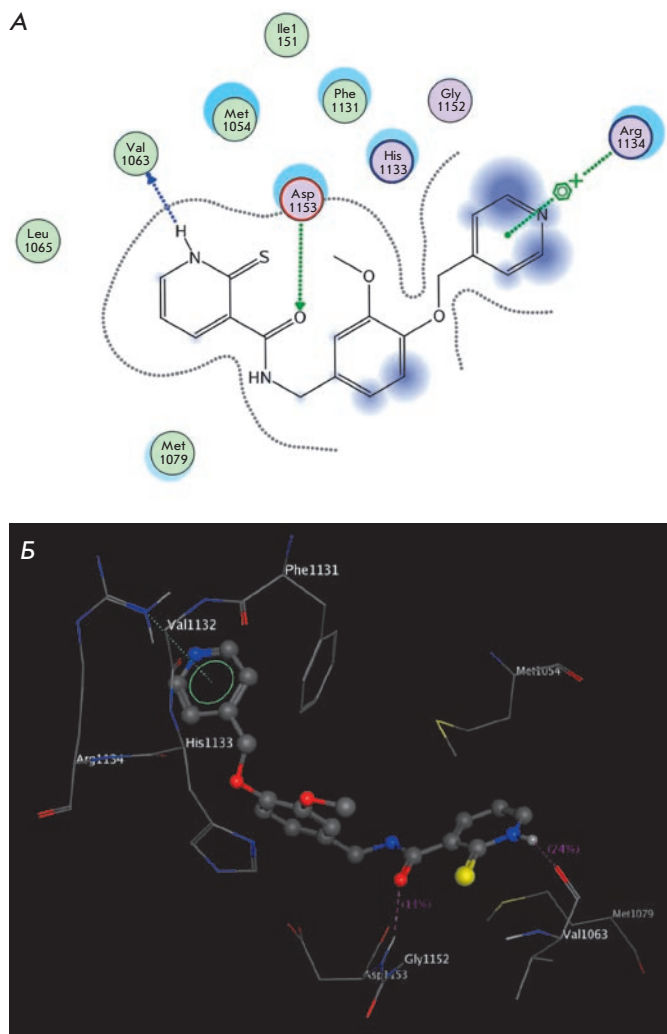


Рис. 2. Ключевое взаимодействие соединения T2 с моделью сайта связывания IGF1R. А – Двумерная диаграмма, показывающая ключевые взаимодействия; Б – комплекс лиганд–мишень, полученный при докинге

ния структура–активность в этих соединениях (некоторые изображены на рис. 3) позволил определить те их структурные особенности, которые могут повышать эффективность ингибирования. В частности, соединения, содержащие бензольные кольца, замещенные во 2-м или 3-м положении и соединенные насыщенными NH-CH₂- или CH₂-N-CH₂-линкерами, проявили себя как эффективные ингибиторы киназной активности, в то время как дальнейшее увеличение длины линкера приводило к снижению эффективности ингибирования. По меньшей мере одна группа, содержащая атом-акцептор водородной связи (N- или O-), должна располагаться в пара- и/или мета-положениях бензольных колец, связанных

между собой линкером. Мощность ингибирования с очевидностью снижается от класса к классу в таком порядке: катехолы > производные салициловой кислоты > бензодиоксолы. Можно предположить, что наличие свободно вращающихся атомов-акцепторов, расположенных в пара- и/или мета-положениях бензольных ядер в молекуле, обеспечивает эффективное связывание с киназой. Более того, дополнительные акцепторные атомы водорода увеличивают эффект ингибирования IGF1R при их размещении как в ароматическом ядре молекулы, так и в составе алифатического заместителя (рис. 3А,Б,В). В то же время ацилирование пара- и/или мета-групп (рис. 3А,Г) не влияло существенно на активность, но повышало селективность ингибирования InsR- и Src-киназ. Полностью замещенные бензодиоксольные вещества без водородных доноров также проявляли ингибиторную активность.

Данные наблюдения были сведены в формулу Маркуша (рис. 3Ж). Предложенная структура должна содержать как минимум два пяти- или шестичленных ароматических цикла и по крайней мере один из перечисленных ниже заместителей R в положениях 3 и/или 4 ароматической системы. Такими группами (R) могут быть уже описанные O- и N-содержащие заместители, а также фтор- и α-фторалкильные заместители как потенциальные акцепторы водорода. Эти R-группы могут быть включены в циклы. Линкеры длиной от одного до трех атомов, образованные любыми нециклическими связями (одиночными, двойными или тройными), использовали для соединения ароматических циклов. В параметры поиска соединений в базе данных был введен критерий «любой элемент, кроме водорода» для составляющих как циклических ядер, так и линкеров. В результате поиска *in silico* с использованием программного обеспечения Instant JChem из ~1.9 млн соединений коллекции «Енамина» отобрали 1327, соответствующих формуле Маркуша. После применения упомянутых фильтров медицинской химии [14], а также установки предельных значений предсказанной расчетами водной растворимости и липофильности ($\log P < 5$ и $\log S < 5$), из этих 1327 соединений для ВЭС выбрали группу из 607 соединений, обозначенную как выборка L (ligand).

Высокоэффективный скрининг и исследование зависимостей доза–эффект

Скрининг выборок Т-типа (1746 соединений) и L-типа (607 соединений), сформированных согласно описанным выше методикам, проводили с использованием коммерческих тест-систем компании Pro-mega для детекции (ADP-Glo) и киназной реакции для IGF1R. В киназной тест-системе используется

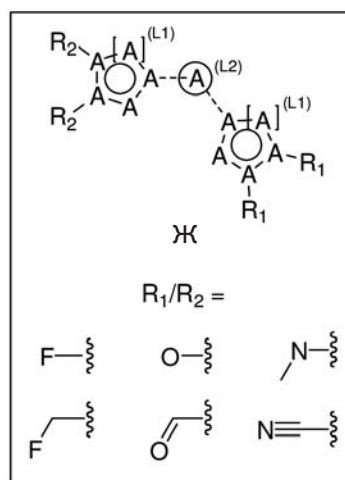
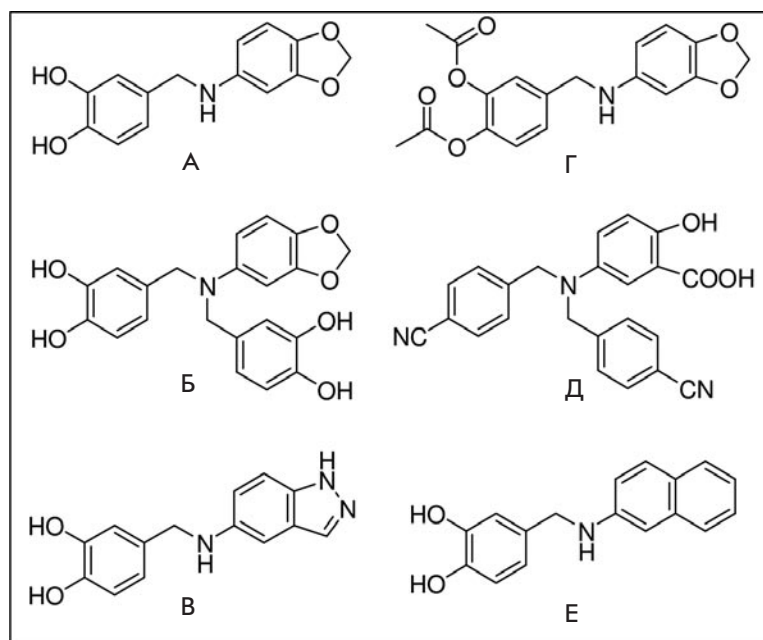


Рис. 3. Ингибиторы IGF1R, на основе которых создана L-выборка (А–Е) и формула Маркуша (Ж), по которой осуществлялся их отбор

рекомбинантный внутриклеточный фрагмент IGF1R, а эффективность киназной реакции оценивается по количеству ADP – универсального продукта киназной реакции – посредством ферментативного превращения ADP в АТФ, с последующим определением активности АТФ-зависимой люциферазы [20]. Перед осуществлением ВЭС тест-систему валидировали с использованием коммерчески доступных ингибиторов IGF1R – производного диарилмочевины PQ401 [21] и тирфостина AG538 [22], а также пан-киназного ингибитора стауроспорина. Кривые зависимости доза–эффект, построенные для данных ингибиторов, соответствовали опубликованным данным [21, 22]. Кроме того, воспроизводимость ВЭС проверяли дополнительно – от дня ко дню, а также от планшета к планшету согласно требованиям к проведению ВЭС.

Все соединения, показавшие статистически значимую ингибиторную активность в первичном ВЭС (первичные хиты), проверяли как минимум еще 1 раз. Структурные аналоги обнаруженных хитов были отобраны из коллекции «Енамина» методом хемоинформационного поиска и также исследованы в ВЭС в процессе расширения хитов (рис. 4). Расширение хитов осуществляли путем отбора ближайших структурных аналогов наиболее активных соединений первичного ВЭС с варьированием всех возможных заместителей в структуре молекулы (субструктурный поиск). Отдельным условием соединений из Т-выборки было сохранение ключевого фармакофора, отображенного на рис. 1.

В результате первичного скрининга выборки Т-типа в тест-системе IGF1R-ADP-Glo обнаружили три хита; четвертый хит из этой группы (Т4) выявили после процедуры расширения. Скрининг выборки L-типа также позволил идентифицировать три активных соединения – L1, L2, L3; четвертый хит L4 нашли после расширения. Эти ингибиторы выбрали для дальнейшего изучения. Критерии отбора включали: оценку мощности ингибирования, воспроизводимость результатов ингибирования, а также химические особенности молекул, в частности новизну структуры, возможность модификации молекулы и отсутствие нежелательных функциональных групп, которые могут помешать дальнейшему развитию химической серии.

Селективность ингибиторов

Селективность ингибирования восьми идентифицированных в результате ВЭС хитов проверили в тест-системах для киназ InsR, Met, Syk и Btk. В то время как InsR является ближайшим структурным аналогом IGF1R, остальные три фермента – это эволюционно более отдаленные рецепторная (Met) или цитоплазматические (Syk, Btk) тирозинкиназы. С целью сравнения IGF1R и InsR построили кривые зависимости доза–эффект для восьми соединений и определили значения IC_{50} (табл. 1). Ингибирование остальных киназ оценивали при одной концентрации изучаемых соединений. Кинетику ингибирования всех киназ изучали в условиях, близких к условиям проведения тестов IGF1R и с использованием единой системы де-



Рис. 4. Схема высокоэффективного скрининга

текции ADP-Glo, что обеспечивает оптимальную возможность сравнения результатов между собой. Эта небольшая киназная панель не может предсказать профиль ингибирования более чем 500 протеинкиназ человека тестируемыми соединениями, однако позволяет провести предварительную оценку селективности к мишени внутри группы тирозинкиназ, эволюционно наиболее родственной IGF1R. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что эффективность ингибирования IGF1R и InsR соединениями L1, L3, L4 очень близка между собой, но L2, T2 и T4 ингибируют IGF1R в 1.5–4 раза сильнее, чем InsR. Интересно отметить, что в наших экспериментах T1 и T3 ингибировали активность киназы InsR в 5–10 раз сильнее, чем IGF1R. Подобные параметры селективности сходны или лучше, чем практически у всех известных низкомолекулярных ингибиторов IGF1R при демонстрации в корректных биохимических тест-системах [23], что очевидно отражает исключительно высокую степень структурной идентичности каталитических сайтов и их близкого окружения у этих рецепторов. Эксперименты по ингибированию других тирозинкиназ (табл. 2) показали, что соединения L1 и T3 в концентрации 40 мкМ практически не подавляют активность киназ Met, Btk и Syk, в то время как остальные исследуемые соединения могут оказывать слабый ингибиторный эффект (оценочные $IC_{50} > 50$ мкМ).

Таблица 1. Ингибирование IGF1R и InsR (IC_{50}) хитами из L- и T-выборок

Соединение	Структура	IC_{50} , мкМ	
		IGF1R	InsR
L1		18	22
L2		25	100
L3		26	29
L4		25	30
T1		~100	20
T2		18	30
T3		~100	10
T4		7	10

Таблица 2. Ингибирование Met, Syc и Btk хитами из L- и T-выборок

Соединение*	Активность Met, %	±SD	Активность Syc, %	±SD	Активность Btk, %	±SD
L1	102	3	109	16	98	10
L2	63	2	48	5	106	6
L3	77	4	88	4	106	8
L4	60	2	53	9	113	11
T1	78	2	84	10	92	11
T2	62	4	72	13	83	8
T3	98	3	115	12	81	8
T4	75	3	115	19	82	5

*Концентрация соединений 40 мкМ.

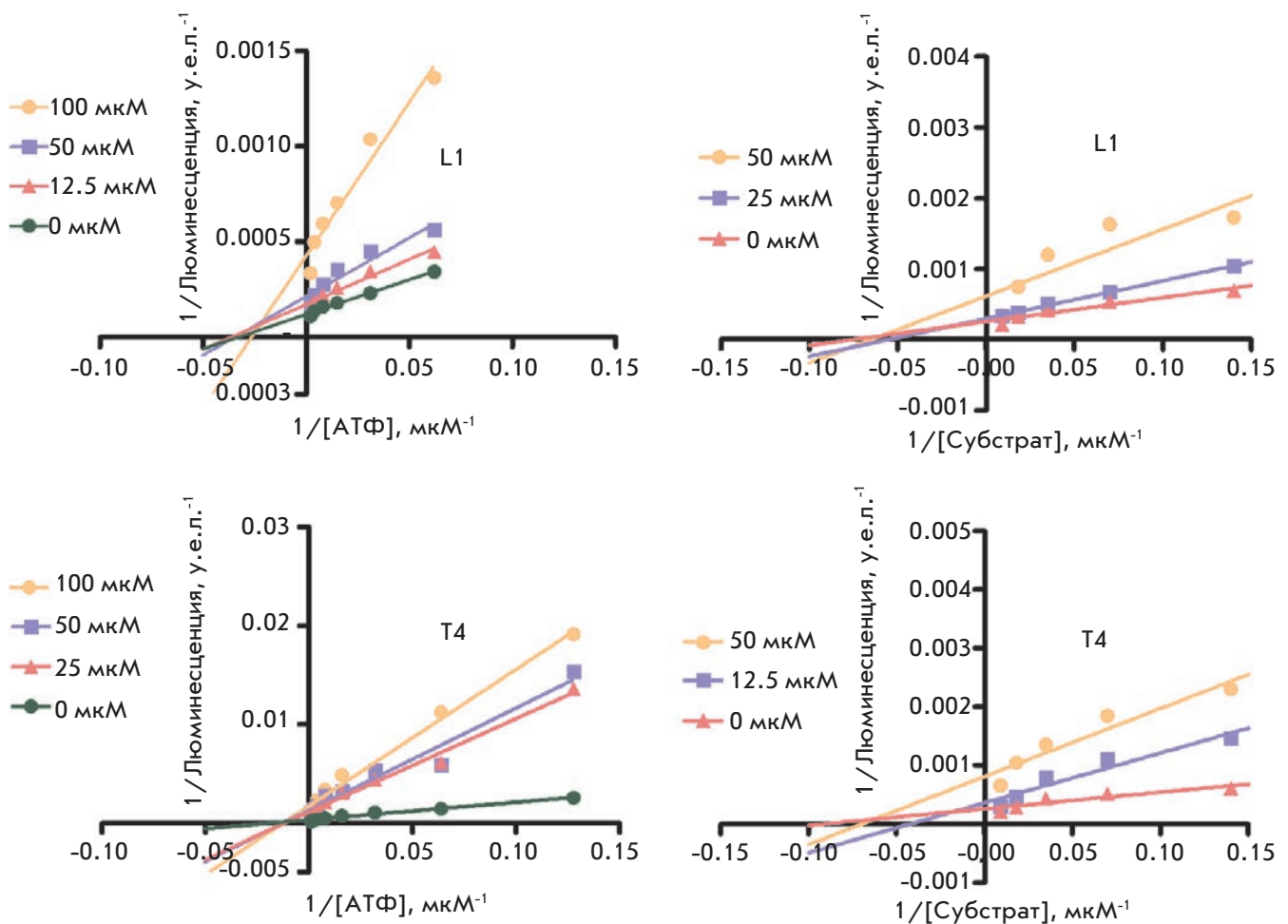


Рис. 5. Графики Лайнуивера–Берка для соединений L1 и T4

Изучение кинетики ферментативной реакции в присутствии ингибиторов

Из каждой группы произвольно отобрали по одному соединению (L1 и T4) для более подробного изучения механизма их действия (рис. 5). Согласно графикам Лайнуивера–Берка, оба ингибитора не конкурируют ни с АТФ, ни с субстратом за связывание с IGF1R. Так как процесс отбора потенциальных ингибиторов для первичного ВЭС предполагал, что соединения из L- и T-групп будут аллостерическими эффекторами, этот результат подтверждает правильность рабочих моделей. Сайт связывания соединений T-типа соотносится, скорее всего, с аллостерическим сайтом связывания индолалкиламинов, положенным в основу разработанной фармакофорной модели [15]. Этот сайт пространственно отделен от каталитического сайта фермента. Информация о сайте связывания соединений из L-выборки с киназой отсутствует. Некоторые прототипы L-группы, положенные в основу критериев формирования скрининговых выборок для данного исследования, также имеют АТФ-неконкурентный механизм ингибирования киназы [19]. Данные же о конкуренции этих соединений с субстратом на данный момент не найдены. Поскольку аллостерические сайты связывания обычно структурно менее консервативны, чем активные сайты киназы, аллостерический механизм ингибирования, обнаруженный у изученных нами соединений, расширяет возможности дальнейшей химической оптимизации селективности найденных ингибиторов.

Таким образом, описанная нами группа ингибиторов IGF1R соответствует всем стандартным требованиям, предъявляемым к перспективным фармакологически активным соединениям, обнаруженным в ходе поискового скрининга высокой производительности (хитам), – воспроизводимость и дозозависимость фармакологического ответа, приемлемые параметры ингибирования молекулярной мишени ($IC_{50} = 10\text{--}25\text{ мкМ}$) и селективность по отношению к родственным мишеням, отсутствие нежелательных с точки зрения медицинской химии структурных элементов, литературная новизна соединений и доступность синтетических путей для их модификаций. Кроме того, соединения проявляют свойства аллостерических ингибиторов, что было одной из целей скрининга. Обнаруженные нами в результате рационального, высокоэффективного скрининга две серии ингибиторов могут служить перспективными отправными точками для разработки новых терапевтических блокаторов активности IGF1R. ●

Авторы благодарят компанию Promega Corporation (Мэдисон, Висконсин, США) за предоставление тест-систем и реагентов для высокоэффективного поискового скрининга ингибиторов IGF1R, а также изучения их селективности и механизмов ингибирования. Авторы благодарят Джона Уотсона и Татьяну Рудую (Promega) за помощь и поддержку при проведении исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pollak M.N., Schernhammer E.S., Hankinson S.E. // Nat. Rev. Cancer. 2004. V. 4. P. 505–518.
- Pollak M. // Nat. Rev. Cancer. 2008. V. 8. P. 915–928.
- Khandwala H.M., McCutcheon I.E., Flybjerg A., Friend K.E. // Endocrine Rev. 2000. V. 21. № 3. P. 215–244.
- López-Calderero I., Sánchez Chávez E., García-Carbonero R. // Clin. Transl. Oncol. 2010. V. 12. P. 326–338.
- Buck E., Mulvihill M. // Expert. Opin. Invest. Drugs. 2011. V. 20. № 4. P. 605–621.
- Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Vigneri R. // Endocrine Rev. 2009. V. 30. № 6. P. 586–623.
- Pollak M. // Nat. Rev. Cancer. 2012. V. 12. P. 159–169.
- Buck E., Gokhale P.C., Koujak S., Brown E., Eyzaguirre A., Tao N., Rosenfeld-Franklin M., Lerner L., Chiu M.I., Wild R., et al. // Mol. Cancer Ther. 2010. V. 9. № 10. P. 2652–2664.
- Ludwig J.A., Lamhamedi-Cherradi S.-E., Lee H.-Y., Naing A., Benjamin R. // Cancers. 2011. V. 3. № 3. P. 3029–3054.
- Yee D. // JNCI J. Natl. Cancer. Inst. 2012. V. 104. № 13. P. 975–981.
- McMartin C., Bohacek R.J. // Comput.-Aided Mol. Des. 1997. V. 11. № 4. P. 333–344.
- Zhang J., Chung T.D., Oldenburg K.R. // J. Biomol. Screen. 1999. V. 4. P. 67–73.
- Lineweaver H., Burk B. // J. Am. Chem. Soc. 1934. V. 56. № 3. P. 658–666.
- Chuprina A., Lukin O., Demoiseaux R., Buzko A., Shivanyuk A.J. // Chem. Inf. Model. 2010. V. 50. P. 470–479.
- Heinrich T., Grodler U., Bottcher H., Blaukat A., Shutes A. // ACS Med. Chem. Lett. 2010. V. 1. P. 199–203.
- Munshi S., Kornienko M., Hall D.L., Reid J.C., Waxman L., Stirdivant S.M., Darke P.L., Kuo L.C. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 38797–38802.
- Li W., Favelyukis S., Yang J., Zeng Y., Yu J., Gangjee A., Miller W.T. // Biochem. Pharmacol. 2004. V. 68. P. 145–154.
- Warren G.L., Andrews C.W., Capelli A.M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H., Lindvall M., Nevins N., Semus S.F., Senger S., et al. // J. Med. Chem. 2006. V. 49. № 20. P. 5912–31.
- Steiner L., Blum G., Friedmann Y., Levitzki A. // Eur. J. Pharmacol. 2007. V. 562. № 1–2. P. 1–11.
- Li H., Totoritis R.D., Lor L.A., Schwartz B., Caprioli P., Jurewicz A.J., Zhang G. // Assay Drug Dev. Technol. 2009. V. 7. № 6. P. 598–605.
- Gable K.L., Maddux B.A., Penaranda C., Zavodovskaya M., Campbell M.J., Lobo M., Robinson L., Schow S., Kerner J.A., Goldfine I.D., et al. // Mol. Cancer Ther. 2006. V. 5. № 4. P. 1079–1086.
- Blum G., Gazit A., Levitzki A. // Biochemistry. 2000. V. 39. № 51. P. 15705–15712.
- Chene P., Hau J.-C., Blechschmidt A., Fontana P., Bohn J., Zimmermann C., De Pover A., Erdmann D. // Open Enz. Inhib. J. 2010. V. 3. № 1. P. 27–37.