

Т. М. Христова, П. Г. Полищук, А. А. Варнек, В. Е. Кузьмин

Комплексный подход к дизайну антагонистов тромбоксановых А₂ рецепторов*(Представлено академиком НАН Украины С. А. Андронатом)*

Для дизайна новых перспективных антагонистов тромбоксан А₂ рецепторов применяли два подхода, базирующиеся на использовании фармакофорных моделей и моделей подобия молекулярных полей. Из 223 сконструированных соединений, основываясь на ранее полученных QSAR и фармакофорных моделях, было выбрано пять перспективных антагонистов тромбоксан А₂ рецепторов, предложенных для дальнейших исследований.

Тромбоксан А₂ (ТХА₂) является важным медиатором агрегации тромбоцитов. Некоторые сердечнососудистые заболевания, в частности острый инфаркт миокарда и сердечную недостаточность, связывают с увеличением синтеза ТХА₂ [1]. Взаимодействие ТХА₂ с их рецепторами (ТР), расположенными на поверхности тромбоцитов, приводит к активации тромбоцитов и высвобождению других агонистов, таких как АДФ и фактор фон Виллебранда [2]. В качестве препарата, снижающего биосинтез ТХА₂ путем ингибирования циклооксигеназы-1, широко используется аспирин, однако одним из его побочных эффектов является желудочно-кишечные кровотечения [3]. Предполагается, что антагонисты ТР будут более эффективны, чем аспирин, так как смогут ингибировать связывание с ТР не только тромбоксана А₂, но и других эндогенных лигандов ТР: эндопероксидов, простаноидов и изопростанов, синтез которых не затрагивается аспирином [4]. Ранее *Gresele et al.* [4] было показано, что данные эндогенные лиганды также, как и ТХА₂, вовлечены в процесс гемостаза.

За последние годы был разработан ряд антагонистов ТР, характеризующихся хорошими фармакокинетическими свойствами. В настоящее время ни один из них не прошел всех стадий клинических испытаний по причине незначительного преимущества перед аспирином [5]. За время поиска антагонистов ТР было накоплено значительное количество экспериментальных данных [6]. Сбор и анализ данной информации с использованием современных методов компьютерного моделирования может послужить хорошей предпосылкой к эффективной разработке новых антагонистов ТР. С этой целью в рамках нашего исследования был проведен сбор информации об известных антагонистах ТР, на основе которой получены QSAR модели, фармакофорные модели и модели, основанные на сравнении молекулярных полей. Построенные модели были использованы как для дизайна новых антагонистов тромбоксановых рецепторов, так и для их виртуального скрининга и выбора наиболее перспективных соединений с целью их дальнейшего синтеза и проверки биологической активности.

Формирование обучающих выборок. В качестве источника информации о структуре и активности известных антагонистов ТР была использована общедоступная база химических соединений ChEMBL [6]. На основе собранной информации сформированы две выборки соединений. Первая — включает в себя 174 соединения, для которых известен аффинитет к ТР тромбоцитов человека (выборка I), выраженный величинами отрицательных логарифмов констант ингибирования (pK_i). Для исследования аффинитета в качестве ме-

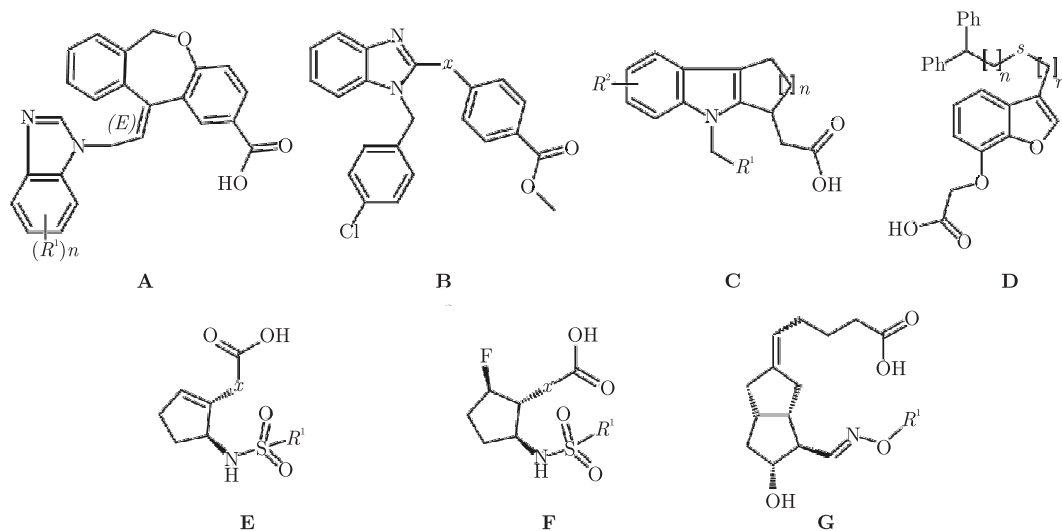


Рис. 1. Общие формулы соединений выборок I и II.

A: $n = 1-2$; $R^1 = \text{H, NO}_2, \text{OCH}_3, \text{CH}_3, \text{Cl}$ и др. **B:** $X = -\text{SCH}_2-, -\text{SOCH}_2-, -\text{CH}_2-, -\text{NH}-, -\text{NHCH}_2-, -\text{CH}=\text{CH}-, -(\text{CH}_2)_2-$. **C:** $n = 0-1$, $R^1 = \text{арил}$, $R^2 = \text{галоген, SO}_2\text{Me, SO}_2\text{NMe}_2, \text{H}$ и др. **D:** $n = 0-2$, $m = 1-3$. **E** и **F:** $R^1 = \text{фенил, фторфенил, дифторфенил, нитрофенил, хлорфенил, нафтил}$; $X = -\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-, -(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-, -(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2-$; **G:** $R^1 = \text{арил моно/дизамещенный F, Cl, NO}_2, \text{CH}_3$

ченного препарата использовался преимущественно лиганд U-46619. Значение аффинитета в собранной выборке варьируется от $\text{pK}_i = 5$ до $\text{pK}_i = 9$. Вторая выборка содержит 93 соединения с известной антиагрегационной активностью (выборка II), которая представлена величинами отрицательного логарифма концентрации полуингибирования (pIC_{50}). Значение антиагрегационной активности выбранных соединений варьируется от $\text{pIC}_{50} = 4$ до $\text{pIC}_{50} = 8$.

Почти все отобранные соединения содержат в своем составе карбоксильную группу. Соединения, обладающие аффинитетом к TP (выборка I), можно представить в виде четырех общих формул **A–D** (рис. 1). Антагонисты TP с известной антиагрегационной активностью в выборке II являются преимущественно производными простаговой кислоты и могут быть представлены тремя общими формулами **E–G** (см. рис. 1).

QSAR моделирование. Для построения QSAR моделей был использован метод Random Forest [7, 8] в сочетании с различными подходами представления молекулярной структуры (SiRMS [9], фрагментные дескрипторы ISIDA [10], фармакофорные триплеты [11]).

На основе выборки I была построена регрессионная консенсусная 2D модель. Для оценки ее прогнозирующей способности была применена процедура пятикратной кросс-валидации [12], позволяющая оценить коэффициент детерминации (R^2) и среднеквадратичную ошибку (RMSE) для прогнозируемых характеристик. Результаты валидации показали, что построенная модель обладает удовлетворительной прогнозирующей способностью ($R^2 = 0,66$, $\text{RMSE} = 0,61$).

Выборка II содержит много соединений, для которых известен лишь порядок величины антиагрегационной активности, что делает нецелесообразным построение обычной регрессионной модели. Поэтому все соединения в выборке II разделены на два класса в соответ-

ствии с их значением антиагрегационной активности на активные ($pIC_{50} \geq 7$) и неактивные ($pIC_{50} < 7$), на основе которых была построена классификационная модель. Результаты внутренней процедуры валидации метода Random Forest [7] показывают, что построенная модель обладает удовлетворительной прогнозирующей способностью (точность прогноза составила 81%).

Построение 3D фармакофорных моделей. Фармакофорные модели представляют собой набор электронных и стерических признаков с определенной геометрией и положением в пространстве, которые отвечают за взаимодействие лиганда с мишенью и проявление последней биологического отклика.

Для построения фармакофорных моделей с использованием программы Ligand-Scout 3.03 [13] из набора соединений с известным аффинитетом к TP были выбраны 77 антагонистов TP со значением $pK_i \geq 7$. Поскольку различные лиганды могут по-разному ориентироваться в полости рецептора, вызывая один и тот же биологический отклик, отобранные соединения были сгруппированы с точки зрения подобия их фармакофорных моделей. В результате этой процедуры все соединения разделены на четыре группы, и для каждой группы была построена своя фармакофорная модель.

Для оценки прогнозирующей способности построенных моделей сформированы тестовые выборки, включающие соединения выборки I за исключением тех лигандов, которые непосредственно использовались для построения каждой модели. Прогнозирующая способность описана такими характеристиками, как точность и отклик модели.

$$\text{Точность} = \frac{TP}{TP + FP}; \quad \text{Отклик} = \frac{TP}{TP + FN},$$

где TP — количество верно предсказанных активных соединений; FP — количество неверно предсказанных неактивных соединений; FN — количество неверно предсказанных активных соединений. Точность модели характеризует долю активных соединений среди соединений, отобранных моделью. Отклик показывает какая часть из имеющихся в выборке активных соединений соответствуют модели.

Построенные фармакофорные модели имели удовлетворительную точность — от 0,41 до 1 и очень низкие значения отклика — от 0,01 до 0,05. Лучшая из построенных моделей состояла из одного центра отрицательного заряда (S1), двух акцепторов водородной связи (S3, S5) и двух гидрофобных элементов (S2, S4) (рис. 2). Для повышения предсказательной способности фармакофорных моделей было решено использовать совместно все четыре построенные модели, т. е. если соединение соответствовало хотя бы одной из моделей, оно считалось активным. Применение такого консенсусного подхода позволило получить высокое значение отклика 0,73 и удовлетворительное значение точности 0,60 на тестовом наборе соединений.

Дизайн виртуальной библиотеки антагонистов TP. Для осуществления дизайна новых потенциальных антагонистов TP было применено два подхода.

Первый — основывается на использовании фармакофорной модели. Исходная модель делится на две части таким образом, чтобы один из фармакофорных элементов был общим для обеих частей. После чего проводится скрининг виртуальной базы фрагментов на каждой из частей фармакофорной модели. В результате два полученных набора фрагментов комбинаторно объединяются в структуры новых соединений.

В качестве фармакофорной модели была выбрана лучшая 3D фармакофорная модель (см. рис. 2). Модель была поделена на две части таким образом, чтобы гидрофобный эле-

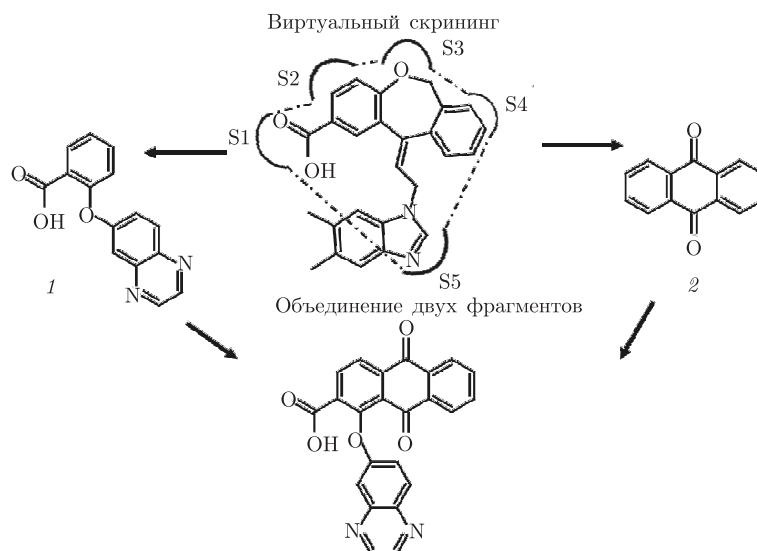


Рис. 2. Дизайн виртуальной библиотеки антагонистов TP, основанный на фармакофорной модели: S1 — анионный центр; S2, S4 — гидрофобные области; S3, S5 — акцепторы водородной связи.

1 — пример фрагмента, отобранный первой частью фармакофорной модели, содержащей фармакофорные элементы S1, S2, S5;

2 — пример фрагмента, отобранный второй частью фармакофорной модели, которая содержит S2, S3, S4 фармакофорные элементы

мент модели оказался общим для обеих частей (см. рис. 2), которые использовались для скрининга виртуальной базы фрагментов Prestwick, содержащей 2800 фрагментов, полученных при фрагментации известных лекарств. По аналогии с правилом Липинского для лекарственных препаратов, данные фрагменты дополнительно отбирались в соответствии со следующими условиями: молекулярная масса < 300; липофильность $ClogP < 3$; количество доноров и акцепторов водородной связи < 3; количество вращающихся связей < 3. Благодаря этим правилам, соединения, которые будут сконструированы из указанных фрагментов, должны иметь характеристики, не противоречащие правилу Липинского. Фрагменты, найденные в результате такого скрининга (см. 1 и 2 на рис. 2), были комбинаторно объединены друг с другом в 171 новое соединение.

Второй подход, который применялся для дизайна новых соединений, заключается в замене молекулярных фрагментов в соединениях-лидерах на основе оценки подобия их молекулярных полей (электростатическое, гидрофобное, поле сил Ван-дер-Ваальса), реализованных в программе FieldAlign [14].

В качестве соединения-лидера для дальнейшей структурной модификации был выбран лиганд с высоким аффинитетом к TP ($pK_i = 8,92$; рис. 3) в конформации, соответствующей лучшей 3D фармакофорной модели. В результате замены различных групп атомов и фрагментов было получено 52 новых соединения, для которых подобие молекулярных полей с соединением-лидером было наивысшим.

Виртуальный скрининг сконструированных соединений. Все 223 сконструированных соединения объединены в одну виртуальную библиотеку, к которой последовательно

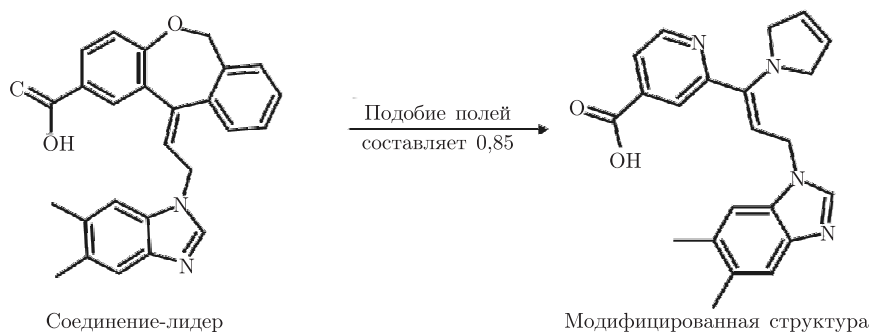


Рис. 3. Соединение-лидер, выбранное для дальнейшей структурной модификации, и пример модифицированной структуры

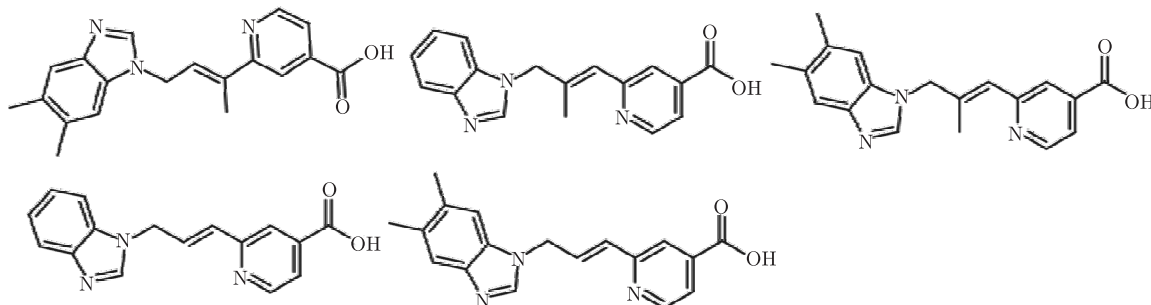


Рис. 4. Сконструированные антагонисты тромбоксан A2 рецепторов

были применены ранее построенные фармакофорные и QSAR модели. В результате виртуального скрининга было выбрано пять наиболее перспективных антагонистов TP (рис. 4), предложенных для последующего синтеза и исследования их биологической активности.

Таким образом, используя компьютерные подходы к осуществлению дизайна антагонистов тромбоксановых рецепторов, нами сконструировано пять новых перспективных соединений с минимальными затратами ресурсов.

1. *Patrono C., Ciabattoni G., Davi G.* Thromboxane biosynthesis in cardiovascular diseases // *Stroke*. – 1990. – **21**. – P. 130–133.
2. *FitzGerald G.A.* Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists // *Am. J. Cardiol.* – 1991. – **68**(7). – P. 11B – 15B.
3. *Serebruany V. L., Steinhubl S. R., Berger P. B. et al.* Analysis of risk of bleeding complications after different doses of aspirin in 192, 036 patients enrolled in 31 randomized controlled trials // *Ibid.* – 2005. – **15**; **95**(10). – P. 1218–1222.
4. *Gresele P., Arnout J., Deckmyn H. et al.* Role of proaggregatory and antiaggregatory prostaglandins in hemostasis. Studies with combined thromboxane synthase inhibition and thromboxane receptor antagonism // *J. Clin. Invest.* – 1987. – **80**(5) – P. 1435–1445.
5. *Bousser M. G., Amarenco P., Chamorro A. et al.* Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial // *Lancet*. – 2011. – **11**. – P. 2013. – 2022.
6. *Gaulton A., Bellis L. J., Bento A. P. et al.* ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – **40**. – P. D1100–D1107.
7. *Breiman L.* Random forests // *Machine Learning*. – 2001. – **45**(1). – P. 5–32.
8. *Polishchuk P. G., Muratov E. N., Artemenko A. G. et al.* Application of Random Forest Approach to QSAR Prediction of Aquatic Toxicity // *J. Chem. Inf. and Model.* – 2009. – **49**(11). – P. 2481–2488.

9. Kuz'min V. E., Artemenko A. G., Polischuk P. G. et al. Hierarchic System of QSAR Models (1D–4D) on the Base of Simplex Representation of Molecular Structure // J. Molec. Model. – 2005. – **11**. – P. 457–467.
10. Solov'ev V. P., Varnek A., Wipff G. Modeling of ion complexation and extraction using substructural molecular fragments // J. Chem. Inf. Comput. Sci. – 2000. – **40**(3). – P. 847–858.
11. Bonachera F., Parent B., Barbosa F. et al. Fuzzy tricentric pharmacophore fingerprints. 1. Topological fuzzy pharmacophore triplets and adapted molecular similarity scoring schemes // J. Chem. Inf. and Model. – 2006. – **27**; **46**(6). – P. 2457–2477.
12. Tetko I. V., Solov'ev V. P., Antonov A. V. et al. Benchmarking of linear and nonlinear approaches for quantitative structure-property relationship studies of metal complexation with ionophores // Ibid. – 2006. – **46**(2). – P. 808–819.
13. Wolber G., Langer T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters // Ibid. – 2005. – **45**(1). – P. 160–169.
14. *FieldAlign*.3.0.1 ed. Welwyn Garden City, Hertfordshire, UK, 2010.

Фізико-хімічний інститут
им. А. В. Богатського НАН України, Одеса

Поступило в редакцію 14.04.2014

Т. М. Хрїстова, П. Г. Полїщук, А. А. Варнек, В. Є. Кузьмін

Комплексний підхід до дизайну антагонїстів тромбоксанових A2 рецепторів

Для дизайну нових перспективних антагонїстів тромбоксан A2 рецепторів застосовували два підходи, що ґрунтуються на використанні фармакофорних моделей та моделей подібності молекулярних полів. З 223 зконструйованих сполук, використовуючи раніше отримані QSAR і фармакофорні моделі, було вибрано п'ять перспективних антагонїстів тромбоксан A2 рецепторів, запропонованих для подальших досліджень.

T. M. Khristova, P. G. Polishchuk, A. A. Varnek, V. E. Kuz'min

An integrated approach to the design of thromboxane A2 receptor antagonists

Two approaches were used for the design of novel promising antagonists of thromboxane A2 receptors. They are based on the usage of pharmacophore models and molecular field similarity models. 223 new compounds were designed overall. Five promising antagonists of thromboxane A2 receptors were selected by earlier obtained QSAR and pharmacophore models for the further synthesis and experimental testing.