

2014

БИОМЕДИЦИНА

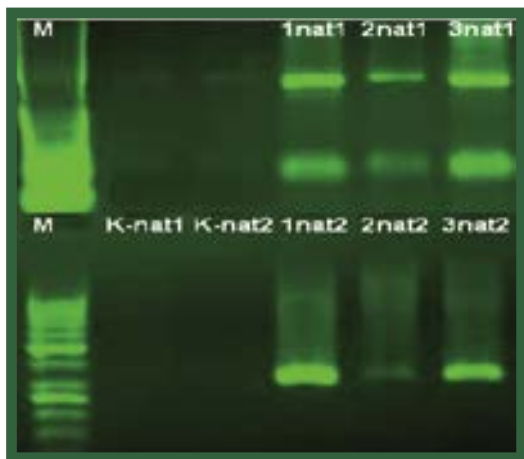
MEDICINE  
ISSN 2074-5982

2014

2

# БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
БИОМЕДИЦИНСКИХ  
ТЕХНОЛОГИЙ  
ФМБА РОССИИ

## Поиск синтетических антикоагулянтов – ингибиторов сериновых протеаз: сочетание *in silico* и *in vitro* методов

Н.И. Баранова, П.А. Алексеева, К.С. Чистяков, В.Н. Юсковец,  
С.В. Оковитый, А.В. Бурякина, Е.В. Федорова

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

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

В работе представлен модельный подход, основанный на интеграции расчётной теории (*in silico*-экспериментов) и экспериментов, поставленных *in vitro* к поиску, оптимизации и созданию новых молекул, обладающих сродством к семейству сериновых протеаз.

Авторы выражают признательность компании Novartis AG за помощь в проведении экспериментов *in vitro* в рамках программы «Novartis in-kind collaborations», а также персональную благодарность их научным сотрудникам-биологам Ulrich Hassiepen и Gabriela Monnet.

**Ключевые слова:** количественные соотношения структура-активность (QSAR), молекулярный докинг, ингибиторы сериновых протеаз, каскад свертывания, высокопроизводительный скрининг.

### Цель

Применение комбинированного подхода, основанного на сочетании *in silico* и *in vitro* методов при поиске потенциальных ингибиторов сериновых протеаз.

### Введение

Сердечно-сосудистые заболевания и их осложнения занимают первое место в мире среди причин смерти людей. Одним из основных компонентов схем лечения ишемической болезни сердца, острого коронарного синдрома, тромбозов при травмах, трансплантации, крупных хирургических вмешательствах является антикоагулянтная терапия.

Среди мишеней для действия потенциальных антикоагулянтов одними из наиболее перспективных являются

сериновые протеазы системы свертывания крови. В клинической практике широко применяются пероральные ингибиторы Ха фактора (ривароксабан, аписабан) и Па фактора (дабигатрана этексилат). Интерес также представляет поиск новых антикоагулянтов в ряду ингибиторов таких сериновых протеаз, как фактор VIIa, IXa, XIa, XIIa, калликреин.

Сочетание *in silico* и *in vitro* методов на ранних этапах скрининга активных молекул значительно повышает результативность поиска новых лекарственных средств. [1]. Поскольку методы прогнозирования требуют подтверждения их достоверности с помощью исследования на биообъектах, например, с помощью высокопроизво-

дительного скрининга на изолированных ферментах [2]. Совместное использование хемоинформатических и биологических методов скрининга позволяет снизить расходы на синтетические и аналитические исследования, так как дает возможность исследовать соединения уже на этапе виртуальных молекул.

В настоящей работе использован рациональный модельный подход, основанный на интеграции расчётной теории и эксперимента *in vitro* для поиска новых синтетических ингибиторов сериновых протеаз каскада свертывания.

### Материалы и методы

#### Объекты исследования

Объектами исследования служили органические соединения, синтезированные на кафедрах неорганической химии (Баранова Н.С., заведующий кафедрой - профессор Москвин А.В.) и органической химии (Юсковец В.Н., заведующий кафедрой – профессор Яковлев И.П.), относящиеся к производным пиримидинов, арил- и алкиламидинов и 1,3,4-оксадиазолов.

#### Дизайн эксперимента

Компьютерное выявление активных структур проводили, используя комбинированный *in silico/in vitro* подход, включавший следующие этапы:

- препроцессинг собственной базы соединений - удаление структур, не удовлетворяющих правилу Липинского (drug likeness) [3];
- постпроцессинг соединений с использованием неспецифических моделей активностей соединений на базе PASS online и их токсичности на базе GUSAR online;

- скрининг потенциальных лигандов на специфическую активность (ингибирование IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa факторов и калликреина) с помощью QSAR-моделей;
- молекулярный докинг структур с оценкой значения скоринг-функции и характера взаимодействия белок-лиганд;
- высокопроизводительный скрининг *in vitro* на изолированных компонентах свертывания крови человека (факторы свертывания IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, калликреин) с помощью хромогенных субстратов;
- выбор соединений-лидеров.

#### Исследование *in silico*

Для прогнозирования профилей биологической активности в виде MOL-файлов были представлены структурные формулы 1104 химических соединений, относящиеся к производным пиримидинов, арил- и алкиламидинов и 1,3,4-оксадиазолов.

Препроцессинг баз данных был основан на допустимых значениях оценок физико-химических свойств (так называемый drug-likeness) - липофильности, допустимому интервалу молекулярной массы, количеству доноров и акцепторов водородной связи, значению молярной рефракции (правило Липинского), а также числу свободных ротационных связей.

Постпроцессинг осуществляли, анализируя предсказанные спектры активности и токсичности соединений с использованием Интернет-ресурсов PASS-online и GUSAR-online (Pharmaexpert.ru). Соединения отбрасывали в том случае, если  $P_a > P_i$

для нежелательных эффектов (мутатогенность, тератогенность, канцерогенность, раздражающее действие), а также расчётное значение  $LD_{50}$  составляло менее 15 мг/кг для перорального введения.

На следующем этапе проводили скрининг потенциальных лигандов на специфическую активность с помощью QSAR-моделей в программе GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships), созданной с использованием среды программирования Delphi 5.0 Professional. Нами были созданы модели количественного соотношения между химической структурой и значением полуингибирующей концентрации на следующие мишени: IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa факторы свертывания и калликреин. Устойчивость и репрезентативность моделей оценивали по объёму ( $V > 5$ ) и значениям коэффициентов корреляции ( $R^2 > 0,7$  и  $Q^2 > 0,6$ ).

Молекулярный докинг проводили, используя программу предсказания белок-лигандных взаимодействий FlexX [4]. Критерием оценки взаимодействия между исследуемыми 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 агонистами или антагонистами.

#### *Исследование in vitro*

В экспериментах были использованы IIa и Xa факторы (Hematologic Technolo-

gies Inc., США), фактор VIIa (Novo Nordisk Pharma AG, Швейцария), факторы XIa, XIIa и калликреин плазмы (Kordia, Нидерланды), фактор IXa (Cellscience, США).

Все растворы белков и пептидов хранили в силиконизированных пробирках (Life Systems Design, Швейцария). Растворы исследуемых соединений переносили в 384-луночные планшеты с общим объемом лунки 25,25 мкл (Labsystems Oy, Финляндия) с помощью CyBi-Hummingwell дозатора (CyBio AG, Германия). Растворы ферментов и субстратов добавляли в планшеты с помощью CyBi-well 384-канального дозатора (CyBio AG, Германия).

Измерение проводили при комнатной температуре в 384-луночных планшетах. Исследуемые вещества растворяли в смеси ДМСО-вода в соотношении 9:1. Предварительно в каждую лунку помещали по 250 нл раствора исследуемого вещества и 12,5 мкл раствора фермента в буфере. После преинкубации в течение 70 мин при комнатной температуре реакцию запускали добавлением 12,5 мкл раствора соответствующего субстрата. Влияние вещества на активность фермента определяли как линейную часть логарифмической кривой и фиксировали через 1 час. Конечные концентрации исследуемых веществ в растворе составляли от 1 нМ до 100 мкМ.

Измерение проводили на планшетном спектрофотометре Ultra reader (TECAN, Швейцария). Для возбуждения флуоресценции красителя Rh110 использовали фильтр с длиной волны 485 нм, испускаемое свечение регистрировали при длине

волны 535 нм. Для повышения соотношения сигнал-шум использовали дихроические зеркала. Все флуорофоры возбуждали тремя вспышками на одно измерение.

Значения  $IC_{50}$  рассчитывали как отношение процента ингибирования к ингибирующей концентрации по следующей формуле:

$$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (x / IC_{50})^p),$$

где  $Y$  – процент ингибирования при ингибирующей концентрации  $x$

$A1$  – минимальное значение ингибирования

$A2$  – максимальное значение ингибирования

$p$  – коэффициент Хилла

Расчёт и обработку кривых производили методом нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Helios.

Таблица 1

Условия проведения анализа

Мишень	Фермент	Субстрат	Концентрация фермента, нМ	Концентрация субстрата, мкМ	Состав буферного раствора
Фактор IIa	Тромбин человека (фактор IIa)	Bz-Val-Pro-Arg-Rh110-D-Pro	0,4	0,5	50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4
Фактор VIIa	Фактор VIIa, человека, рекомбинантный	dPhe-Pro-Arg-Rh110-D-Pro	15	0,5	100 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, 5 мМ CaCl <sub>2</sub> , 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4
Фактор IXa	Нативный фактор IXa, очищенный, из плазмы человека	dLeu-Gly-Arg-Rh110-D-Pro	20	0,5	50 мМ Трис, 125 мМ NaCl, 5 мМ CaCl <sub>2</sub> , 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4
Фактор Xa	Фактор Xa человека	Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-Rh110-γGlu	0,625	0,5	50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4
Фактор XIa	Фактор XIa человека	dLeu-Pro-Arg-Rh110-γGlu	0,5	0,5	50 мМ HEPES, 125 мМ NaCl, 5 мМ CaCl <sub>2</sub> , 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4
Фактор XIIa	Фактор XIIa человека	dPro-Phe-Arg-Rh110-γGlu	1,5	0,5	50 мМ HEPES/NaOH, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,8
Калликреин	Калликреин плазмы человека	dPro-Phe-Arg-Rh110-γGlu	0,025	0,5	50 мМ Hepes/HCl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,8

Примечание: HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота, CHAPS - 3-[(3-холамидопропил)диметиламмония]-1-пропансульфонат.

## Результаты и их обсуждение

Исходная база соединений содержала 1104 объекта, принадлежащих к классам гетеро- и алициклических органических соединений – производных, арил- и алкиламидинов и 1,3,4-оксадиазолов. Выявления активных структур компьютерными методами проводили, применяя комбинированный *in silico/in vitro* подход, который включал в себя несколько этапов (рис. 1).

После первичного скрининга с использованием правила Липинского было отобрано 48 соединений. Пример

процедуры препроцессинга представлен в таблице 2.

Соединение с шифром 122.NB.0114 не удовлетворяет правилу Липинского по параметру «число акцепторов водородной связи», которое не должно превышать 5. Анализ данных постпроцессинга позволил отсеять потенциально токсичные вещества [5]. Пример данных постпроцессинга представлен в таблице 3.

В таблице указаны два соединения, отсеянные на этапе постпроцессинга: с шифрами 247.NB.0114 и 018.NB.0114,

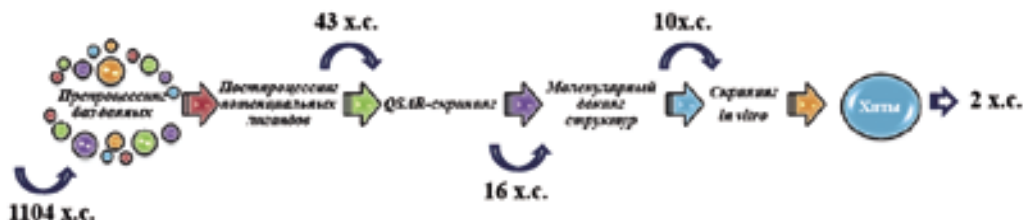


Рис. 1. Блок-схема этапов комбинированного *in silico/in vitro* подхода.

Таблица 2

### Пример анализа данных при препроцессинге

Вещество	Число свободных ротационных связей	logP	Число доноров водородной связи	Число акцепторов водородной связи	Молярная масса, г/моль	Молярная рефракция, см <sup>2</sup>
247.NB.1213	1	3,82	1	3	247,1	57,3
122.NB.0114	2	0,875	1	6	223,2	54,796
093.NB.0114	2	2,52	2	3	194,2	49,4

Таблица 3

### Пример анализа данных при постпроцессинге

Вещество	LD <sub>50</sub> GUSAR, мг/кг, крысы п/о	Вероятность возникновения нежелательных эффектов PASS, P <sub>2</sub> /P <sub>i</sub>			
		Мутагенность	Канцерогенность	Тератогенность	Раздражающее действие
247.NB.0114	1514	-	-	-	0,470/0,025
122.EV.0114	1320	-	-	-	-
018.NB.0114	302.4	0,334/0,04	0,415/0,003	0,230/0,120	-

не удовлетворяющие по токсикологическим свойствам. В итоге, по результатам неспецифического постпроцессинга были выбраны 43 вещества.

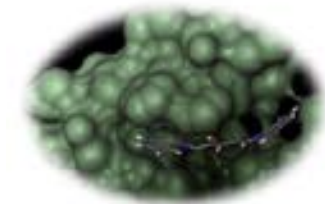
Таблица 4

**Прогностические результаты  
полуингибирующей концентрации на Ха  
фактор для некоторых соединений**

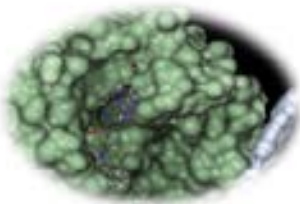
Объект	IC <sub>50</sub>
931.NB.1213	3,04·10 <sup>-6</sup>
105.NB.1213	1,11·10 <sup>-4</sup>
247.NB.1213	2,05·10 <sup>-6</sup>
093.NB.0114	6,50·10 <sup>-6</sup>
177.VY.1213	1,2·10 <sup>-9</sup>
277.VY.1213	5,6·10 <sup>-8</sup>

Ранее было показано, что пороговым значением для отбора соединений на указанных моделях является IC<sub>50</sub> больше 1·10<sup>-5</sup>. Поэтому по результатам GUSAR-анализа на специфические мишени для дальнейшего молекулярного докинга отобрали 16 соединений.

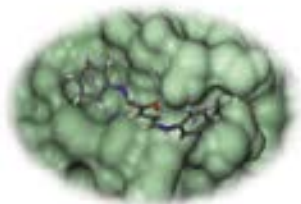
Для всех исследуемых соединений, при проведении молекулярного докинга, значения оценочной функции (ОФ) было удовлетворительно и приближалось к таковому для соединений сравнения (дабигатрана этексилат) (табл.5). Примеры образования белок-лигандных комплексов отобрали соединения с мишенями представлены на рисунке 2.



**FXIIa**



**FXa**



**IIa (тромбин)**

Рис. 2. Белок-лигандные комплексы.

Таблица 5

**Взаимодействие веществ с  
характеристическими аминокислотами  
активного центра тромбина**

Аминокислоты	Соединение сравнения – дабигатран (О.Ф. = -25 ккал/моль)				
	247.NB.1213 (О.Ф. = -24 ккал/моль)	178.NB.1213 (О.Ф. = -23 ккал/моль)	152.EK.0713 (О.Ф. = -20 ккал/моль)		
His57	+	-	+	-	
Trp215	+	-	-	-	
Gly216	+	+	+	+	
Gly219	+	+	+	+	
Glu192	+	+	+	-	
Leu99	+	+	-	+	
Trp60D	+	+	-	-	

По результатам молекулярного докинга отобрали 10 соединений, продемонстрировавших связывание более чем с 50% ключевых аминокислот. Отобранные по результатам *in silico* подхода химические соединения далее были отправлены на скрининг *in vitro*. Два соединения **177.VY.1213** и **277.VY.1213** показали неспецифическую активность в отношении сериновых протеаз каскада свертывания, при этом наиболее выра-

женное влияние наблюдали на энзиматическую функцию XIIIa фактора. Тогда как соединения из класса 1,3,4-оксадиазолов оказались неактивны, а одно из веществ, наоборот, проявило индукторное влияние на активность XIIIa фактора свертывания (табл. 6).

Таким образом, по результатам комбинированного *in silico/in vitro* подхода было отобрано два соединения (**177.VY.1213** и **277.VY.1213**), перспективных для дальнейшей оптимизации (hit to lead optimization), расширения и идентификации соединений значительно более активных, чем **177.VY.1213** и **277.VY.12**. В отношении 8-ми соединений из класса 1,3,4-оксадиазолов, оказавшихся неактивными в результате *in vitro* скрининга, требуется эксперимен-

тальная проверка их активности *in vivo* с целью исключения ложноотрицательного результата, полученного в результате применения *in silico* метода.

### Выводы

Проделанная работа является примером интеграции расчётной теории *in silico*-экспериментов и экспериментов, поставленных на *in vitro*, позволявшая идентифицировать биологически активные молекулы по отношению к ферментам из класса сериновых протеаз. С целью уменьшения процента ложноположительных и исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется дополнять использованный комбинированный подход данными *in vivo*-экспериментов.

Таблица 6  
Значение полуингибирующих концентраций ведущих соединений

Соединение	Фактор VIIa			Фактор IXa			Фактор Xa			Фактор XIa			Фактор XIIa			Калликреин			Тромбин (фактор IIa)		
	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования
112.NB.1213	>100	0	-1,4	>100	0	2,1	>100	0	-1,6	>100	0	0,7	>100	0	2,7	>100	0	-2,1	>100	0	1,3
117.VY.1213	>100	0	-0,3	>100	0	-5,5	>100	0	-8,4	>100	0	-2,0	>100	0	-8,5	>100	0	-4,5	>100	0	-0,8
177.VY.1213	>100	1,2	48,6	>100	0	1,4	>100	1,3	34,7	>100	0	21,8	23,8	1,8	92,7	>100	0,6	42,7	>100	0,9	45,5
178.NB.1213	>100	0	-0,3	>100	0	-0,2	>100	0	-4,1	>100	0	-0,5	>100	0	5,4	>100	0	-2,7	>100	0	1,7
191.NB.1213	>100	0	-0,9	>100	0	-2,0	>100	0	-5,3	>100	0	-2,8	>100	0	-3,3	>100	0	-1,6	>100	0	-1,5
193.NB.1213	>100	0	0,0	>100	0	-0,4	>100	0	0,6	>100	0	-2,8	>100	0	5,3	>100	0	-2,1	>100	0	0,1
233.VY.1213	>100	0	-2,2	>100	0	0,9	>100	0	-1,1	>100	0	2,5	>100	0	5,0	>100	0	-1,8	>100	0	1,4
247.NB.1213	>100	0	-1,1	>100	0	-11,1	>100	0	-10,8	>100	0	-6,6	>100	0	-20,5	>100	0	-5,0	>100	0	-4,7
277.VY.1213	>100		25,4	>100	0	-4,2	>100	0	-6,2	>100	0	85,1	85,1	2,4	56,1	>100	0	-1,2	>100		20,8
931.NB.1213	>100	0	-44,6	>100	0	-2,2	>100	0	-3,5	>100	0	-2,1	>100	0	-1,4	>100	0	-0,6	>100	0	0,2



### Список литературы

1. **Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефи-ров Н.С.** Молекулярное моделирование рецепторов физиологически активных веществ для целей медицинской химии // Успехи химии. 2009. Т. 78. № 6. С. 539-557.
2. **Хельтве Х.Д., Зиппль В., Роньян Д., Фолькерс Г.** Молекулярное моделирование (теория и практика) / Под редакцией В.А. Палюлина и Е.В. Радченко.- М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2010. 318 с.
3. **Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J.** Feeney Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings /C.A. Lipinski et al.// Advanced Drug Delivery Reviews.-2001. Vol.46. №1-3. P. 3-26.
4. **Авенирова Е.Л., Алексеева П.А., Баранова Н.И., Басс М.С., Бурякина А.В., Питухина Н.Н., Федорова Е.В.** Молекулярные аспекты создания лекарственных препаратов: использование методов компьютерного моделирования с целью создания нового противоишемического средства // Биомедицина. 2014. №1. С.4-10.
5. **Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V.** QSAR Modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS prediction // Mol. Informatics. 2011. Vol.30, №2-3. P. 241-250.

## Development of synthetic anticoagulants - inhibitors of serine proteases: combining *in silico* and *in vitro* approaches

N.I. Baranova, P.A. Alekseeva, K.S. Chistyakov, V.N. Yuskovets,  
S.V. Okovityi, A.V. Buryakina, E.V. Fedorova

The aim of this study was to presents a model-based approach based on the integration of computational theory (*in silico*-experiments) and experiments performed (*in vitro*) to search, optimization and development of new anticoagulants molecules with affinity to the family of serine proteases.

The authors gratefully acknowledges to Novartis AG for assistance in the *in vitro* experiments in the framework of the program "Novartis in-kind collaborations", as well as the personal gratitude for their researchers and biologists Ulrich Hassiepen and Gabriela Monnet.

**Key words:** quantitative structure-activity relationship, molecular docking, serine protease inhibitors, *in silico* and *in vitro* experiments.