

УДК 544.165+615.262.1+615.277.3+615.31

**ИНГИБИРОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНОЙ ЭЛАСТАЗЫ И КАТЕПСИНА G
КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ПСОРИАЗА:
ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ К РАЗРАБОТКЕ
МИШЕНЬ-СПЕЦИФИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

**М. Ю. Красавин¹, М. А. Гуреев^{2,3}, А. В. Гарабаджиу^{2,*}, А. Ю. Пашкин⁴,
А. С. Жуков⁴, В. Р. Хайрутдинов⁴, А. В. Самцов⁴, академик РАН **В. И. Швец**^{2,5,6}**

Поступило 08.04.2019 г.

Терапия псориаза остаётся крайне актуальной областью современного драгдизайна ввиду необходимости снижения спектра побочных эффектов, присущих актуальным, системным методам лечения. Установлено, что в развитии псориаза ключевыми агентами являются сериновые протеазы: нейтрофильная эластаза 1 (HNE1) и катепсин G (CatG). Данные о структуре представленных мишеней легли в основу концепции применения методов молекулярного моделирования с целью идентификации новых ингибиторов, подавляющих активность данных белков. Итогом проделанных работ является группа высокоприоритетных соединений, обладающих бинарным сродством, направленных на подавление псориазных процессов, индуцируемых в начальной стадии рассматриваемыми сериновыми протеазами.

Ключевые слова: виртуальный скрининг, CatG, ELANE, катепсин G, псориаз, мультитаргетность, аутоиммунные заболевания.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524874455-459>

Псориаз — распространённое хроническое мультифакториальное иммуноопосредованное воспалительное заболевание кожи и суставов. Системно действующие лекарственные вещества, несмотря на высокую эффективность, обладают рядом серьёзных побочных эффектов, ограничивающих их назначение. Создание препарата, избирательно подавляющего специфичные для псориаза медиаторы воспаления на местном уровне, позволит избежать недостатков, присущих системной терапии.

Пуск аутоиммунного ответа при псориазе происходит вследствие гиперактивации цитокинов семейства IL-36 нейтрофильными сериновыми протеазами: агонистов IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ и антагониста IL-36Ra [1]. IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ изначально неактивны. Для их активации необходим протеолитический процессинг [2], возможный при участии

сериновых протеаз нейтрофильных гранулоцитов: нейтрофильной эластазы, катепсина G, протеиназы 3 [3, 4]. Активированные цитокины семейства IL-36 взаимодействуют с рецептором IL-36R, на поверхности кератиноцитов, дендритных клеток и “наивных” T-лимфоцитов. В результате происходит активация митогенактивируемых протеинкиназ (MAPK), ядерного фактора κ B (NF- κ B), усиление транскрипции и синтеза иммунокомпетентными клетками провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1, IL-6, IL-17) [5]. Увеличение экспрессии агониста IL-36 γ в коже встречается только у больных псориазом [6]. Это отличает его от других провоспалительных цитокинов, присутствующих при любом неспецифическом воспалении и аутоиммунных процессах [7].

Уровень сериновых протеаз в коже больных псориазом значительно выше, чем у здоровых людей (нейтрофильной эластазы в 21 раз, катепсина G в 11,5 раза). Экспрессия нейтрофильной эластазы в прогрессирующий период в 3,2 раза, а катепсина G в 16,7 раза превышает значения в стационарном периоде болезни. Таким образом, многократное увеличение уровня сериновых протеаз у больных прогрессирующим псориазом обуславливает их участие в инициации воспалительной реакции.

Полученные сведения позволяют рассматривать CatG и HNE1 как приоритетные мишени, приближая

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

² Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

⁴ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

⁵ МИРЭА — Российский технологический университет, Москва

⁶ Научно-исследовательский институт общей патологии и патологической физиологии, Москва

*E-mail: gar-54@mail.ru

действие таргетной молекулы к началу развития иммунного ответа и подавляя его на ранней стадии. Использование методов компьютерного молекулярного дизайна — актуальный подход к поиску лигандов протеаз CatG и HNE1 [8]. С точки зрения аминокислотного состава, вторичной структуры, гидрофобности активные сайты CatG и HNE1 гомологичны на 45%, что позволяет предположить реализуемость концепта мультитаргетного ингибитора [9, 10].

Стратегия поиска лигандов опирается на метод докинга, где симулируется взаимодействие с обобщённой моделью обоих белков. Для HNE1 и CatG рассматривается область, ограниченная идентичными аминокислотами: Gly193, Asp 194, Ser195, Phe215, Gly196, Ser214, Ile212, Ala55. Результаты ранжируются по двум показателям: укладка в активной полости, значение оценочной функции. Первый даёт оценку идентичности взаимодействия с исходным лигандом в активной полости, второй — параметрическая оценка связывания в виде энергии взаимодействия. В данном случае используется скоринг-функция GlideScore [11].

Препятствие, осложнившее подбор лигандов со сродством к HNE1 и CatG, — различия электростатических и гидропатических характеристик активных полостей. На рис. 1 показано, что у HNE1 выражены характеристики гидрофобности. В частности, в активном сайте мы наблюдаем Phe192, создающий гидрофобный зонтик над активной полостью — вкпе с His57 и группой других гидрофобных аминокислот (Leu33/Ile151/Phe215). Следовательно, лиганды HNE1 должны содержать на своей периферии гидрофобные группы, обеспечивающие мо-

лекулярное распознавание мишени. Такова молекулярная топология одного из известных обратимых ингибиторов нейтрофильной эластазы [12], как приведено в диаграмме на рис. 2, большинство контактов гидрофобные и лишь отчасти — полярные. Дополнительный фактор, повышающий мишень-специфичность, — стекинг-взаимодействие скаффолда и His57.

В случае с CatG (рис. 1) наблюдается противоположная картина: активный сайт изобилует положительно заряженными участками (Lys192/Arg143/Gln96), полость в центре заряжена отрицательно (Glu226), свойства гидрофобности снижены.

Таким образом, для ингибирования HNE1 важны гидрофобные лиганд-белковые взаимодействия, а для лигандов CatG — контраст заряда на поверхности лиганда и в меньшей степени — гидрофобность.

Данный факт подтверждается результатами виртуального скрининга библиотеки пиридоновых производных, структурно схожих с лигандом на рис. 2. Докинг молекул в активную полость CatG не дал решений с приемлемыми показателями энергии связывания, в то время как с HNE1 таких проблем не возникло и ранжирование виртуальных структур по предсказанной энергии связывания прошло успешно, с последующим выводом перечня наиболее приоритетных структур.

Альтернативой стало использование ковалентных ингибиторов, построенных по принципу сериновой ловушки: взаимодействие гидроксиметильного остатка Ser195 с электрофильной компонентой ингибитора.

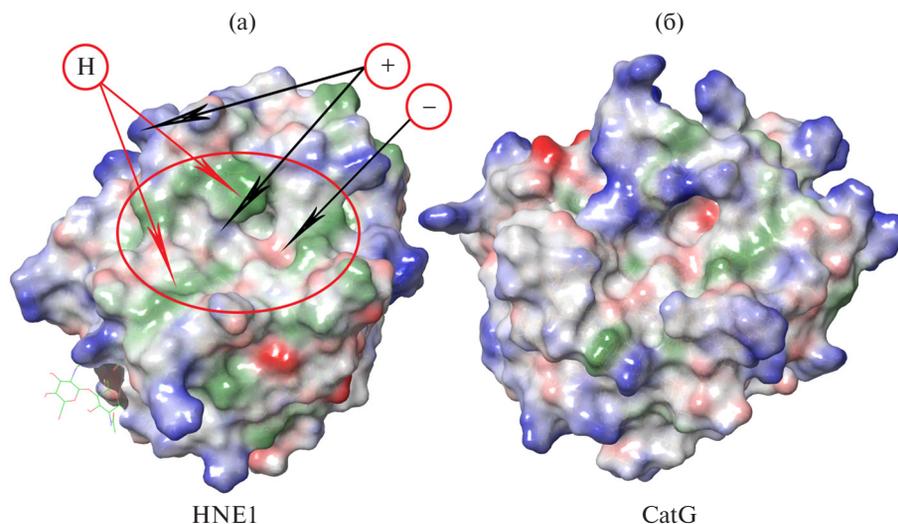


Рис. 1. Локализация зарядов и гидрофобных зон на поверхности белков HNE1 (а) и CatG (б). Зелёный — гидрофобные (H), красный — отрицательно заряженные (-), синий — положительно заряженные (+) области структуры белка.

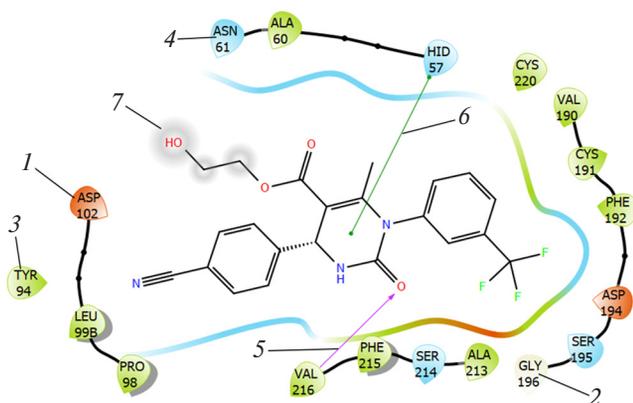


Рис. 2. Диаграмма взаимодействия нековалентного ингибитора с нейтрофильной эластазой HNE1. 1 — отрицательно заряженный участок, 2 — глицин, 3 — гидрофобное взаимодействие, 4 — полярное взаимодействие, 5 — водородная связь, 6 — стейкинг-взаимодействие, 7 — взаимодействие с растворителем.

Для проведения скрининга использована библиотека из $\sim 3 \cdot 10^6$ структур, построенная на двух скаффолдах, способных взаимодействовать по одной из вышеупомянутых реакций с сериновым основанием Ser195 активного центра CatG и HNE1. Синтез ингибиторов реализуется четырёхкомпонентной реакцией Уги [13] (рис. 3). Данная реакция позволяет получать обширные ряды разнообразно замещённых диамидных производных, схожих по структуре с дипептидами, путём варьирования четырёх реагентов в комбинаторном формате. Сериновая ловушка размещена в аддуктах, получаемых по реакции Уги путём использования в последней в качестве кар-

боксильной компоненты пировиноградной либо β -бензоилакриловых кислот. В первом случае ковалентное связывание с остатком серина ожидается за счёт образования полуацетального аддукта по электрофильной кетогруппе, во втором — благодаря присоединению по Михаэлю.

Генерация комбинаторного пространства на основе электрофильных скаффолдов проведена в модуле CombiGlide. Для каждой варьируемой группы R_i использована библиотека из ~ 30 вариантов заместителей (итоговый объём библиотеки $3 \cdot 10^6$ структур). Все библиотеки предварительно обработаны с помощью набора фильтров, исключающих структуры, относящиеся к PAINS [14]. Конверсия структур ингибиторов в трёхмерную форму проведена в программе LigPrep. Таутомерные формы созданы при наличии таковой возможности в структурах. Модели белков CatG (PDB: 1AU8) и HNE1 (PDB: 3Q77) подготовлены в ProteinPrepWizard [15].

Сайты CatG и HNE1 совмещены в трёхмерном пространстве с целью дифференцировки различий структуры активных полостей. Координаты областей докинга установлены исходя из параметров лигандов, описанных в структурах белков CatG (PDB: 1AU8) и HNE1 (PDB: 3Q77). Ввиду присутствия малых молекул в указанных кристаллических структурах на их основе рассчитаны ограничения докинга, устанавливающие принудительное позиционирование отдельных молекулярных фрагментов, отвечающих за сайтоспецифичность, исходя из паттернов

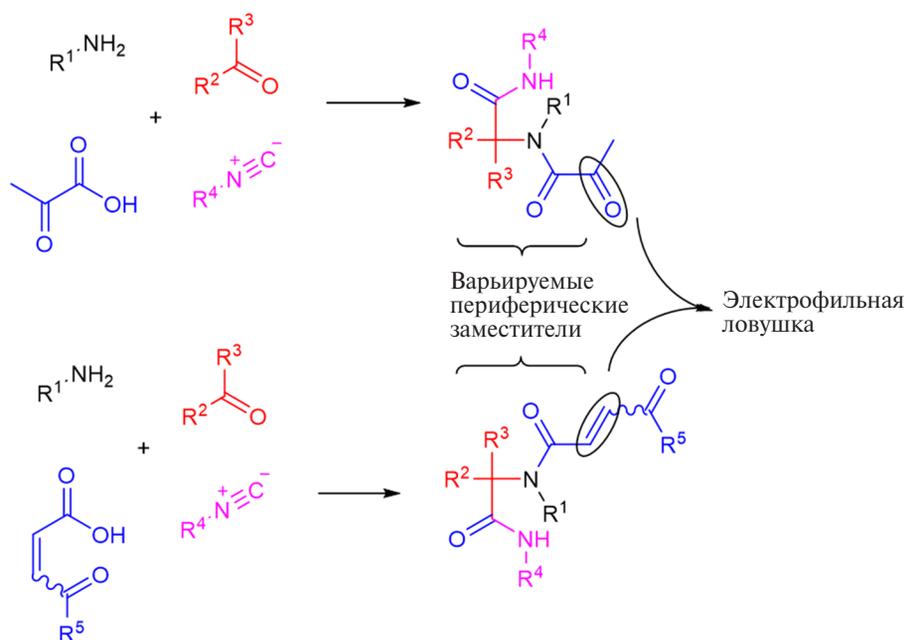


Рис. 3. Дизайн ковалентных ингибиторов с привлечением реакции Уги (обведён фрагмент, реагирующий с гидроксилом серина).

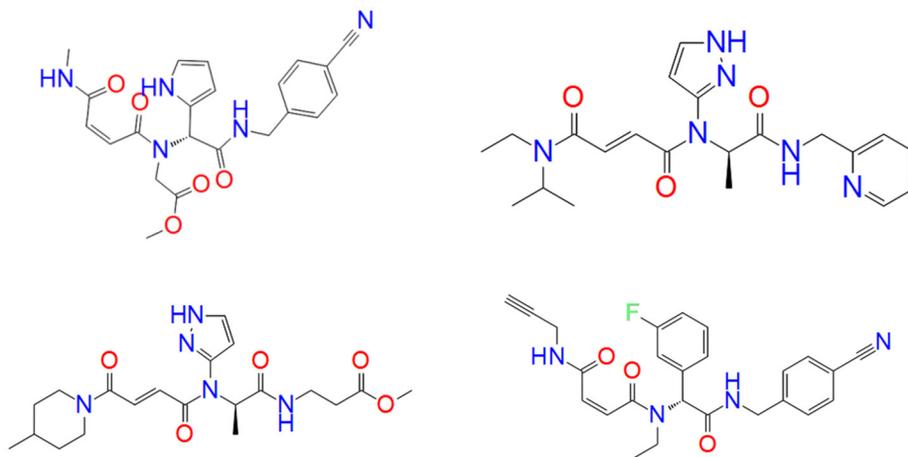


Рис. 4. Примеры структур-кандидатов с прогнозируемым аффинитетом к HNE1 и CatG.

Таблица 1. Критерии отбора потенциальных хитов

Модель (PDB ID)	Аффинность (GlideScore)	Связывание	Реакция
HNE1 (1B0F)	-7,55±0,80	Ковалентное	Михаэля
CatG (1AU8)	-7,63±0,43	Ковалентное	Михаэля

гидрофобности. Размер области докинга определён согласно размерам лиганда с прибавкой буферной зоны в 7 Å. Для ковалентного докинга целевой участок присоединения Ser195, установлены паттерны для реакции Михаэля с Ser195. Согласно референсным данным, полученным исходя из результатов докинга структур с экспериментально разрешённым аффинитетом к HNE1 и CatG, критериям отбора (представленным в табл. 1) отвечало ~30 тыс. структур. Среди них для синтеза и биологических испытаний отобрано 58 наиболее представительных молекул (отдельные примеры приведены на рис. 4).

Для оценки биоактивности структур проведена наработка рекомбинантного белка IL-36, его процессинг исследуемыми протеазами в присутствии тестируемого ингибитора. Полученным продуктом обрабатывали клетки HeLa (IL-36R) и оценивали уровень IL-6, IL-8, CXCL-1 методом твердофазного иммунофлуоресцентного анализа. Также производилась оценка цитотоксичности соединений-кандидатов при помощи системы Xcelligence ("Roche", США). Предварительные результаты демонстрируют наличие терапевтического эффекта без острой цитотоксичности.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РАЗРАБАТЫВАЕМЫХ ПРЕПАРАТОВ

Дополнительный фактор, облегчающий оценку биологического ответа псориатических моделей человека и мышей на исследуемые структуры, — использование метода местного нанесения. Таким

образом, игнорируется фактор общесистемного воздействия и, как следствие, снижается риск развития побочных эффектов. В настоящее время предварительный эксперимент по оценке биологической активности демонстрирует приоритетность ряда ковалентных ингибиторов (рис. 4). Однако их аффинность к CatG ниже, чем к HNE1, что ставит задачу дополнительной оптимизации выделенного класса структур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gabay C., Towne J.E. Regulation and Function of Interleukin-36 Cytokines in Homeostasis and Pathological Conditions // *J. Leukocyte Biol.* 2015. V. 97. № 4. P. 645–652.
2. Sullivan G.P., Davidovich P.B., Sura-Trueba S., Belotckovskaya E., Henry C.M., Clancy D.M., Zinoveva A., Mametnabiev T., Garabadzhiu A.V., Martin S.J. Identification of Small-Molecule Elastase Inhibitors as Antagonists of IL-36 Cytokine Activation // *FEBS Open Bio.* 2018. V. 8. № 5. P. 751–763.
3. Nero T.L., Parker M.W., Morton C.J. Protein Structure and Computational Drug Discovery // *Biochem. Soc. Trans.* 2018. V. 46. № 5. P. 1367–1379.
4. Clancy D.M., Sullivan G.P., Moran H.B.T., Henry C.M., Reeves E.P., McElvaney N.G., Lavelle E.C., Martin S.J. Extracellular Neutrophil Proteases Are Efficient Regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 Cytokine Activity but Poor Effectors of Microbial Killing // *Cell. Repts.* 2018. V. 22. № 11. P. 2937–2950.
5. Henry C.M., Sullivan G.P., Clancy D.M., Afonina I.S., Kulms D., Martin S.J. Neutrophil-Derived Proteases Escalate Inflammation through Activation of IL-36 Family Cytokines // *Cell. Repts.* 2016. V. 14. № 4. P. 708–722.
6. Dietrich D., Gabay C. Inflammation: IL-36 Has Pro-inflammatory Effects in Skin But Not in Joints // *Nature Revs. Rheumatol.* 2014. V. 10. № 11. P. 639–640.
7. D'Erme A.M., Wilsmann-Theis D., Wagenpfeil J., Holzfel M., Ferring-Schmitt S., Sternberg S., Wittmann M.,

- Peters B., Bosio A., Bieber T., Wenzel J.* IL-36gamma (IL-1F9) Is a Biomarker for Psoriasis Skin Lesions // *J. Investigative Dermatology*. 2015. V. 135. № 4. P. 1025–1032.
8. *Tabeshpour J., Sahebkar A., Zirak M.R., Zeinali M., Hashemzaei M., Rakhshani S., Rakhshani S.* Computer-Aided Drug Design and Drug Pharmacokinetic Prediction: A Mini-Review // *Current Pharmaceutical Design*. 2018. V. 24. № 26. P. 3014–3019.
9. *Hooshdaran B., Kolpakov M.A., Guo X., Miller S.A., Wang T., Tilley D.G., Rafiq K., Sabri A.* Dual Inhibition of Cathepsin G and Chymase Reduces Myocyte Death and Improves Cardiac Remodeling after Myocardial Ischemia Reperfusion Injury // *Basic Res. Cardiol*. 2017. V. 112. № 6. P. 62.
10. *McLoed A.G., Sherrill T.P., Cheng D.S., Han W., Saxon J.A., Gleaves L.A., Wu P., Polosukhin V.V., Karin M., Yull F.E., Stathopoulos G.T., Georgoulas V., Zaynagetdinov R., Blackwell T.S.* Neutrophil-Derived IL-1beta Impairs the Efficacy of NF-kappaB Inhibitors against Lung Cancer // *Cell Repts*. 2016. V. 16. № 1. P. 120–132.
11. *Repasky M.P., Shelley M., Friesner R.A.* Flexible Ligand Docking with Glide // *Current Protocols in Bioinformatics*. 2007. V. 8. P. 8–12.
12. *Nussbaum F., Karthaus D., Anlauf S., Klein M., Li V.M.-J., Meibom D., Lustig K., Schamberger J.* PCT Int. Appl. WO2009080199 // *Chem. Abstr*. 2009. V. 151. P. 101–192.
13. *Ilyin A., Kysil V., Krasavin M., Kurashvili I., Ivachchenko A.V.* Complexity-Enhancing Acid-Promoted Rearrangement of Tricyclic Products of Tandem Ugi 4CC/Intramolecular Diels–Alder Reaction // *J. Org. Chem*. 2006. V. 71. № 25. P. 9544–9547.
14. *Baell J.B., Holloway G.A.* New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays // *J. Med. Chem*. 2010. V. 53. № 7. P. 2719–2740.
15. *Verdonk M.L., Berdini V., Hartshorn M.J., Mooij W.T., Murray C.W., Taylor R.D., Watson P.* Virtual Screening Using Protein-Ligand Docking: Avoiding Artificial Enrichment // *J. Chem. Inform. and Computer Sci*. 2004. V. 44. № 3. P. 793–806.

INHIBITION OF NEUTROPHIL ELASTASE AND CATHEPSIN G AS A NEW APPROACH TO THE TREATMENT OF PSORIASIS: FROM FUNDAMENTAL BIOLOGY TO DEVELOPMENT OF NEW TARGET-SPECIFIC DRUGS

**M. Y. Krasavin¹, M. A. Gureev^{2,3}, A. V. Garabadzhiu², A. Y. Pashkin⁴,
A. S. Zhukov⁴, V. R. Khairutdinov⁴, A. V. Samtsov⁴, Academitian of the RAS V. I. Shvets^{2,5,6}**

¹ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russian Federation

² Saint-Petersburg State Technology Institute (Tech. Univ.), Saint-Petersburg, Russian Federation

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

⁴ S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russian Federation

⁵ Federal State Budget Educational Institution of Higher Education

“MIREA — Russian Technological University”, Moscow, Russian Federation

⁶ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Received April 8, 2019

Psoriasis therapy remains extremely relevant area of modern drug design, due to necessity of adverse reactions reduction, inherent for actual methods of therapy. It has been established that two of serine proteases are key agents in psoriasis development: neutrophil elastase 1 (HNE1) and cathepsin G (CatG). Collected molecular data for presented targets forms the basis of molecular modeling strategy for search and identification of new target-specific inhibitors. The result of work is a group of high-priority small-molecule compounds with double-targeted affinity with ability to suppress pro-psoriatic processes, induced by observed serine proteases in the initial stage of disease.

Keywords: Virtual screening, CatG, ELANE, Cathepsin G, psoriasis, multitarget structures, autoimmune diseases.