

ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ В ПОИСКЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АРИБЕНЗАМИДИНОВ

Е.В. Куваева, канд. фарм. наук, **Е.В. Федорова**, канд. хим. наук,
И.П. Яковлев, докт. хим. наук, профессор, **Е.Н. Кириллова**, канд. хим. наук,
Т.Л. Семакова, канд. хим. наук

Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия;
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14

E-mail: elena.kuvaeva@phatminnotech.com

С помощью компьютерных программ PASS и докинга FlexX установлено, что синтезированное новое малотоксичное и высокоэффективное производное бензамидина – N-4-нитрофенилбензамидин обладает широким спектром биологической активности.

Ключевые слова: N-арилбензамидины, программа PASS, докинг FlexX, острая токсичность, биологическая активность.

Несмотря на огромный арсенал имеющихся лекарственных средств (ЛС), поиск новых эффективных лекарств по-прежнему остается актуальным. Это обусловлено отсутствием или не-

достаточной эффективностью существующих ЛС; наличием побочного действия некоторых из них, ограничением срока их годности. Ежегодно химики синтезируют, выделяют и характеризуют от 100 до 200 тыс. новых веществ. Многие из них проходят первичные испытания (скрининг) на выявление той или иной биологической активности. Скрининг проводят в биологических лабораториях на живых клетках, микроорганизмах, кусочках живых тканей, на здоровых или специально зараженных животных (мышах, крысах, морских свинках, собаках). При этом из сотен веществ отбираются несколько наиболее активных, которые затем передаются на углубленные испытания.

Если высокая активность вещества подтверждается, то его всесторонне изучают для определения токсичности и побочных эффектов, при отсутствии или незначительности которых проводят кинетические испытания на людях.

Все новые синтезированные вещества должны быть подвергнуты первичным испытаниям. Однако практически невозможно испытать все новые соединения на все виды активности. В настоящее время есть реальная возможность определять потенциал биоактивности вновь синтезированных соединений путем компьютерного анализа, например с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) и оригинальной программы докинга FlexX, позволяющей проводить докинг низкомолекулярных органических соединений и рассчитывать энергии взаимодействия комплекса ингибитор–фермент. По результатам компьютерного анализа сведений о строении вещества оператор получает рекомендации о целесообразности или нецелесообразности испытаний данного соединения на тот или иной вид активности. Такой подход экономит время, материалы и силы при аналоговом поиске лекарственных веществ (ЛВ).

В последнее время для изучения биологической активности и, что особенно важно, механизма действия потенциального препарата стал широко использоваться метод молекулярного моделирования в сочетании с рентгеноструктурным анализом. Данный метод позволяет установить стереохимические особенности молекулы ЛВ и биорецептора, конфигурацию их хиральных центров, измерить расстояние между отдельными атомами, группами атомов или между зарядами в случае цвиттер-ионных молекулярных структур потенциального лекарства и биорецепторного участка его захвата, например с помощью оригинальной программы докинга FlexX. Получаемые таким образом данные позволяют более целенаправленно проводить синтезы биоактивных молекул с заданными на молекулярном уровне параметрами.

Из литературы известно, что амидины обладают высокой биологической активностью. Амидиновый фрагмент (обычно в составе гетероцикла) входит в структуру многих лекарственных препаратов, напри-

мер нафтизина, галазолина, фентоламина, хлордиазепоксида. Многие из амидинов используются в химиотерапии.

Целью работы стал синтез новых производных бензамидинов и предсказание их биологической активности с помощью программ PASS и FlexX.

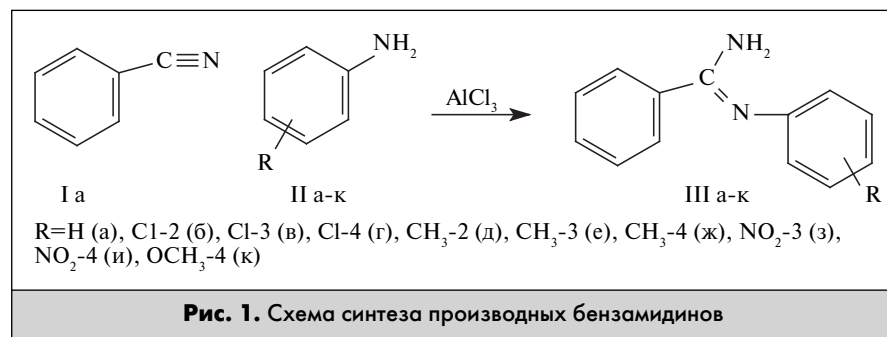
Экспериментальная часть

Синтез этих соединений осуществлялся взаимодействием бензонитрила с ариламинами в присутствии катализатора безводного хлорида алюминия при нагревании до температуры 150–200°C. Готовый продукт отделяли от катализатора кислотным перемещением. Дополнительная очистка не проводилась (рис. 1) [1, 2].

Результат исследований – разработка технологически удобных, экологически чистых и экономически целесообразных способов получения рассматриваемых амидинов. Строение и индивидуальность полученных соединений были доказаны с помощью современных методов анализа (ЯМР, ИК, УФ-спектроскопии, ВЖХ, масс-спектрометрии, РСА).

Перед началом исследования биологической активности полученных соединений был осуществлен прогноз их вероятных видов активности с помощью компьютерной программы PASS. Оказалось, что для изучаемых нами бензамидинов прогнозируются антикоагуляционная, антибактериальная и противовоспалительная активности с вероятностью $P_a > 0,8$; анальгетическая активность – с вероятностью $P_a \approx 0,4$. Дальнейшим этапом работы стало экспериментальное подтверждение данных видов активности, установление корректности компьютерных программ для данного вида соединений. Однако имеющиеся на рынке препараты с такой биологической активностью часто малоэффективны, обладают высокой токсичностью, отличаются дороговизной и узким ассортиментом. Поэтому актуальность такого рода исследования не вызывает сомнения.

Острую токсичность синтезированных соединений определяли на нелинейных белых мышах – самцах массой тела 18–20 г. Животных распределяли на равные по численности и массе тела группы, по 10 особей в каждой группе. Суспензии соединения в воде, стабилизированные твином-80, вводили однократно внутривентриально в интервале доз 50 мг/кг–3160 мг/кг. Выживаемость животных определяли, анализируя их состояние через 24 и 48 ч от момента введения исследуемого соединения. Наблюдали за животными в течение 72 ч. Регистрировали развитие основных симптомов и время гибели животных.



Расчет среднесмертельной дозы (LD_{50}) проводили с помощью экспресс-метода В.Б. Прозоровского [3] и пробит-анализа по методу Миллера–Тейнтера [4]. Токсичность заявляемых соединений составляла от 1000 до 2600 мг/кг. Согласно классификации токсичности препаратов, исследуемые соединения относятся к классу мало- или практически нетоксичных веществ [5].

Несмотря на пристальное внимание к созданию антикоагуляционных препаратов, в настоящее время в медицине для внутривенного введения используется только 1 синтетический прямой ингибитор тромбина – аргатробан. Другой препарат – дабигатрана-этексилат (низкомолекулярное пролекарство) – был утвержден недавно Управлением контроля качества продуктов и лекарственных средств США (FDA) и одобрен для перорального введения. Таким образом, понятна важность разработки новых прямых ингибиторов тромбина.

Одним из перспективных способов поиска новых ингибиторов тромбина является рациональный дизайн, опирающийся на экспериментальные данные о трехмерных структурах комплексов тромбин–ингибитор. В настоящей работе с целью разработки перорального препарата с антикоагуляционной активностью проведен молекулярный дизайн производных бензамидинов, содержащих в своей структуре характерную для многих ингибиторов сериновых протеаз сильно основную амидиновую функциональную группу. Виртуальный скрининг антикоагуляционной активности синтезированных соединений осуществлялся при помощи оригинальной программы докинга FlexX. Для белков с известной трехмерной структурой и низкомолекулярных молекул лигандов FlexX точно и быстро предсказывает геометрию белок-лиганд. Графический интерфейс позволяет в течение 1 мин визуализировать множественные результаты стыковок и предоставляет мгновенную обратную связь.

В качестве мишени для скрининга и докинга использовали кристаллическую структуру α -тромбина человека. Виртуальный скрининг осуществляли с помощью собственной виртуальной библиотеки лигандов. Критерием для отбора возможных ингибиторов тромбина служило значение оценочной функции (энергии взаимодействия между лигандом и белком). Согласно результатам вычислительного эксперимента, только

N-4-нитрофенилбензамидин обладает антикоагуляционной активностью, у остальных производных бензамидина ее нет. Несмотря на близкое сходство химической структуры соединений в их взаимодействиях с белком имеются существенные различия (рис. 2). Связывание N-4-нитрофенилбензамидина в активном центре фермента происходит за счет взаимодействия с боковыми цепями аминокислотных остатков Trp 60A, Trp 60D и образования водородной связи с Gly 216 в «S₃ кармане фермента», что характерно для многих известных ингибиторов тромбина. Напротив, связывание других соединений на примере N-3-нитрофенилбензамидина (см. рис. 2) происходит за счет иных групп, ранее не описанных в литературе как характерных для известных ингибиторов. Таким образом, остальные бензамидины не будут проявлять активность по отношению к тромбину.

Для экспериментального подтверждения теоретических результатов была проверена величина протромбинового времени, характеризующая свертываемость крови у интактных лабораторных крыс после многократного (5-дневного) введения исследуемых соединений. Установлено, что из всего ряда соединений, только N-4-нитрофенилбензамидин проявлял антикоагуляционную активность, что полностью согласовывалось с результатами виртуального скрининга.

Определение антибактериальной активности, которая была предсказана программой PASS с $Pa > 0,8$, проводили методом серийных разведений с последующим высевом на агаризованную среду. В качестве тест-микроорганизмов были выбраны *Staphylococcus aureus* штамм 209 P и *Escherichia coli* ATCC 25922. Микробная нагрузка составила 1000 кл/мл.

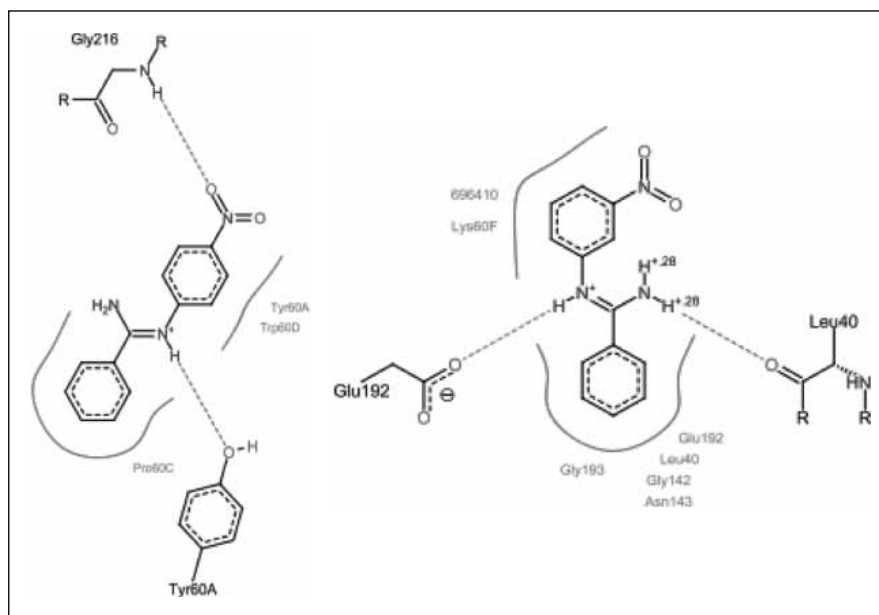


Рис. 2. Взаимодействие N-4-нитрофенилбензамидина и N-3-нитрофенилбензамидина с белками

Минимальные ингибирующие концентрации бензамидинов для *E. coli* и *St. aureus* составляли от 0,049 до 1,163 мкг/мл, что находится на уровне или ниже широко используемых на практике антибиотиков (аминогликозиды 0,2–3,2 мкг/мл для *E. coli* и 0,1–1,6 мкг/мл для *St. aureus*) и фторхинолонов (0,016–0,5 мкг/мл для *E. coli* и 0,06–0,52 мкг/мл для *St. aureus*). По токсичности аминогликозиды и фторхинолоны относятся к классу высоко-токсичных соединений, в чем явно проигрывают синтезированным малотоксичным амидами. Из ряда изученных амидинов следует выделить N-4-нитрофенилбензамидин, обладающий низкой токсичностью (2600 мг/кг) и при этом высокой антибактериальной активностью в отношении *E. coli* (0,049 мкг/мл) и *St. aureus* (0,049 мкг/мл).

Противовоспалительную активность, которая также была предсказана программой PASS с $P_a > 0,8$, исследовали на скрининговой модели «формалиновый отек лапы у крыс». Исследуемые нативные растворы бензамидинов вводили крысам внутривенно в дозе 25 мг/кг. Препарат сравнения — диклофенак — вводили аналогично. Объем лапы измеряли при помощи стеклянного онкометра по объему вытесненной воды после погружения лапы в специальный резервуар. Результаты каждого животного усредняли в пределах группы и рассчитывали процент угнетения воспаления в опытной группе относительно контрольной. Установлено, что внутривенное однократное превентивное введение бензамидинов способствует сдерживанию развития воспалительной реакции спустя сутки на 65–75%, что соответствует уровню широко применяемого на практике диклофенака (60,8%) при значительно меньшей токсичности указанных амидинов, особенно N-4-нитрофенилбензамидина, токсичность которого в 30 раз меньше, чем у диклофенака.

Анальгетическую активность бензамидинов, предсказанную программой PASS с $P_a \approx 0,4$, изучали на

модели уксуснокислых «корчей» у мышей. Превентивное однократное внутривенное введение бензамидинов в дозе 150 мг/кг приводило к уменьшению числа судорог у животных на 65%, что свидетельствовало о наличии у бензамидинов анальгетической активности по сравнению с метамизолом натрия, активность которого составляет 91%. Полученные результаты аналогичны предсказаниям программы PASS.

Выводы

1. Использование компьютерных программ PASS и докинга FlexX позволило быстро, без существенных экспериментальных затрат, выделить из ряда полученных амидинов наиболее фармакологически активное соединение.

2. Синтезировано новое малотоксичное и высокоэффективное производное бензамидина — N-4-нитрофенилбензамидин с широким спектром биологической активности, не уступающее, а по многим показателям превосходящее современные аналоги на мировом фармацевтическом рынке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куваева Е.В., Федорова Е.В., Зайцев В.В., Яковлев И.П., Захаров В.И., Семакова Т.Л. Синтез и строение гидрохлоридов ароиламидинов и N-арил-бензамидинов. Журнал органической химии, 2011; 48: 221–225.
2. Куваева Е.В., Федорова Е.В., Яковлев И.П., Кириллова Е.Н., Ксенофонтова Г.В., Захаров В.И. Особенности синтеза N-арилбензамидинов. Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технологического университета), 2012; 14 (40): 58–61.
3. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.И. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки. Фармакология и токсикология, 1978; 4: 497–502.
4. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Гос. изд. медицинской литературы, 1963; 412.
5. Измеров И.Ф., Саноцкий И.В., Сидоров К.К. Параметры токсиметрии промышленных ядов. М.: Медицина, 1977; 196–197.

Поступила 24 декабря 2014 г.

VIRTUAL SCREENING IN A SEARCH FOR THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF NOVEL DERIVATIVES OF ARYLBENZAMIDINES

E.V. Kuvaeva, PhD; E.V. Fedorova, PhD; Professor I.P. Yakovlev, PhD; E.N. Kirillova, PhD; T.L. Semakova, PhD
Saint Petersburg Chemopharmaceutical Academy; 14, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376

SUMMARY

PASS and FlexX docking computer programs were used to isolate N-(4-nitrophenyl)benzamidine, a low toxic and highly effective benzamidine derivative with broad-spectrum biological activity, from a number of synthesized amidines. The anticoagulant, antibacterial, anti-inflammatory, and analgesic activities predicted by the programs were confirmed by animal experiments.

Key words: N-arylbenzamidines. PASS program, FlexX docking, acute toxicity, biological activity.

REFERENCES

1. Kuvaeva E.V., Fedorova E.V., Zaitsev V.V., Yakovlev I.P., Zakharov V.I., Semakova T.L. Synthesis and structure of aroylamidines and N-arylbenzamidines hydrochlorides. Journal of Organic Chemistry, 2011; 48: 221–225 (in Russian).
2. Kuvaeva E.V., Fedorova E.V., Yakovlev I.P., Kirillova E.N., Ksenofontova G.V., Zakharov V.I. Features of N-arylbenzamidin synthesis. Proceedings of the St. Petersburg State Technological Institute (Technical University). 2012; 14 (40): 58–61 (in Russian).
3. Prozorovskiy V.B., Prozorovskaya M.P., Demchenko V.I. Express method of determining the average effective dose and its error. Pharmacology and Toxicology, 1978; 4: 497–502 (in Russian).
4. Belenky M.L. Elements of quantitative assessment of pharmacological effect. Leningrad: State medical publishers, 1963; 412 (in Russian).
5. Izmerov I.F., Sanotskiy I.V., Sidorov K.K. Parameters of toxicometry of industrial poisons. Moscow: Medicine, 1977; 196–197 (in Russian).