Волгоградский Государственный Медицинский Университет

Кафедра Фармакологии

ФАРМАКОФОРНЫЙ ПОИСК РАЗРЫВАТЕЛЕЙ СШИВОК ГЛИКИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

ЯНАЛИЕВА Л.Р., ВАСИЛЬЕВ П.М., СПАСОВ А.А., РАЩЕНКО А.И., ВОРФОЛОМЕЕВА В.В., ОЗЕРОВ А.А., ГЕЙСМАН А.Н., ШМАТОВА Е.Н.

Волгоград 2016

Схема образования поперечных сшивок *(John D. Ferber, 2005)*

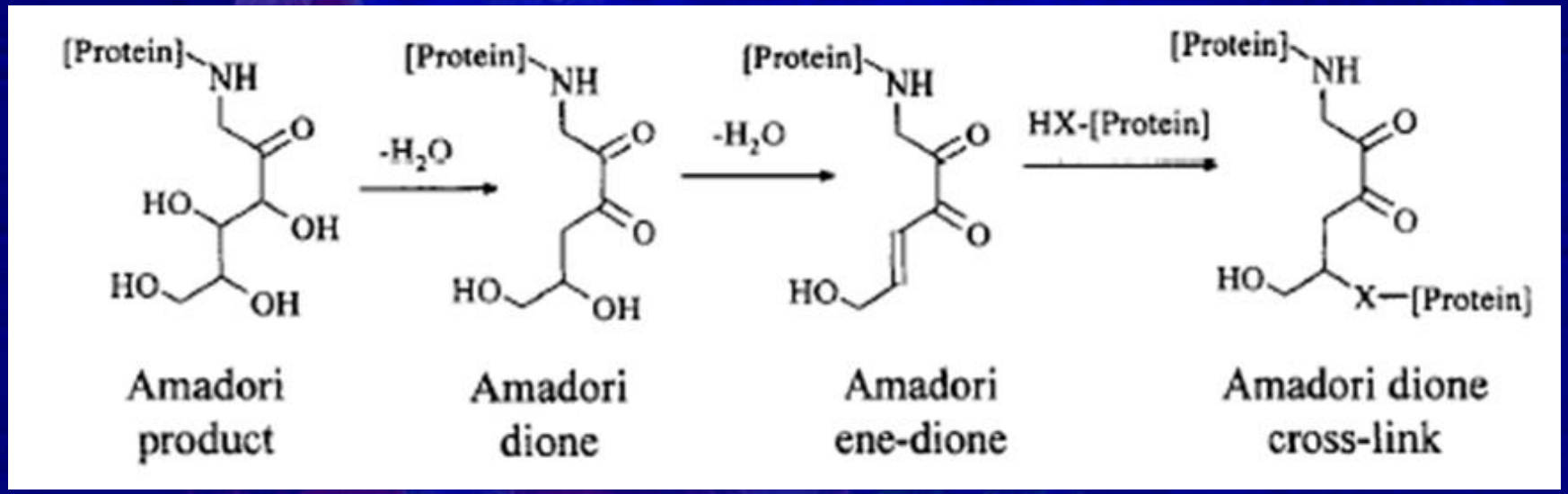
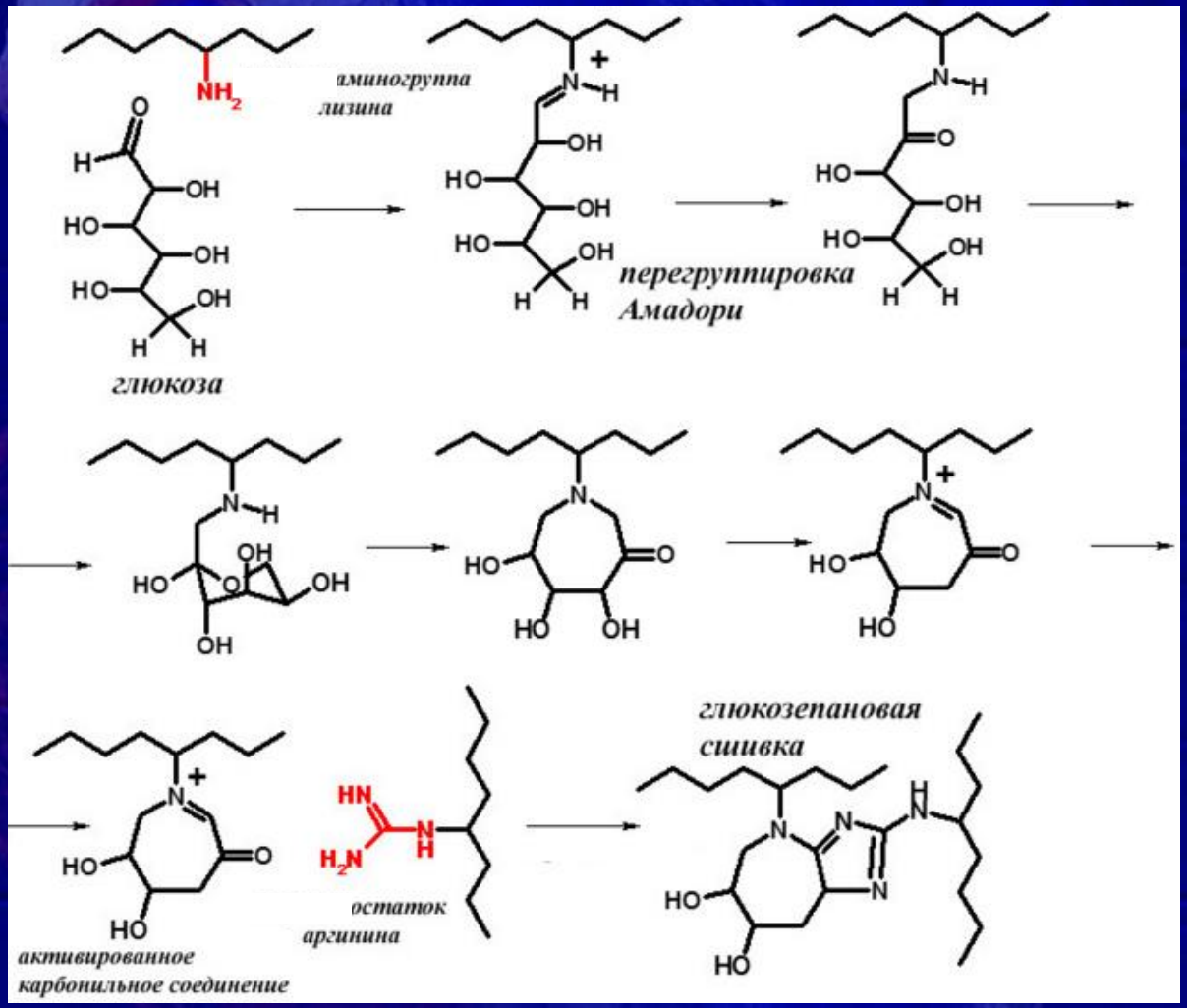
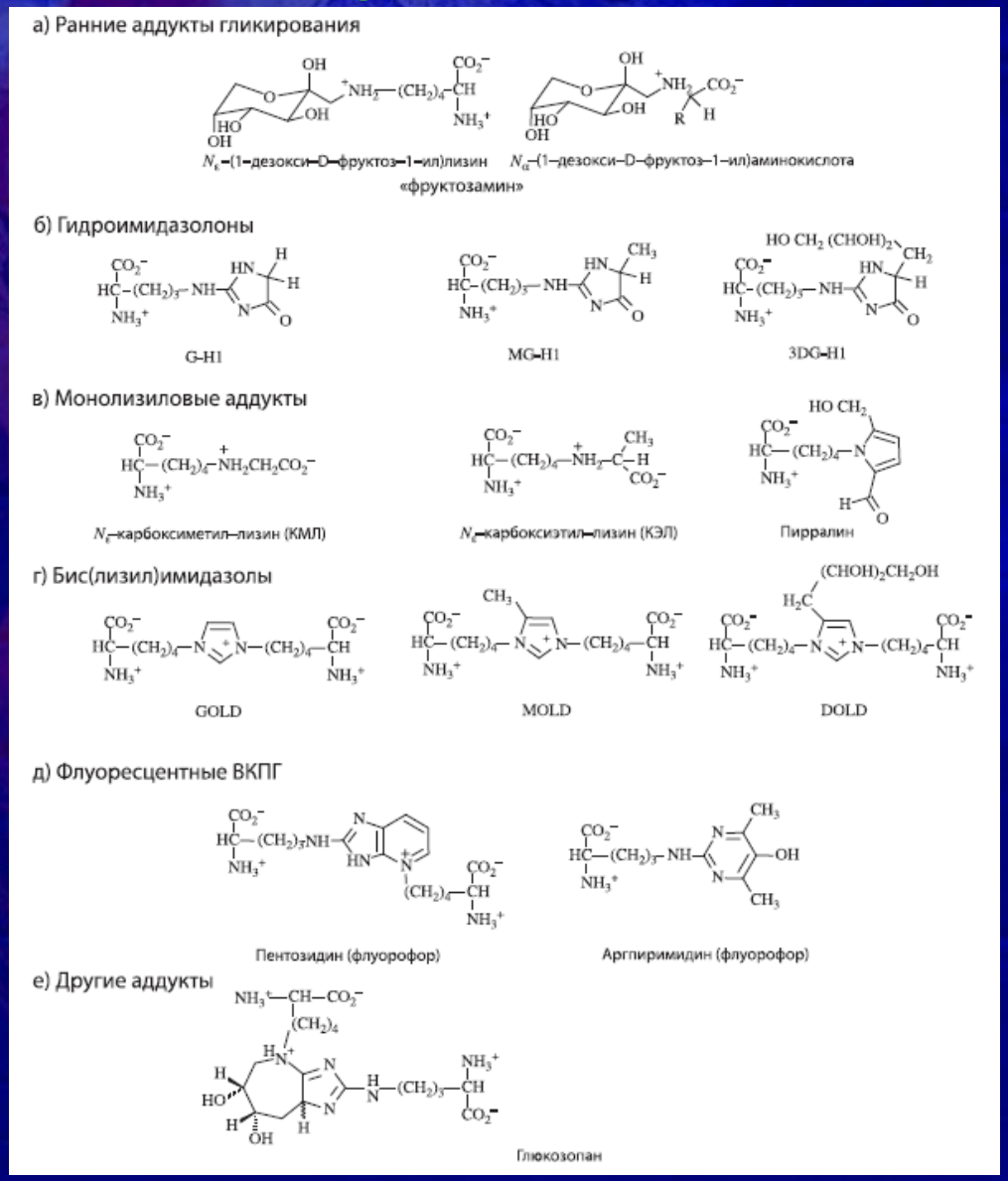


Рис. 1 Общая схема образования поперечных сшивок

Механизм образования белковой глюкозепановой сшивки



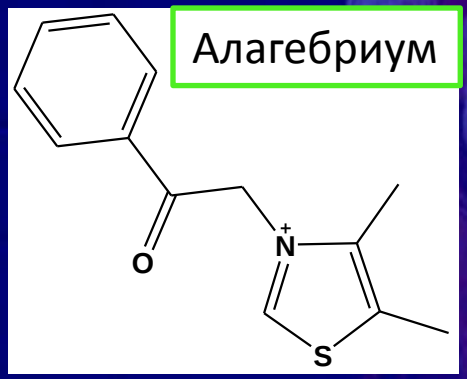
Продукты присоединения глюкозы к белкам в физиологических условиях *(Ahmed N., Thornalley P.J.)*



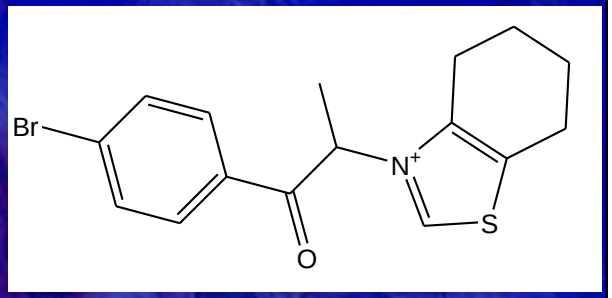
Цель

- поиск методом QL-фармакофорного анализа разрывателей сшивок гликированных белков в ряду новых производных урацила.

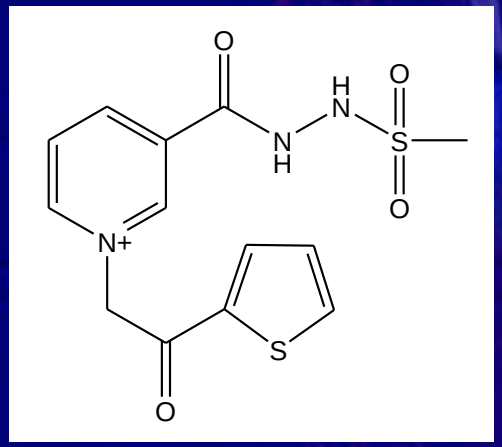
Потенциальные соединения в отношении разрывающей поперечные сшивки активности



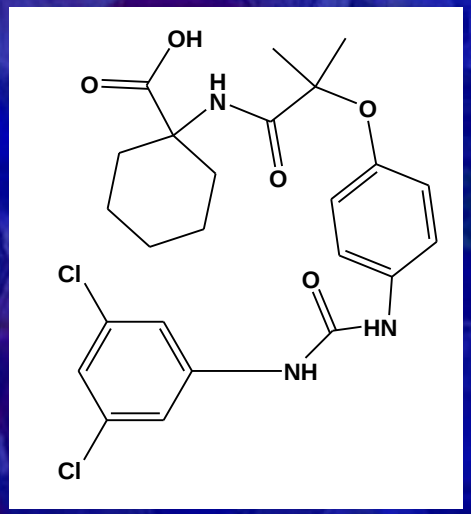
Алагебриум



C-16



TRC 4186



LR-23

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2015621298

Разрушители поперечных сшивок гликированных белков

Правообладатель: *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Васильев Павел Михайлович (RU), Спасов Александр Алексеевич (RU), Кузнецова Валентина Андреевна (RU), Францева Виктория Викторовна (RU)*

Заявка № 2015620820

Дата поступления 30 июня 2015 г.

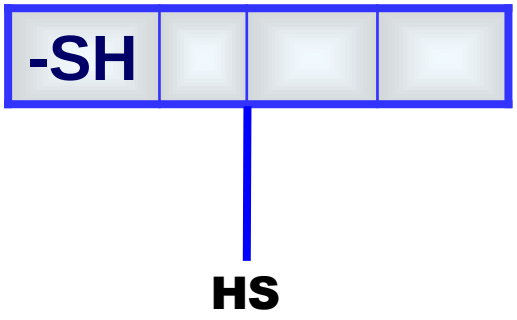
Дата государственной регистрации в Реестре баз данных *20 августа 2015 г.*

Заместитель руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

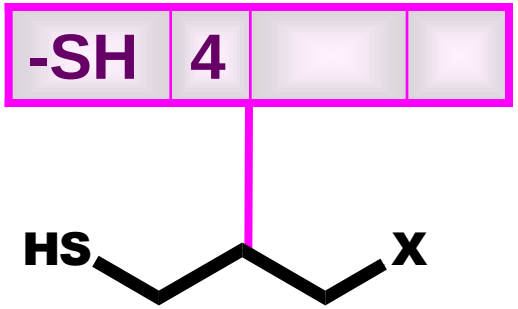
Л.Л. Кирий

Примеры QL-дескрипторов

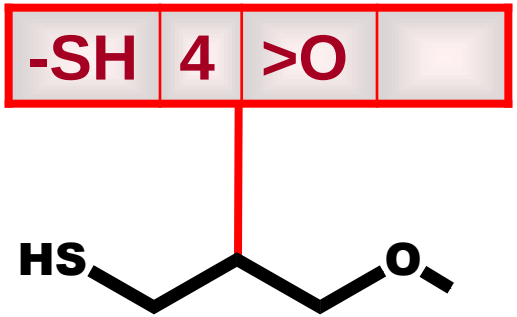
Rank 1



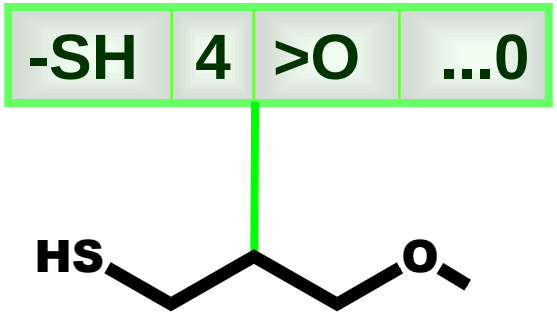
Rank 2



Rank 3



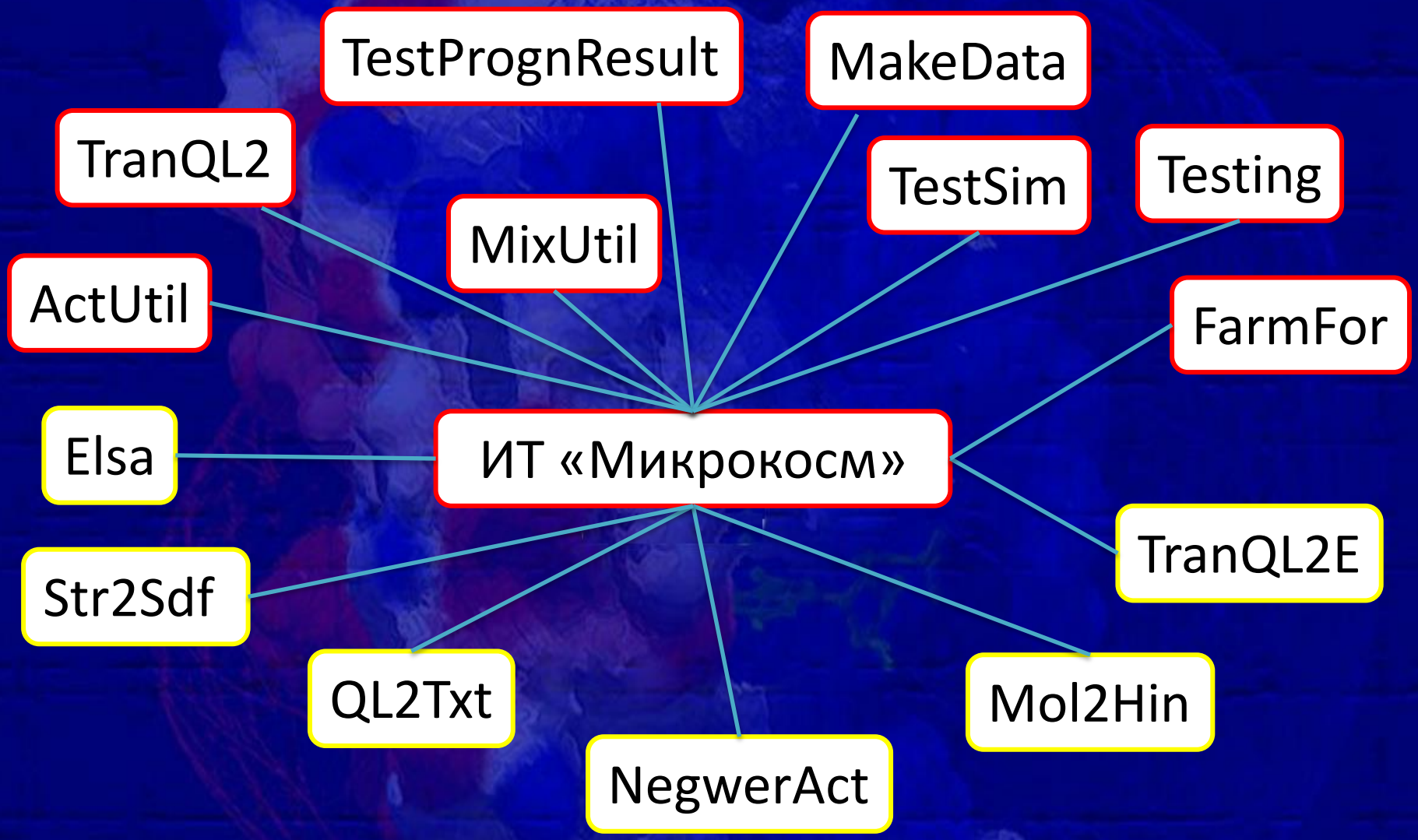
Rank 4



Программное обеспечение для моделирования фармакофоров

- OREX
- MULTICASE
- Discovery Studio, Catalyst — от Accelrys
- LigandScout— от Inte:ligand
- Phase — от Schroedinger
- MOE — от Chemical Computing Group
- SYBYL — от Tripos Inc.
- Flex — от SolseIT

Программный комплекс ИТ «Микрокосм»



Farm.for

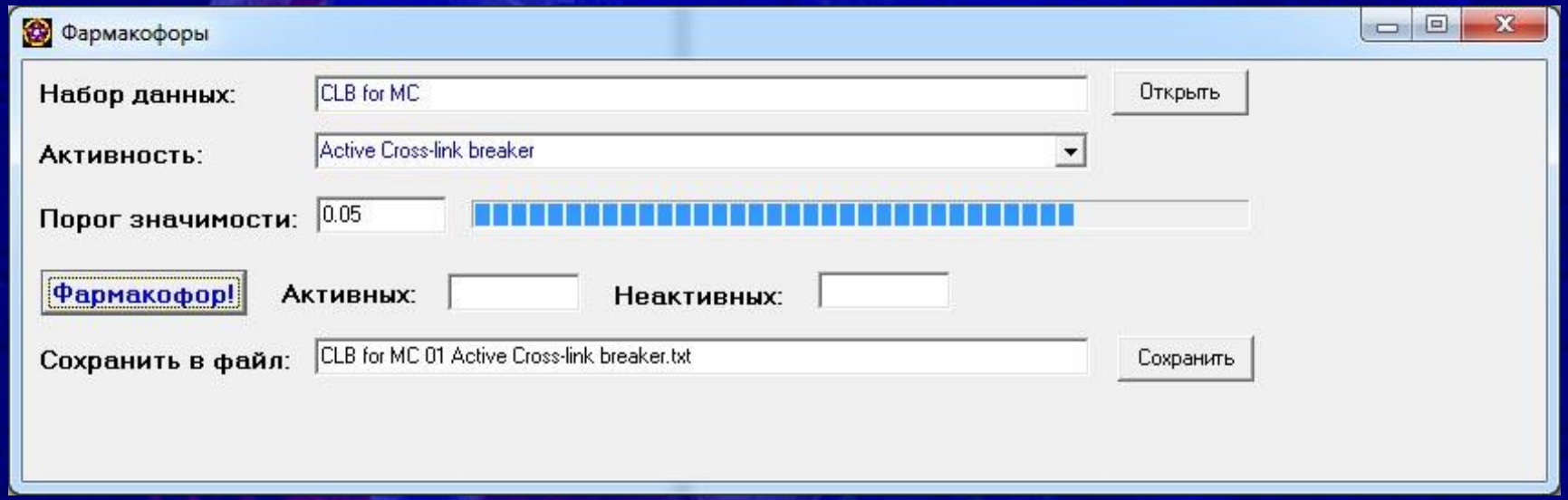


Рис. 2 Программа расчета потенциальных QL-фармакофоров FarmFor

Выявление фармакофоров

- **Байесовская частота встречаемости QL-дескриптора *ij* в классе *k = a, n***

$$P_{ijk} = \frac{S_{ijk} + 1}{S_{ik} + d_i}, \; j = 1, \ldots, d_i; i = 1, \ldots, 11$$

- **Достоверность различия байесовских частот встречаемости дескриптора *ij* в классах *a* и *n* по гипергеометрическому критерию**

$$\Pr_{ij} = \frac{\begin{pmatrix} (S_{ija} + S_{ijn} + 2) \\ (S_{ija} + 1) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} (S_{ia} + S_{in} + 2d_i) - (S_{ija} + S_{ijn} + 2) \\ (S_{ia} + d_i) - (S_{ija} + 1) \end{pmatrix}}{\begin{pmatrix} (S_{ia} + S_{in} + 2d_i) \\ (S_{ia} + d_i) \end{pmatrix}}$$

- **QL-дескриптор *j*-го вида *i*-го типа является статистически значимым признаком (фармакофором)**

$$P_{ija} \geq P_{ijn} \;\; и \;\; \Pr_{ij} < \Pr_0 \;\; или \;\; P_{ijn} < P_{ija} \;\; и \;\; \Pr_{ij} < \Pr_0$$

Прогноз активности

- **Байесовская вероятность принадлежности прогнозируемого соединения *C* к классу *k = a, n***

$$P_{Ck} = \frac{S_k + 1}{N + 2}$$

- **Достоверность принадлежности прогнозируемого соединения *C* соединений по точному критерию Фишера**

$$\Pr_C = \frac{\binom{N}{S_a} \cdot \binom{N}{S_n}}{\binom{2N}{(S_a + S_n)}}$$

- **Соединение *C* считается активным, если**

$$P_{Ca} \geq P_{Cn} \quad \text{и} \quad \Pr_C < \Pr_0$$

Значимые признаки наличия и отсутствия активности

Набор данных: CLB for MC
Число видов активности - 1

Активность: Active Cross-link breaker
Активных соединений - 12
Неактивных соединений - 28
Порог значимости 5.00E-002

Значимых признаков наличия активности - 406

СД1	ДД	СД2	ДС	P_a	P_n	P_r
>S				0.0374	0.0026	1.02E-005
CycAr05				0.0316	0.0077	3.10E-003
	1			0.2201	0.1616	6.75E-006
	-1			0.1578	0.1212	5.49E-004
			.a.1	0.1241	0.0715	1.61E-007
			p..1	0.0711	0.0502	2.93E-003
>N+=	2			0.0177	0.0008	1.05E-018
-CH3	3			0.0150	0.0034	3.84E-008
>N+=		=O		0.0110	0.0012	1.88E-005
>O			p..0	0.0027	0.0003	4.02E-003
=O			p..1	0.0324	0.0188	9.58E-005
	1		.a.0	0.0027	0.0003	4.78E-002
	4		pA.1	0.0156	0.0074	9.28E-003
>NH	2	-C(Ar)<		0.0124	0.0036	2.14E-004
>S	1	-C(Ar)<		0.0124	0.0008	1.00E-008
-Cl	3	-C(Ar)<		0.0077	0.0018	1.22E-003
>NH	1		...1	0.0131	0.0036	2.83E-007
>N+=	1		...0	0.0040	0.0001	7.17E-006
>N+=	2	>C=	...0	0.0055	0.0002	3.51E-005
-C(Ar)<	-1	CycAr05	...1	0.0164	0.0041	9.38E-007

Значимые признаки наличия и отсутствия активности

Набор данных: CLB for MC
Число видов активности - 1

Активность: Active Cross-link breaker
Активных соединений - 12
Неактивных соединений - 28
Порог значимости 5.00E-002

Значимых признаков отсутствия активности - 312

СД1	ДД	СД2	ДС	P_a	P_n	P_r
-N<				0.0029	0.0295	1.40E-003
>C(<)				0.0920	0.2246	1.32E-008
	8			0.0080	0.0219	1.26E-003
	0			0.1902	0.3088	2.62E-014
			pa.0	0.0010	0.0105	8.89E-004
			pA.0	0.0010	0.0118	3.27E-004
-N<	1			0.0005	0.0117	4.15E-009
-C(Ar)<	6			0.0059	0.0123	3.22E-003
-N<		-C(Ar)<		0.0008	0.0300	1.13E-012
>NH			.a.0	0.0005	0.0043	2.11E-003
-N<			...0	0.0005	0.0310	9.78E-025
	4		p..0	0.0037	0.0170	2.00E-004
	5		...0	0.0018	0.0151	5.03E-005
-N<	1	>C(<)		0.0006	0.0117	9.43E-007
-N<	2	>C(<)		0.0006	0.0112	1.89E-006
>NH	3	>C(<)		0.0018	0.0052	3.38E-002
Cyc06	-1		...0	0.0040	0.0166	3.36E-008
CycAr06	1		.a.1	0.0004	0.0027	1.08E-002
-N=	3	-C(Ar)<	.A.1	0.0005	0.0055	8.84E-004
-OH	3	>C(<)	...0	0.0020	0.0058	1.77E-002

Наиболее значимые QL-фармакофоры разрывателей сшивок гликированных белков

Ранг	Тип	$СД_1$	ДД	$СД_2$	ДС	P_a	P_n	Pr
1	1	=O				0.0862	0.0668	$4.93 \cdot 10^{-2}$
	2		2			0.2533	0.1823	$3.61 \cdot 10^{-7}$
	3				.a.1	0.1241	0.0715	$1.61 \cdot 10^{-7}$
2	4	>NH	1			0.0182	0.0082	$7.91 \cdot 10^{-5}$
	5	>NH		>O		0.0076	0.0021	$7.90 \cdot 10^{-3}$
	6	-Cl			...1	0.0059	0.0011	$1.67 \cdot 10^{-4}$
	7		1		...1	0.0852	0.0593	$7.48 \cdot 10^{-4}$
3	8	>NH	1	CycAr06		0.0053	0.0016	$1.31 \cdot 10^{-2}$
	9	>O	2		...0	0.0069	0.0044	$3.62 \cdot 10^{-2}$
	10	-OH		-CH3	...0	0.0033	0.0008	$4.30 \cdot 10^{-2}$
4	11	>NH	1	>C=	...1	0.0070	0.0038	$4.02 \cdot 10^{-2}$

Пример фармакофорного прогноза CLB активности

Показатель	GEMA-0008	GEPP-0012	GEPP-0031	GESU-0008	SHQU-0009	SHQU-0012
N_{All}	102	276	276	240	421	473
N_{Active}	15	147	140	116	196	212
N_{All}-N_{Active}	87	129	136	124	225	261
Pr_{Active}	0,1538	0,5324	0,5072	0,4835	0,4657	0,4484
$N_{Inactive}$	50	66	70	62	113	138
N_{All}-N_{Active}	52	210	206	178	308	335
$Pr_{Inactive}$	0,4904	0,2410	0,2554	0,2603	0,2695	0,2926
$Pr_{Active}/Pr_{Inactive}$	0,3137	2,2090	1,9859	1,8571	1,7281	1,5324
z	3,7933	5,9895	5,1359	4,1837	4,8578	4,1029
p_z	7,43E-05	1,05E-09	1,40E-07	1,43E-05	5,94E-07	2,04E-05

Результаты прогноза

Mol_ID FLib Suppl v01	Шифр	Расчет				
		Pr_{Act}	Pr_{Inact}	Pr_{Act}/Pr_{Inact}	z	p_z
118	GEPP-0012	0,5324	0,2410	2,21	5,99	1,05E-09
119	GEPP-0031	0,5072	0,2554	1,99	5,14	1,40E-07
117	GESU-0008	0,4835	0,2603	1,86	4,18	1,43E-05
10	OZPB-0010	0,5559	0,1971	2,82	8,07	1,00E-37
18	SHQU-0009	0,4657	0,2695	1,73	4,86	5,94E-07
21	SHQU-0012	0,4484	0,2926	1,53	4,10	2,04E-05
23	SHQU-0019	0,5133	0,1749	2,93	9,06	1,00E-37

Экспериментальная часть

Способность соединений разрывать сшивки гликированных белков изучали *in vitro* в концентрации 10^{-4} М флуоресцентным методом. Гликирование белков проводили при 60°С в течение 40 час (глюкоза 400 мМ; BSA 0,8 мг/мл; PBS 50 мМ, pH=7,4). К осажденному гликированному BSA добавляли 0,9 мл PBS (50 мМ, pH=7,4), затем 0,1 мл раствора изучаемого вещества и повторно инкубировали 40 час при 60°С. После инкубации осажденный BSA растворяли в 3 мл PBS (pH=10,0). Величину активности определяли по отношению флуоресценции опытного и контрольного образцов.

Результаты *in vitro*

- Всего испытано веществ - 7
- Активных – 5
- Сопоставимых по активности с алагебриумом –
- Активнее алагебриума – 1

Выводы

- метод QL-фармакофорного анализа может быть использован для поиска *in silico* новых разрывателей сшивок гликированных белков среди производных урацила;
- найдено 5 активных соединений, в том числе 1 активнее вещества сравнения;
- точность поиска активных веществ составила 71,4%.

Исследование выполнено в ВолгГМУ за счет гранта РНФ (проект № 14-25-00139)

Благодарю
за внимание!