



Молекулярные аспекты создания лекарственных препаратов: использование методов компьютерного моделирования с целью создания нового противоишемического средства

Е.Л. Авенирова, П.А. Алексеева, Н.И. Баранова, М.С. Басс,
А.В. Бурякина, Н.Н. Питухина, Е.В. Федорова

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

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

С помощью компьютерных методов моделирования были проанализированы спектры биологической активности ряда производных малоновой кислоты с целью изыскания потенциально активных соединений в отношении ишемических повреждений миокарда. На основании полученных результатов была проведена оценка взаимодействия наиболее перспективного соединения (4-[(3-этоксипропанойл)амино] бензойной кислоты) с А3аденозиновым рецептором методом молекулярного докинга. Установлено, что данное соединение может рассматриваться как перспективное противоишемическое средство.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, виртуальный скрининг, направленное конструирование, противоишемические средства.

Введение

В настоящее время изучение роли энергодифицита, гипоксии и оксидативного стресса в патогенезе различных заболеваний сердечно-сосудистой системы и возможности фармакологического воздействия на эти представляют значительный теоретический и практический интерес.

Основными направлениями фармакотерапии таких состояний могут стать:

- прямое воздействие на рецепторы сосудистого эндотелия с восстановлением его функции;

- предотвращение действия медиаторов, вызывающих повреждение миокарда и/или сосудов;
- повышение эффективности использования митохондриями дефицитного кислорода;
- снижение потребления кислорода тканями;
- увеличение образования АТФ в ходе гликолиза без увеличения продукции лактата;
- опосредованный эффект через влияние на факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Цель работы состояла в изучении спектра биологической активности потенциальных противоишемических средств на основе производных малоновой кислоты методами молекулярного моделирования.

Исследования показали перспективность соединений малоновой кислоты для поиска новых противоишемических средств. Установлено, что производные малоновой кислоты снижают интенсивность окислительных процессов за счет ингибирования дыхательной функции митохондрий во всех звеньях дыхательной цепи. Это влияет на гликолиз и окислительное фосфорилирование и может применяться для защиты миокарда от повреждения в ранние сроки острой ишемии миокарда. Объектами нашего исследования служили ряд производных малоновой кислоты: её сложные эфиры и амиды.

Материалы и методы

Для построения и оптимизации трехмерной компьютерной модели лигандов: 4-[(3-этокси-3-оксoproпаноил)амино] бензойной кислоты и аденозина, был выбран программный пакет ACD / ChemSketch 10.0. Алгоритм 3D оптимизации преобразовывает плоскую (2D) структуру, созданную в программе ACD / ChemSketch 10.0, в реалистичную 3D модель. Оптимизация основана на применении несколько измененных методов молекулярной механики, которые принимают во внимание длину химических связей, величину угла между атомами, внутреннее вращение и невалентные взаимодействия. Модификации включают незначительные упрощения потенциальных функций, а также дополнены эвристи-

ческими алгоритмами для неудачных стартовых конфигураций. Эти упрощения предназначены для увеличения скорости вычисления [6]. Для оптимизации ACD / ChemSketch 10.0 использует модификацию силового поля, подобную заложенной в программе CHARMM [2].

Молекулярный докинг проводили, используя быструю и гибкую программу предсказания белок-лигандных взаимодействий и высокопроизводительного виртуального скрининга FlexX. Критерием оценки взаимодействия между лигандом и белком использовалась так называемая «скоринг-функция» (оценочная функция), определяемая как энергия взаимодействия лиганда с рецептором. Скоринг-функция (Score) учитывает следующие слабые взаимодействия белок-лиганд: энергия Ван-дер-Ваальса, электростатическая энергия, энергия десольватации, энергия внутренних напряжений (деформации валентных связей), энергия водородных связей, энергия взаимодействия ароматических групп.

Результаты и их обсуждение

Известно, что выраженную активность проявляет от 0,1 до 1% веществ, прошедших экспериментальный скрининг [1, 5]. Поэтому, прежде чем начать исследование биологической активности полученных нами соединений, мы предприняли попытку прогноза их вероятных видов активности с помощью компьютерной программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), используя сервис PASS INet (<http://www.ibmc.msk.ru/PASS>), который позволяет любому зарегистрированному пользователю получать бесплатно прогноз PASS

через Интернет [1, 7]. Структурная формула исследуемого вещества направляется на прогноз в виде MOL-файла на анализ или вводится непосредственно в Интернет-браузере с использованием Marvin-апплета; после чего результат прогноза выдается на дисплей пользователя в течение нескольких минут.

Биологическая активность описывается в PASS качественным образом («активно»/«неактивно»), что позволяет интегрировать в обучающей выборке PASS информацию, собранную из множества различных источников. Структурная формула молекулы, для которой должен быть получен прогноз PASS, представлена в виде MOL-файла (для набора молекул – в виде SDF- файла). Прогнозируемый спектр биологической активности представлен в PASS в виде списка активностей с двумя вероятностями: P_a – «быть активным», и P_i – «быть неактивным», рассчитанными для каждой активности. Этот список упорядочен по убыванию разностей $P_a - P_i$; таким образом, наиболее вероятные активности находятся в верхней части списка. Только активности с $P_a > P_i$ считаются возможными для анализируемого соединения. Список может быть укорочен при любом пороговом значении, однако «по умолчанию» этим порогом является $P_a > P_i$.

Среди предсказанных видов биологической активности с порогом $P_a > P_i$ для ряда наших соединений были выделены **лечение ишемии миокарда** и кардиопротективное действие. Пример определения видов биологической активности в программе PASS для одного из соединений представлен в табл. 1.

На основании данных, полученных с использованием программы PASS, было

выбрано наиболее перспективное соединение, представляющее собой смешанный сложный эфир-амидмалоновой кислоты, формула которого изображена на рис. 1.

Таблица 1
Спектры биологической активности, прогнозируемые с помощью компьютерной программы PASS для 4-[(3-этоксипропаноил)амино] бензойной кислоты

P_a	P_i	Активности
0,600	0,187	Лечение ишемии миокарда
0,522	0,234	Кардиопротективное действие

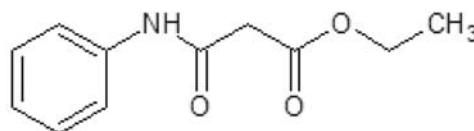


Рис. 1. Структурная формула 4-[(3-этоксипропаноил)амино] бензойной кислоты.

Более детальное изучение предсказанных активностей для данного соединения мы проводили методом молекулярного докинга, который является важным инструментом в изучении взаимодействий белок–лиганд. Докинг называется процесс “подстыковки” лиганда в лиганд-связывающий центр (ЛСЦ) рецептора с целью поиска как наиболее выгодных положений и ориентаций лигандов в ЛСЦ, так и выявления факторов, изменение которых может привести к улучшению лиганд-рецепторного взаимодействия. Поскольку определение пространственных структур комплексов лиганд–рецептор с помощью различных физико-химических методов для многих лигандов затруднено,

задачей докинга является предсказание связывания химических соединений с рецепторами на основании только виртуального эксперимента. Метод молекулярного докинга позволяет предсказывать пространственную структуру комплекса рецептор–лиганд и свободную энергию его образования, исходя из данных о пространственной структуре рецептора, известной с разрешением в несколько ангстрем (например, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа) и химической структуре лиганда. В качестве одной из мишеней для изучения возможных механизмов взаимодействия были выбраны аденозиновые рецепторы подтипа A_3 .

Аденозин входит в состав многих эндогенных молекул (АТФ, НАД⁺, нуклеиновые кислоты). Кроме того, он играет важную роль в регуляции многих физиологических процессов. Действие аденозина на функцию сердца было обнаружено уже в 1929. Аденозин – это эндогенный пуриновый нуклеозид, состоящий из аденина, соединенного с рибозой (рибофуранозой) β -N₉-гликозидной связью. Он является основным лигандом, который приводит к активации аденозиновых рецепторов всех четырех типов (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3). Однако, помимо аденозина, описан ряд иных лигандов (активаторов и ингибиторов), которые могут взаимодействовать с аденозиновыми рецепторами.

Аденозиновые рецепторы (АР) подтипа A_3 регулируют различные физиологические и патофизиологические процессы, в том числе модуляцию мозговой и сердечной деятельности, ишемические повреждения, воспаления, внутриглазное давление, регулирования нормальных и опухолевых клеток роста, и иммуносупрессию. Также A_3 -АР сти-

мулирует фосфолипазу C и активирует ионные кальциевые каналы. Известно, что антагонисты A_3 -АР могут выступать в качестве потенциальных лекарственных средств для лечения ишемических и воспалительных заболеваний, в том числе при терапии и/или профилактике нарушений деятельности сердца, почек, дыхательной системы и центральной нервной системы.

Докинг 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино] бензойной кислоты и модельного соединения аденозина производился на теоретически созданную модель A_3 рецептора (PDB код 1OEA), имеющуюся в свободном доступе на сайте молекулярного банка данных RCSBPDB (www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Для построения теоретической модели в качестве шаблона была использована структура бычьего родопсина с разрешением 2,8 Å [3, 4], поскольку, как и большинство других трансмембранных белков, A_3 аденозиновый рецептор плохо поддается кристаллизации, а, следовательно, точному структурному изучению методом рентгеноструктурного анализа.

Аденозиновый рецептор A_3 относится к сопряженным с G-белком рецепторам и состоит из семи трансмембранных α -спиралей, попарно соединенных тремя внешними и тремя внутриклеточными гидрофильными петлями (рис. 2).

У-образный активный сайт A_3 рецептора (рис. 3) состоит из трех гидрофобных доменов (P1, P2 и P3). Домен P1, главным образом, состоит из трех неполярных боковых цепей, а именно Leu90, Trp243 и Leu246, причем взаимодействие с Trp243 является наиболее значительным для активации рецептора [3, 4]. Домен P2 включает различные типы гидрофобных аминокислот:

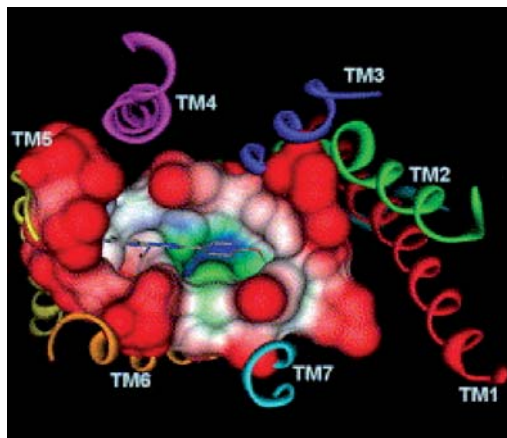


Рис. 2. Модель A_3 аденозинового рецептора.

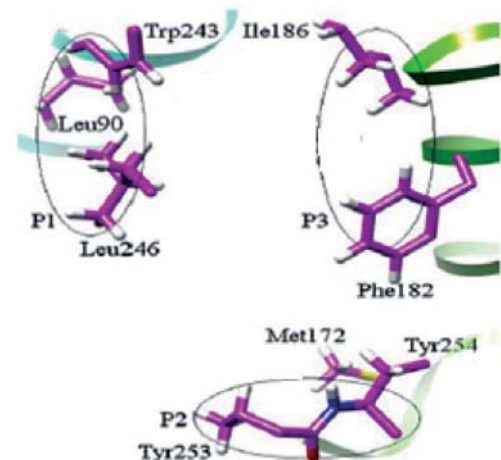


Рис. 3. Y-образный активный сайт A_3 рецептора.

Met172, Ile253 и Tyr254. Домен P3, в основном, включает остатки Phe182, Ile186 и Val178, взаимодействие с ними для разных лигандов-антагонистов может варьироваться.

Оценка того, с какими аминокислотами взаимодействуют антагонисты A_3 , показала, что в связывании могут принимать участие: TRP243, ILE186, LEU90, LEU246, MET172, TYR254, PHE182, ASN250, SER247, PHE168,

GLN167, HIS95, LEU244. Эффективные сайты связывания A_3 антагонистов с рецептором встречаются обычно в верхней области трансмембранных (TM) α -спиралей TM3, 5, 6 и 7 (рис. 4). Все антагонисты демонстрируют некоторые общие взаимодействия с рецептором, а именно образуют водородные связи с Asn250 и взаимодействуют с остатками Phe168 или Phe182.

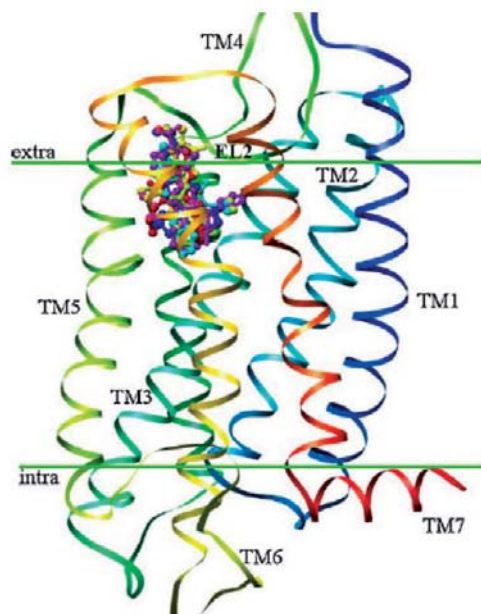
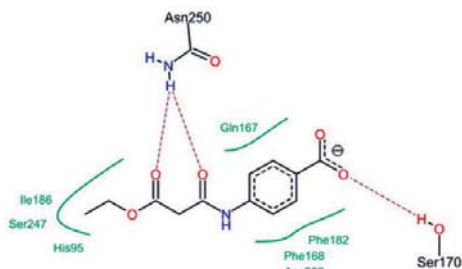


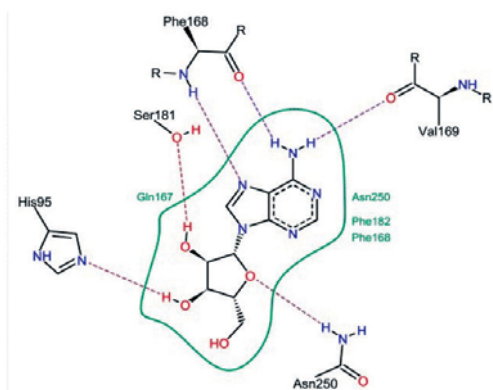
Рис. 4. Эффективный сайт связывания A_3 антагонистов с рецептором.

Анализ результатов докинга показал, что 4-[(3-этоксипропаноил)амино] бензойная кислота в домене P1 взаимодействует с LEU246 и TRP243, играющими значимую роль для активации рецептора; ILE186 и PHE182 домена P3, образуют водородные связи с ASN250, SER247, а также взаимодействуют с остатками HIS95 и PHE168 (домен P2). Таким образом, лиганд стабилизирован в трех доменах рецептора (P1, P2 и P3),

демонстрирующих общие взаимодействия известных ранее селективных антагонистов с рецептором.



Score = -18,7170 ккал/моль



Score = -21,5450 ккал/моль

Взаимодействия с аминокислотами	Исследуемое вещество	Аденозин
SER170	+	-
ILE186	+	-
SER247	+	-
PHE182	+	+
ASN250	+	+
PHE168	+	+
HIS95	+	+
SER181	-	+
GLN167	+	+
VAL169	-	+

Выводы

Анализ литературных данных показал, что антагонисты А3-АР могут рассматриваться как перспективный класс веществ для лечения ишемических и гипоксических состояний. В частности, интерес представляют производные малоновой кислоты.

С помощью программы PASS нами были проанализированы спектры биологической активности ряда производных малоновой кислоты с целью изыскания потенциально активных в отношении ишемических повреждений миокарда. На основании полученных данных было выбрано наиболее перспективное соединение, представляющее собой смешанный сложный эфир-амид.

Нами была проведена оценка взаимодействия наиболее перспективного лиганда с А3-АР методом молекулярного докинга с использованием программного продукта FlexX. Было выявлено, что искомое соединение связывается с активным центром белка, в том числе с ключевыми аминокислотами PHE182, ASN250, PHE168, HIS95, GLN167, а также имеет удовлетворительное значение скоринг-функции.

Таким образом, на основании хеоминформатического исследования было выявлено новое соединение (4-[(3-этоксис-3-оксопропаноил)амино] бензойная кислота), которое может рассматриваться как перспективное противоишемическое средство.

Список литературы

1. Ищенко Р.О., Федорова Е.В., Яковлев И.П. Фармация. 2013 (5). С. 41-43.
2. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S. Kar- plus M. CHARMM –

- a program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations // J. Comp. Chem. 1983. № 4. P. 187-188.
3. **Gao Z.G., Kim S.K., et al.** Structural determinants of A3 adenosine receptor activation—nucleoside ligands at the agonist/antagonist boundary. 2002J. Med. Chem. 45. P. 4471-4484.
 4. **Gao, Z.G., et al.** Identification by site-directed mutagenesis of residues involved in ligand recognition and activation of the human A3 adenosine receptor. 2002J. Biol. Chem. 277. P. 19056-19063.
 5. **Lagunin A., Stepanchikova A., Filimonov D., Poroikov V.** Bioinformatics. 2000. 16 (8). 747 p.
 6. **Li Z., Wan H., Shi Y., Ouyang P.** Personal experience with four kinds of chemical structure drawing software: review on ChemDraw. ChemWindow. ISIS / Draw. and ChemSketch // J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2004. Vol. 44. № 5. P. 1886-1890.
 7. **Sady A., Lagunin A., Filimonov D., Poroikov V.** SAR & QSAR Environ. Res. 2003. 14 (5-6) 339.

Molecular aspects of drug development: using methods of computer modeling to create new anti-ischemic agents

E.L. Avenirova, P.A. Alekseeva, N.I. Baranova, M.S. Bass, A.V. Buryakina, N.N. Pitukhina, E.V. Fedorova

The spectra of biological activity of several derivatives of malonic acid were analyzed using computer modeling techniques with the aim to identify potentially active compounds against ischemic myocardial injury. The nature of interaction between the most promising compound based on the obtained results (4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl) amino] benzoic acid) and A3 adenosine receptor was evaluated using molecular docking. Thus this compound can be regarded as a perspective anti-ischemic agent.

Key words: molecular modeling, virtual screening, rational design, anti-ischemic agents.