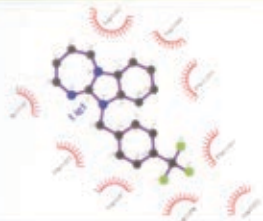


# МИШЕНЬ-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОИСК АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ



Волгоград, 2016

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

# **МИШЕНЬ-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОИСК АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

*Монография*

*Под редакцией  
академика РАН А. А. Спасова;  
академика РАН В. И. Петрова*



Издательство  
ВолГМУ  
Волгоград, 2016

MINISTRY OF HEALTH  
RUSSIAN FEDERATION

VOLGOGRAD STATE MEDICAL UNIVERSITY

# TARGET-ORIENTED SEARCH FOR ANTIDIABETIC AGENTS

*Monograph*

*Edited by:*

*RAS Academician A. A. Spasov*

*RAS Academician V. I. Petrov*



Publisher VolgSMU  
Volgograd 2016

УДК 616.379-008.64-085.31

ББК 54.15

M57

**В создании рукописи принимали участие следующие авторы:**

Д. А. Алёшин (гл. 10); В. А. Анисимова (гл. 10); Д. А. Бабков (гл. 4, 10, 11);  
А. М. Близник (гл. 10); М. В. Богославцева (гл. 10); А. Р. Валиева (гл. 10);  
П. М. Васильев (гл. 2, 8-11); Е. С. Воробьёв (гл. 5, 10); М. П. Воронкова. (гл. 4);  
В. В. Ворфоломеева (гл. 9, 10); Л. Н. Диваева (гл. 10); Т. К. Корчагина (гл. 10);  
В. А. Косолапов (гл. 6-8); А. Н. Кочетков (гл. 9); Ю. В. Коцценко (гл. 10);  
Т. А. Кузьменко (гл. 10); К. В. Ленская (гл. 3); В. С. Лобасенко (гл. 10);  
О. Ю. Майка (гл. 7); А. С. Морковник (гл. 10); В. И. Петров (гл. 1, 3);  
Ю. В. Попов (гл. 10); Т. Ю. Прохорова (гл. 10); Н. В. Рогова (гл. 4);  
В. Л. Русинов (гл. 10); И. М. Сапожникова (гл. 10); А. А. Спасов (гл. 2-11);  
Е. А. Стурова. (гл. 10); А. С. Таран (гл. 10); Ф. А. Халлуллин (гл. 10);  
В. Н. Чарушин (гл. 10); Н. И. Чепляева (гл. 3, 5, 10); О. Н. Чухахин (гл. 10);  
Л. Р. Яналиева (гл. 9, 10)

**Рецензенты:**

член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой фармакологии  
и биофармации ФУВ ВолгГМУ профессор **И. Н. Тюренков**;  
заведующий отделом молекулярной структуры и хемиинформатики  
Физико-химического института им. А. В. Богатского НАН Украины  
доктор химических наук, профессор **В. Е. Кузьмин**

*Издание одобрено и рекомендовано к печати Ученым советом ФГБОУ ВО  
Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава РФ*

M57

**Мишень-ориентированный** поиск антидиабетических средств [Текст]: монография / Д. А. Алёшин [и др.]; под редакцией академика РАН А. А. Спасова, академика РАН В. И. Петрова. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – 232 с.

**ISBN 978-5-9652-0452-6**

В монографии изложены современные представления по различным технологиям мишень-ориентированного поиска и молекулярного моделирования антидиабетических соединений. Представлены стратегии поиска соединений, влияющих на ключевые звенья сахарного диабета 2-го типа. Научно обоснованы основные направления коррекции метаболизма при сахарном диабете с детализацией роли инкретиномиметиков, гликогенфосфорилазы печени, PPAR $\gamma$  и  $\alpha$ -глюкозидазы.

С помощью консенсусного подхода к поиску *in silico* были спрогнозированы, синтезированы и изучены биологические свойства новых соединений. Проведен анализ механизмов связывания (докирования) наиболее активных соединений с активными центрами ДПП4, гликогенфосфорилазы,  $\alpha$ -глюкозидазы и PPAR $\gamma$ . Разработаны рекомендации для оптимизации структуры активных веществ.

Монография предназначена для специалистов в области медицинской химии, фармакологии, экспериментальной диабетологии, аспирантов и студентов химических, фармацевтических, биологических и медицинских и факультетов вузов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект 14-25-00139).

**ISBN 978-5-9652-0452-6**

**УДК 616.379-008.64-085.31**

**ББК 54.15**

© Волгоградский государственный медицинский университет, 2016

© Издательство ВолгГМУ, 2016

### Authors and their contributions:

*D. A. Aleshin (Chapter 10); V. A. Anisimova (Chapter 10);  
D. A. Babkov (Chapters 4, 10, 11); A. M. Bliznik (Chapter 10); M. V. Bogoslavtseva  
(Chapter 10); V. N. Charushin (Chapter 10); N. I. Chepyaeva (Chapters 3, 5, 10);  
O. N. Chupakhin (Chapter 10); L. N. Divaeva (Chapter 10);  
F. A. Khaliullin (Chapter 10); A. N. Kochetkov (Chapter 9);  
T. K. Korchagina (Chapter 10); Yu. V. Koschienko (Chapter 10);  
V. A. Kosolapov (Chapters 6–8); T. A. Kuzmenko (Chapter 10);  
K. V. Lenskaya (Chapter 3); V. S. Lobasenko (Chapter 10); O. Yu. Maya (Chapter 7);  
A. S. Morkovnik (Chapter 10); V. I. Petrov (Chapter 1, 3); Yu. V. Popov (Chapter 10);  
T. Yu. Prokhorova (Chapter 10); N. V. Rogova (Chapter 4); V. L. Rusinov (Chapter 10);  
I. M. Sapozhnikova (Chapter 10); A. A. Spasov (Chapters 2–11);  
E. A. Sturova (Chapter 10); A. S. Taran (Chapter 10); A. R. Valieva (Chapter 10);  
P. M. Vassiliev (Chapters 2, 8–11); V. V. Vorfolomeeva (Chapters 9, 10); E. S. Vorobyov  
(Chapters 5, 10); M. P. Voronkova (Chapter 4); L. R. Yanaliev (Chapters 9, 10)*

### Reviewers:

**I. N. Tyurenkov**, RAS Corresponding Member, Professor, head of the  
Pharmacology and Biopharmacy Department of the Volgograd State Medical University,  
**V. E. Kuzmin**, Professor, Doctor of chemical sciences, head of the Molecular  
Structure and Cheminformatics Division of A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute  
(NAS of Ukraine)

Approved and recommended for publication by  
Scientific council of Volgograd State Medical University  
Ministry of Health of Russian Federation

**Target-oriented** search for antidiabetic agents [Text]: monograph / D. A. Aleshin  
[et al.]; edited by RAS Academician A. A. Spasov, RAS Academician V. I. Petrov. –  
Volgograd: Publishing house of Volgograd State Medical University, 2016. – P. 232.

The monograph presents current opinions in various target-oriented search and molecular modeling technics regarding antidiabetic agents. Search strategies for compounds that affect key components of type 2 diabetes mellitus are presented. Main directions of the metabolism correction in diabetes are addressed, detailing the role of incretinomimetics, liver glycogen phosphorylase, PPAR $\gamma$  and  $\alpha$ -glucosidase.

Consensus approach to the in silico search allowed to predict, synthesize and evaluate the biological properties of novel small molecules. Analysis of the binding mechanisms (docking) of the most active compounds with active sites of DPP4, glycogen phosphorylase,  $\alpha$ -glucosidase and PPAR $\gamma$  is performed. Recommendations were developed to optimize the structure of the active substances.

The monograph is intended for specialists in the field of medicinal chemistry, pharmacology, experimental diabetology, and students of chemical, pharmaceutical, biological and medicinal university faculties.

Research was financially supported by the Russian Science Foundation (project 14-25-00139).

## Оглавление

Список сокращений .....	13
1. ВВЕДЕНИЕ .....	14
2. ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕТОДОЛОГИИ ПОИСКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ. ПОИСК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ <i>IN SILICO</i> ( <i>П. М. Васильев, А. А. Спасов</i> ).....	15
3. НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ПОИСКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ТЕРАПИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА ( <i>В. И. Петров,</i> <i>А. А. Спасов, К. В. Ленская, Н.И. Чепляева</i> ).....	40
4. ИНКРЕТИНЫ В КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА ( <i>А. А. Спасов,</i> <i>М. П. Воронкова, Н. В. Рогова, Д. А. Бабков</i> ).....	58
5. РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА ( <i>А. А. Спасов, Н. И. Чепляева, Е. С. Воробьев</i> ).....	69
6. ЗНАЧЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ, АКТИВИРУЕМЫХ ПРОЛИФЕРАТАМИ ПЕРОКСИСОМ, В ЛЕЧЕНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА ( <i>В. А. Косолапов, А. А. Спасов</i> ).....	89
7. ИНГИБИТОРЫ АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗЫ В ЛЕЧЕНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА ( <i>А. А. Спасов,</i> <i>В. А. Косолапов, О. Ю. Майка</i> ).....	99
8. МУЛЬТИТАРГЕТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ( <i>А. А. Спасов, В. А. Косолапов, П. М. Васильев</i> ).....	109
8.1. Полифункциональные вещества в медицинской практике .....	111
8.2. Дизайн полифункциональных веществ .....	112
8.3. Сетевой подход к созданию мультитаргетных средств.....	114
8.4. Мультитаргетное действие противодиабетических средств ....	116

9. КОНСЕНСУСНЫЙ ПОДХОД К ПОИСКУ <i>IN SILICO</i> ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ (П. М. Васильев, А. А. Спасов, А. Н. Кочетков, В. В. Ворфоломеева, Л. Р. Яналиева).....	126
9.1. Общая схема прогноза .....	127
9.2. Базы данных по структуре известных референсных препаратов и веществ .....	132
9.3. Фокусированная библиотека новых химических структур.....	143
9.4. Метод сходства к эталонам ИТ «Микрокосм» .....	144
9.4.1. Представление химической структуры .....	144
9.4.2. Алгоритм прогноза .....	146
9.4.3. Пороговые величины сходства .....	148
9.5. Система PASS .....	149
9.5.1. Представление химической структуры .....	149
9.5.2. Алгоритм прогноза .....	149
9.6. Построение и оптимизация 3D-моделей низкомолекулярных лигандов.....	151
9.7. Молекулярный докинг .....	153
9.7.1. Алгоритм прогноза .....	154
9.7.2. Технологическая схема докинга .....	157
9.8. Валидация 3D-моделей биомишеней.....	160
9.8.1. Валидация 3D-моделей дипептидилпептидазы-4 .....	162
9.8.2. Валидация 3D-моделей рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом, подтип гамма .....	163
9.8.3. Валидация 3D-моделей гликогенфосфорилазы.....	164
9.8.4. Валидация 3D-моделей альфа-глюкозидазы.....	168
9.8.5. Пороговые величины энергии докинга .....	170
9.8.6. Докинг новых химических соединений .....	170
9.9. Консенсусный прогноз активности новых химических соединений .....	171
10. НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК И ИЗУЧЕНИЕ АНТИДИА- БЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ.....	182
10.1. Поиск ингибиторов дипептидилпептидазы типа 4 .....	182
10.1.1. Синтез производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазина (В. Л. Русинов, И. М. Сапожникова, А. М. Близник, О. Н. Чупахин, В.Н. Чарушин).....	182

10.1.2. Влияние производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазина на активность дипептидилпептидазы типа 4 (ДПП4) (А. А. Спасов, Д. А. Бабков, Т. Ю. Прохорова, Е. А. Стурова) .....	185
10.2. Выявление ингибиторов гликогенфосфорилазы .....	188
10.2.1. Синтез тиетановых производных 2-бромимидазол-4,5-дикарбоновой кислоты (Ф. А. Халиуллин, А. Р. Валиева).....	188
10.2.2. Влияние тиетановых производных 2-бромимидазол-4,5-дикарбоновой кислоты на активность гликогенфосфорилазы (ГФ) (А. А. Спасов, Н. И. Чепляева, Д. А. Бабков, Е. С. Воробьев).....	190
10.3. Поиск ингибиторов $\alpha$ -глюкозидазы .....	191
10.3.1. Синтез производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазола (А. С. Морковник, Т. А. Кузьменко, Л. Н. Диваева, Ю. В. Коцкиенко, В. А. Анисимова, М. В. Богославцева).....	191
10.3.2. Влияние производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазола на активность $\alpha$ -глюкозидазы (АГ) (А. А. Спасов, Н. И. Чепляева, Д. А. Бабков, Д. А. Алешин).....	193
10.4. Выявление агонистов рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом .....	194
10.4.1. Синтез 2-цианопропил(3-фенокси)бензоата и его производных (Ю. В. Попов, Т. К. Корчагина, В. С. Лобасенко) .....	195
10.4.2. Влияние 2-цианопропил(3-фенокси)бензоата и его производных на активность PPAR $\gamma$ (А. А. Спасов, Д. А. Бабков) .....	197
10.5. Оценка результатов экспериментальной проверки консенсусного прогноза противодиабетической активности новых соединений (П. М. Васильев, А. А. Спасов, В. В. Ворфоломеева, Л. Р. Яналиева).....	198
10.5.1. Общая схема анализа точности прогноза .....	198
10.5.2. Ингибиторы дипептидилпептидазы-4 .....	198
10.5.3. Ингибиторы гликогенфосфорилазы .....	199



10.5.4. Ингибиторы $\alpha$ -глюкозидазы .....	201
10.5.5. Агонисты рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом, подтип $\gamma$ .....	203
10.6. Направленный поиск противодиабетических веществ с мультитаргетным действием .....	204
<b>11. АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ СВЯЗЫВАНИЯ НАИБОЛЕЕ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С САЙТАМИ БИОМИШЕНЕЙ (П. М. Васильев, А. А. Спасов, Д. А. Бабков).....</b>	<b>209</b>
11.1. Ингибиторы дипептидилпептидазы-4 .....	209
11.2. Ингибиторы гликогенфосфорилазы.....	214
11.3. Ингибиторы $\alpha$ -глюкозидазы .....	218
11.4. Агонисты PPAR- $\gamma$ .....	223
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>228</b>

# CONTENTS

<i>Abbreviations</i> .....	13
1. INTRODUCTION.....	14
2. HISTORICAL ASPECTS OF THE SEARCH METHODOLOGY FOR BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES. SEARCH FOR BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES <i>IN SILICO</i> ( <i>P. M. Vassiliev, A. A. Spasov</i> ).....	16
3. SCIENTIFIC BASIS OF THE SEARCH FOR DRUGS AGAINST DIABETES ( <i>V. I. Petrov, A. A. Spasov, K. V. Lenskaya, N. I. Cheplyaeva</i> ) .....	40
4. INCRETINS IN THE CORRECTION OF CARBOHYDRATE METABOLISM DISORDERS IN TYPE 2 DIABETES ( <i>A. A. Spasov, M. P. Voronkova, N. V. Rogova, D. A. Babkov</i> ).....	58
5. THE ROLE OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE INHIBITORS IN CARBOHYDRATE METABOLISM REGULATION IN TYPE 2 DIABETES ( <i>A. A. Spasov, N. I. Cheplyaeva, E. S. Vorobyov</i> )..	69
6. SIGNIFICANCE OF PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS IN THE TREATMENT OF TYPE 2 DIABETES ( <i>V. A. Kosolapov, A. A. Spasov</i> ).....	89
7. $\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITORS IN THE TREATMENT OF TYPE 2 DIABETES ( <i>A. A. Spasov, B. A. Kosolapov, O. Yu. Mayka</i> )..	99
8. MULTITARGET ACTION OF ANTIDIABETIC AGENTS ( <i>A. A. Spasov, V. A. Kosolapov, P. M. Vassiliev</i> ).....	109
8.1. Polyfunctional agents in clinical practice .....	111
8.2. Design of polyfunctional compounds.....	112
8.3. The network approach to the creation of multitarget agents.....	114
8.4. Multitarget action of antidiabetic drugs.....	116

9. THE CONSENSUS APPROACH TO IN SILICO SEARCH OF ANTIDIABETIC COMPOUNDS ( <i>P. M. Vassiliev, A. A. Spasov, A. N. Kochetkov, V. V. Vorfolomeeva, L. R. Yanaliev</i> ).....	129
9.1. The general prediction scheme .....	127
9.2. Structural databases of known reference drugs and compounds..	132
9.3. Focused library of novel chemical structures.....	143
9.4. Method of the standards similarity in IT «Microcosm» .....	144
9.4.1. Representation of chemical structures.....	144
9.4.2. Prediction algorithm .....	146
9.4.3. Threshold values of similarity .....	148
9.5. PASS System.....	149
9.5.1. Representation of chemical structures.....	149
9.5.2. Prediction algorithm .....	149
9.6. Construction and optimization of 3D-models of low molecular weight ligands .....	151
9.7. Molecular docking .....	153
9.7.1. Prediction algorithm .....	154
9.7.2. Technological scheme of docking .....	157
9.8. Validation of 3D-models of biological targets.....	160
9.8.1. Validation of dipeptidyl peptidase 4 3D-models .....	162
9.8.2. Validation of peroxisome proliferator-activated receptors $\gamma$ 3D-models .....	163
9.8.3. Validation of glycogen phosphorylase 3D-models .....	164
9.8.4. Validation of $\alpha$ -glucosidase 3D-models .....	168
9.8.5. Thresholds of docking energy .....	170
9.8.6. Docking of new chemical compounds .....	170
9.9. The consensus approach for activity prediction of new chemical compounds.....	171
10. DIRECTED SEARCH AND STUDY OF NEW ANTIDIABETIC COMPOUNDS .....	182
10.1. Search for dipeptidyl peptidase 4 inhibitors.....	182
10.1.1. Synthesis of azolo[5,1-c]-1,2,4-triazine derivatives ( <i>V. L. Rusinov, I. M. Sapozhnikova, A. M. Bliznik,                 O. N. Chupakhin, V. N. Charushin</i> ).....	182

10.1.2. Activity of azolo[5,1-c]-1,2,4-triazine derivatives against dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) ( <i>A. A. Spasov, D. A. Babkov, T. Yu. Prokhorova, E. A. Sturova</i> ).....	185
10.2. Identification of glycogen phosphorylase inhibitors .....	188
10.2.1. Synthesis of thietane 2-bromo-imidazole-4,5-dicarboxylic acid derivatives ( <i>F. A. Khaliullin, A. R. Valieva</i> ) .....	188
10.2.2. Effect of thietane 2-bromo-imidazole-4,5-dicarboxylic acid derivatives on glycogen phosphorylase (GP) activity ( <i>A. A. Spasov, N. I. Cheplyaeva, D. A. Babkov, E. S. Vorobyov</i> ) .....	190
10.3. Search for $\alpha$ -glucosidase inhibitors .....	191
10.3.1. Synthesis of 2,3,4,5-tetrahydro-[1,3]diazepino [1,2-a]benzimidazoles ( <i>A. S. Morkovnik, T. A. Kuzmenko, L. N. Divaeva, Yu. V. Koschienko, V. A. Anisimova, M. V. Bogoslavtseva</i> ) .....	191
10.3.2. Activity of 2,3,4,5-tetrahydro- [1,3] diazepino [1,2-a] benzimidazoles against $\alpha$ -glucosidase ( <i>A. A. Spasov, N. I. Cheplyaeva, D. A. Babkov, D. A. Aleshin</i> ) .....	193
10.4. Discovery of peroxisome proliferator-activated receptors $\gamma$ agonists .....	194
10.4.1. Synthesis of 2-cyanopropyl(3-phenoxy)benzoate and its derivatives ( <i>Yu. V. Popov, T. K. Korchagina, V. S. Lobasenko</i> ).....	195
10.4.2. Activity of 2-cyanopropyl(3-phenoxy)benzoate and its derivatives as PPAR $\gamma$ agonists ( <i>A. A. Spasov, D. A. Babkov</i> ).....	197
10.5. Assessment of the experimental verification of the consensus antidiabetic activity prediction of novel compounds ( <i>P. M. Vassiliev, A. A. Spasov, V. V. Vorfolomeeva, L. R. Yanaliev</i> ).....	198
10.5.1. General scheme of the prediction accuracy analysis .....	198
10.5.2. Inhibitors of dipeptidyl peptidase 4.....	198
10.5.3. Inhibitors of glycogen phosphorylase .....	199
10.5.4. Inhibitors of $\alpha$ -glucosidase .....	201

10.5.5. Agonists of peroxisome proliferator-activated receptors $\gamma$ .....	203
10.6. Directed search for antidiabetic agents with multitarget action.....	204
11. ANALYSIS OF THE BINDING MECHANISMS OF THE MOST ACTIVE COMPOUNDS WITH SITES OF BIOLOGICAL TARGETS ( <i>P. M. Vassiliev, A. A. Spasov, D. A. Babkov</i> ).....	209
11.1. Inhibitors of dipeptidyl peptidase 4 .....	209
11.2. Inhibitors of glycogen phosphorylase .....	214
11.3. Inhibitors of $\alpha$ -glucosidase .....	218
11.4. Agonists of peroxisome proliferator-activated receptors $\gamma$ .....	223
CONCLUSION .....	228

## Список сокращений

АМФК	– аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа
АОС	– антиоксидантная система
АФК	– активные формы кислорода
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота
ГИП (GIP)	– глюкозозависимый инсулиотропный белок
ГЛЮТ	– транспортеры глюкозы
ГП	– глутатионпероксидаза
ГПП (GLP)	– глюкагоноподобный пептид
ДПП	– дипептидилпептидаза
ИЛ-6	– интерлейкин-6
ИР	– инсулинорезистентность
КПГ	– конечные продукты гликирования белков
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
МТ	– масса тела
НГН	– нарушение гликемия натощак
НПВС	– нестероидные противовоспалительные средства
НТГ	– нарушенная толерантность к глюкозе
ПЖЖ	– поджелудочная железа
ППАР	– рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом
СД	– сахарный диабет
СИР	– субстрат инсулиновых рецептов
ТЗД	– тиазолидиндионы
ФНО (TNF)	– фактор некроза опухоли
цАМФ (сАМР)	– циклический аденозинмонофосфат
С/ЕВР	– ССААТ/энхансер-связывающиеся белки
NHE	– натрий-водородный обменник
NSCCs	– неселективные катионные каналы
VDCCs	– потенциал-зависимые катионные каналы
LBD	– ligand-binding domain, лиганд-связывающий домен
ЯР	– ядерный рецептор
RXR	– ретиноидный X-рецептор
RAR	– рецептор ретиноевой кислоты

# 1. Введение

Нас всех подстерегает случай.

*А. Блок. «Возмездие»*

Успехи в области медицинской химии, молекулярной биологии и биоинформатики привели к использованию прорывных компьютерных технологий в области поиска новых биологически активных соединений и созданию на их основе новых лекарственных средств.

В данной монографии изложен опыт работы специалистов в области фармакологии и компьютерного дизайна Волгоградского государственного медицинского университета и медицинских химиков НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Уральского федерального университета, Башкирского государственного медицинского университета и Волгоградского государственного технического университета.

Выбрав в качестве стратегической цели поиск антидиабетогенных соединений, в монографии подробно описаны инновационные направления выявления соединений для коррекции ключевых звеньев углеводного обмена при сахарном диабете 2-го типа, изложено значение рецепторов PPAR $\gamma$ , ферментов – дипептидилпептидазы типа 4, гликогенфосфоорилазы и  $\alpha$ -глюкозидазы в патогенезе и терапии данного заболевания. Были созданы базы данных лекарственных средств и химических соединений, описанных в литературе, влияющих на данные звенья генеза сахарного диабета 2-го типа. Особое внимание уделено мультитаргетности действия противодиабетических средств.

С помощью консенсусного подхода к поиску *in silico* проведен прогноз активности соединений, имеющихся в библиотеке кафедры фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета и синтезированы их аналоги. Результаты микропланшетного скрининга подтвердили в разной степени выраженную способность производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазина ингибировать дипептидилпептидазу 4, тиетановых производных 2-бро-мимидазол-4,5-дикарбоновой – подавлять активность гликогенфосфоорилазы, 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диа-зепино[1,2-а]бензимидазолов – снижать активность  $\alpha$ -глюкозидазы, среди производных 2-цианопропил(3-фе-нокси)бензоата выявлен агонист рецептора PPAR $\gamma$ . При анализе механизмов связывания наиболее активных соединений с сайтами биомишеней выработаны рекомендации по оптимизации их структуры. Показана возможность прогнозирования мультитаргетного механизма действия биологически активных веществ.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-25-00139).

## **2. Исторические аспекты методологии поиска биологически активных веществ. Поиск биологически активных веществ *in silico***

*П. М. Васильев, А. А. Спасов*

Бурное развитие в начале XX века синтетической органической химии и теории строения органических соединений создало предпосылки для массового синтеза биологически активных веществ. В историческом аспекте для методологического обеспечения поиска перспективных химических соединений использовались различные подходы, начиная с исследований на целых животных, изолированных органах, внутриклеточных органеллах, белковых молекулах – ферментах и рецепторах. В настоящее время активно внедряются вычислительные технологии, основанные на современных достижениях молекулярной биологии, биоинформатики, хемоинформатики и компьютерного дизайна.

Родоначальником планомерного направленного поиска биологически активных соединений следует считать лауреата Нобелевской премии Пауля Эрлиха. Известно, что в процессе создания препарата для лечения сифилиса он синтезировал и испытал на зараженных спирохетой кроликах более 600 новых веществ [Альберт, 1971], в результате чего в 1910 г. был найден препарат сальварсан [Тан, 2010].

Массовый экспериментальный скрининг впервые был реализован немецкой фирмой I.G. Farbenindustrie при поиске синтетических заменителей дорогостоящего природного хинина [Thompson, 2012]. Препараты плазмохин [Schulemann, 1924] и хлорохин [Andersag, 1938] были найдены в результате синтеза и последующего экспериментального изучения на зараженных малярией канарейках около 28 тыс. новых химических соединений.

Несмотря на то, что ферменты были открыты еще в XIX веке, интенсивное их использование в экспериментальном тестировании химических соединений следует относить к концу 1930-х годов, после того, как впервые были получены в чистом виде уреазы и пепсин [Диксон, 1982]. Например, в период с 1936 по 1944 г. фирмой I.G. Farbenindustrie был выполнен синтез



и экспериментальное изучение на ингибирование ацетилхолинэстеразы около 2 тыс. фосфорорганических соединений [Черкес, 1964]. В 1946 г. Лайнусом Полингом была опубликована статья о молекулярной комплиментарности активных центров ферментов к их субстратам и ингибиторам [Pauling, 1946], что стимулировало использованием ферментов для поиска лекарственных веществ. В настоящее время ферментные системы широко используются как в обычном планшетном [Reymond, 2009], так и в высокоскоростном скрининге [Goddard, 2004].

Первые контуры теории мишень-ориентированого действия лекарственных средств были обозначены П. Эрлихом в 1900 г. в виде концепции «магической пули», как основа его работ в области химиотерапии [Tan, 2010]. Практически одновременно с ним Джон Лэнгли сформулировал понятие «рецептивной субстанции» [Machle, 2004]. Дальнейшая эволюция данной теории связана прежде всего с открытием новых рецепторов, которые до начала 1960-х годов находили как результат анализа косвенных данных о действии гормонов, нейромедиаторов или лекарственных веществ [Сергеев, 1999]. Одним из первых, еще в 1905 г., был открыт н-холинорецептор, который Дж. Лэнгли назвал «рецепторное вещество никотина» [Langley, 1905]. В 1936 г. обнаружены гистаминовые рецепторы [Bovet, 1936], а в 1948 г. идентифицированы, как самостоятельные,  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторы [Ahlquist, 1948]. Тем не менее, еще в конце 1950-х годов считалось, что «рецепторы – это гипотетические образования, однако реальность их существования подтверждается вескими доказательствами» [Барлоу, 1959].

Принципиальный скачок в развитии рецепторологии произошел после появления в 1959 радиолигандных методов [Berson, 1959], позволивших выполнять прямую идентификацию хеморецепторов, определять их подтипы и локализацию в органах. В качестве примера можно привести исследование адренорецепторов [Rosell, 1963], обнаружение опиоидных рецепторов [Pert, 1973], идентификацию различных типов дофаминовых рецепторов [Seeman, 1976]. В современных исследованиях радиолигандные методы используются, например, при поиске GPCR-лигандов [Flanagan, 2016], а также в высокоскоростном скрининге [Fallarero, 2012].

В 1951 г. фирмой Rhône-Poulenc, сначала как антигистаминный препарат, был синтезирован и внедрен в клиническую практику первый нейрорептик хлорпромазин [Van, 2007], что стимулировало направлен-

ный поиск рецептор-специфичных лекарственных веществ [Комиссаров, 1969]. Массовый экспериментальный скрининг новых химических соединений на фармакологические виды активности стал возможен в связи с развитием, начиная со второй половины 1950-х годов, методик исследования на изолированных органах [Барлоу, 1956; Гацура, 1974; Ковалев, 1990]. Помимо обычных изолированных препаратов (фрагменты кишечника, сосудов, сердца) для скрининга использовались также форменные элементы крови, на поверхности которых находится значительное число различных рецепторов (например, пуриновый P2Y<sub>1</sub>, серотониновый 5-HT<sub>2a</sub>, β<sub>2</sub>-адренорецептор, дофаминовый D1 и др.) [Kauskot, 2012]. Методы скрининга биологически активных веществ на изолированных органах и тканях успешно применяются и в настоящее время [Radnoti, 2016; Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов ... , 2016].

В «рецепторную эру», которая продолжается и сейчас, было найдено подавляющее большинство применяемых в настоящее время лекарственных препаратов. По состоянию на середину 2000-х годов, из всех используемых в клинике лекарственных средств 47,7 % являются рецептор-специфичными [Сергеев, 1999; Overington, 2006].

Шестидесятые годы XX века отмечены бурным ростом числа новых синтезированных соединений: в 1961 г. было известно 1.75 млн. органических веществ, а в 1973 г. их насчитывалось уже около 6 млн. [Голендер, 1978]. Неудивительно, что идея массового скрининга биологически активных соединений становится все более привлекательной. Так, в 1966 г. при поиске противоопухолевых препаратов в США было синтезировано и испытано примерно 114 тыс. новых химических соединений, найдено 12 лекарственных веществ [Баренбойм, 1986].

Скоро, однако, стало понятно, что тотальный скрининг всех новых соединений на все виды биологической активности осуществить невозможно, из-за его высокой стоимости и значительных временных и материальных затрат. Целостная концепция потокового комбинированного иерархического скрининга впервые была сформулирована и реализована академиком Л.А.Пирузяном в период с 1972 г. по 1984 г. на базе созданного и руководимого им НИИ по биологическим испытаниям химических соединений (НИИ по БИХС) [Медицинская биофизика, 2005, 2006]. Она включала последовательное использование следующих методов: вычислительные → физические, химические, физико-химические →

биофизические → биохимические → клеточные → тканевые → на изолированных органах → на системах органов → на целых животных. Примечательно, что впервые в мировой практике обязательным элементом системы поиска лекарственных веществ стали вычислительные методы прогноза биологической активности, ныне носящие общее название методов *in silico*. К сожалению, созданная Л.А. Пирузяном система иерархического скрининга слишком опередила свое время и не получила должного развития. Сейчас такая схема массового поиска лекарственных веществ является общепринятой.

Совершенствование методов выделения и очистки белков привело к использованию в поиске фармакологически активных веществ изолированных рецепторов. Так, в 1971 был получен чистый м-холинорецептор [Baker, 1971], а во второй половине 1980-х годов по технологии рекомбинантных ДНК получены в очищенном виде ядерные рецепторы стероидных гормонов [Rentier-Delrue, 1990]. Развитие методов высокоафинной хроматографии позволило в концентрированном виде получать плазматические мембраны с локализованными в них трансмембранными рецепторами [Rogl, 1998].

Первые методы скрининга на клеточных культурах появились в конце 1970-х годов, в основном они использовались при поиске противоопухолевых веществ [Salmon, 1980]. С развитием генноинженерных технологий оказалось возможным получать клетки микроорганизмов, дрожжей и эукариотов, на внешней мембране которых экспрессированы рецепторы человека. Для получения таких генетически модифицированных клеток применяются рекомбинантные методы на основе гетерологичной экспрессии с помощью векторных систем [Chaudhuri, 2013]. Первые рекомбинантные ДНК были получены еще в начале 1970-х годов [Cohen, 1973], но широкое использование клеточных технологий в скрининге следует относить к первой половине 1990-х годов [Hertzberg, 1993; Miao, 1993]. В настоящее время это один из основных методов скрининга, практически вытеснивший из практики эксперименты на целых животных и изолированных органах [An, 2010; Nierode, 2016].

Широкое использование в поиске биологически активных веществ ферментов и клеточных культур потребовало создания специальных технологий планшетного скрининга [Weinberger, 2000; Hoever, 2004; Jonkheijm, 2008]. В настоящее время предлагается множество наборов

с разными биологическими субстратами, различные ридеры для чтения планшет, многофункциональные планшетные анализаторы [PerkinElmer, 2016; Tecan, 2016]. Именно планшетные методы легли в основу технологии высокоскоростного скрининга (High-Throughput Screening, HTS), широко применяемого сейчас во всем мире [High Throughput, 2016]. HTS основан на использовании методов комбинаторной химии [Combinatorial, 2000] и планшетного скрининга, реализованных в виде роботизированного комплекса, объединяющего систему подготовки образцов, высокоскоростные чувствительные ридеры с быстро сменяемыми универсальными планшетами и компьютерные средства управления и обработки данных [PerkinElmer, 2016].

Таким образом, в течение 100 лет экспериментальные методы поиска биологически активных веществ проделали путь от экспериментов на целых животных до высокоскоростного планшетного скрининга на рекомбинантных клеточных культурах.

Ожидается, что через 5–10 лет по мере развития методов системной биологии [Palsson, 2015; Medina, 2013], биомедицины [Coveney, 2012] и трансляционной медицины [Пальцев, 2012; Zou, 2013] планшетные и клеточные технологии скрининга существенно потеснят использование экспериментальных животных.

С момента появления в начале XX века первых работ по направленному поиску биологически активных соединений стало очевидным, что если знать зависимость между структурой и биологической активностью, то можно существенно сократить объем работ за счет исключения из синтеза заведомо неактивных по прогнозу веществ. Прежде всего с активностью стали сопоставлять структурные формулы. «Интуитивный» подход к направленному поиску биологически активных соединений основан на выявляемых исследователем эмпирических закономерностях типа «если – то» [Барлоу, 1957]. Подход является классическим и до сих пор успешно применяется. Естественным элементом такого лекарственного конструирования стало использование, в качестве отправной точки, структурной формулы какого-либо природного биологически активного вещества (растительного соединения, нейромедиатора, гормона). Такие подходы к поиску лекарств получили общее название «рациональные» [Belleau, 1970]. Наибольшего расцвета рациональные подходы достигли в период 1950-1960 годов [Hirschmann, 1991], когда были найдены,

например, дротаверин, преднизолон, лидокаин, лабеталол и другие препараты, полученные таким способом. Как логическое развитие классического структурного подхода, в 1964 г. была разработана аддитивная модель Фри-Уилсона, согласно которой активность соединения может быть аппроксимирована суммой вкладов входящих в него заместителей [Free, 1964].

Интуитивные предикаты были не единственным способом прогноза биологической активности химических соединений. Так, еще в 1946–1947 гг. была показана зависимость между канцерогенной активностью ароматических углеводов и их электронными характеристиками, рассчитанными с использованием квантово-химических методов [Pullman, 1946; Daudel, 1948]. С появлением рентгеноструктурного анализа его достижения сразу стали использоваться медицинскими химиками и фармакологами. Например, в 1952 г. была установлена абсолютная стереохимическая конфигурация морфина [Bick, 1952], что было применено для поиска новых опиоидных анальгетиков.

В 1962 г. сотрудник фирмы du Pont de Nemours Корвин Хэнч сформулировал концепцию, в соответствии с которой биологическая активность химического соединения есть функция его электронных, стерических и липофильных параметров [Hansch, 1962]. Впервые было получено регрессионное уравнение [Hansch, 1964], описывающее зависимость роторегулирующей активности производных феноксиуксусной кислоты от их физико-химических свойств. Впоследствии эта концепция получила название «парадигма Хэнча» [Debnath, 2001], она сегодня является базисом для огромного числа работ по компьютерному прогнозу биологической активности химических соединений, в том числе, использующих методы молекулярного моделирования. Корвина Хэнча называют отцом вычислительного конструирования лекарств, фактически он является родоначальником QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) как одной из областей современной науки.

Увлечение регрессией по Хэнчу продолжалось почти 10 лет, вплоть до создания в начале 1970-х годов достаточно развитого аппарата теории распознавания образов (ТРО) [Вапник, 1974]. ТРО решала задачу классификации объектов с разными свойствами в два класса – например, для биологически активных веществ: «активные – неактивные», «высокоактивные – не высокоактивные», «токсичные – нетоксичные» и т.п. Теоретически задача разделения двух нормальных выборок (дискриминантный анализ) была

решена Р.Фишером еще в 1936 г. [Fisher, 1936], но только с появлением достаточно мощной вычислительной техники идеи ТРО стали доступны для практического использования [Джурс, 1977; Голендер, 1978].

Во второй половине 1960-х годов была окончательно сформулирована одна из парадигм химической науки в виде фундаментального постулата: «свойство химического соединения есть функция его структуры». По образному выражению академика Н.С.Зефирова, «структурная формула – это геном свойств химического соединения». По сути это означает, что, имея в своем распоряжении адекватные способы параметризации 2D-структурной формулы и методы извлечения содержащейся в этой формуле информации, исследователь может получить, по нашим оценкам, до 90% сведений о свойствах изучаемого вещества [Васильев, 2006].

В связи с этим стали успешно развиваться новые методы представления структуры химических соединений, помимо физико-химических параметров. В НИИ по БИХС В.В. Авидоном, с привлечением идей химической рецепции, был впервые разработан специализированный язык для фрагментного описания структуры биологически активных веществ – Фрагментарный Код Суперпозиции Подструктур (ФКСП) [Авидон, 1974]. Необходимость содержательного анализа массива структурных фрагментов привела к созданию подструктурного анализа [Cramer, 1975; Авидон, 1978], как одного из первых методов фрагментного подхода в поиске биологически активных веществ. В настоящее время фрагментный подход является одной из парадигм QSAR [Zefirov, Palyulin, 2002], на его основе разработаны десятки систем компьютерного прогноза биологической активности, например, PASS [Filimonov, Poroikov, 2008; Filz, 2012], HIT QSAR [Kuz'min, 2008], SARD-21 [Тюрина, 2007], IT Microcosm [Vassiliev, 2014].

В системе PASS [Poroikov, Filimonov, 2005] около 314 тыс. испытанных соединений описывается почти 76 тыс. фрагментных дескрипторов, что дает возможность прогнозировать более 7.5 тыс. видов биологической активности, сгруппированных по фармакологическим эффектам, механизмам действия, токсическим свойствам, метаболическим видам активности, воздействию на белки-транспортёры, влиянию на экспрессию генов. Системой PASS можно пользоваться online, реализован соответствующий web-ресурс [Filimonov, Lagunin, 2014].

Система HIT QSAR [Kuz'min, 2005, 2008] в качестве фрагментных дескрипторов использует так называемые симплексы – четырехатомные

фрагменты структуры с учетом их стереохимической конфигурации, что, в частности, позволяет прогнозировать биологическую активность стереоизомеров.

Рассмотрение структурной формулы соединения с точки зрения теории графов [Оре, 1980] привело к формированию «графовой» парадигмы, в которой основным элементом описания является целостный молекулярный граф [Химические приложения, 1987]. Наряду с фрагментным, этот подход также был успешно использован в системах компьютерного прогноза биологической активности [Розенблит, 1983; Mahe, 2005; Ivanciuc, 2013].

Система MFTA [Palyulin, 2000] основана на оригинальной концепции построения по структуре испытанных соединений молекулярного суперграфа – своего рода «сверхмолекулы» с заданной активностью. Прогнозную оценку уровня активности неиспытанного соединения находят, вычисляя для его молекулярного графа максимальный подграф вхождения в молекулярный суперграф испытанных соединений [Radchenko, 2008].

Расширение понятия «структура» привело к разработке целого ряда дескрипторов для адекватного представления биологически активных соединений в системах компьютерного прогноза [Раевский, 1999]. В известном справочнике [Todeschini, 2000] описывается примерно 3300 видов молекулярных дескрипторов как фрагментных, так и графовых. В сочетании с современными методами анализа многомерных данных [Statsoft, 2016] это предоставляет исследователю самые широкие возможности для поиска QSAR-закономерностей.

Развитие технологий работы с базами данных привело к появлению понятия «извлечение данных» (data mining) [Aggarwal, 2015], что подразумевает предварительный анализ большого исходного массива данных с учетом его возможной внутренней неоднородности. В настоящее время в эту весьма размытую категорию объединены: традиционные статистические методы восстановления зависимостей и классификации – регрессионный [Дрейпер, 1986, 1987], кластерный [Мандель, 1988], дискриминантный [McLachlan, 1992], факторный анализы [Иберла, 1980], многомерное шкалирование [Дэйвисон, 1988], методы, основанные на деревьях [Breiman, 1984]; методы машинного обучения – Байеса [Хей, 1987], k-ближайших соседей [Віац, 2015], опорных векторов [Vapnik, 1995]; искусственные нейронные сети [Hassoun, 1995].

Особенно интенсивно в начале 1990-х годов в QSAR внедряется методология искусственных нейронных сетей (Artificial Neural Networks, ANN) [Баскин, 1993, 1999], как одна из основных технологий машинного обучения.

Следует отметить, что использование методов искусственного интеллекта для поиска биологически активных веществ началось еще в 1980-х годах на основе булевой [Розенблит, 1983] и индуктивной [Аншаков, 1991] логик. К этому же периоду следует отнести использование в поиске лекарств инженерии знаний и создание на этой основе экспертных систем [Лагунин, 1998; Poroikov, Lagunin, 2005].

Надо отметить, что в настоящее время в хемоинформатике категория «извлечение данных» включена в методы машинного обучения (machine learning), которые объединяют классические методы многомерной статистики, методы классификации, обработку знаний и искусственные нейронные сети [Баскин, 2016].

Параллельно с развитием эмпирических методов исследования зависимостей «структура – активность» развивался аппарат молекулярного моделирования [Leach, 2001; Хельтье, 2013], особенно начиная с середины 1990-х годов, когда появились персональные компьютеры с развитыми графическими интерфейсами и были созданы программы визуализации молекулярных моделей [Richardson, 1992; Sayle, 1995].

Первая пригодная для практического использования параметризация силового поля молекулярной механики MM2 была выполнена в конце 1970-х годов для органических молекул небольшого размера [Burkert, 1982]. Для молекулярного моделирования белков и нуклеиновых кислот первые силовые поля были разработаны, начиная с 1980-х годов: CHARMM [Brooks, 1983], GROMOS [van Gunsteren, 1987], OPLS [Jorgensen, 1988], AMBER [Cornell, 1995].

Центральной идеей всех методов докинга является расчет энергии связывания низкомолекулярного лиганда со специфическим сайтом белка-мишени [Хельтье, 2013]. Первые программы докинга появились в начале 1980-х годов, тогда же, когда были разработаны адекватные силовые поля для моделирования белков. В качестве примера можно привести известные программы DOCK [Ewing, 2001], AutoDock [Goodsell, 1996], FlexX [Cross, 2005], GOLD [Jones, 1997]. В дальнейшем программы докинга стали включать в интегрированные среды молекулярного моде-



лирования, такие, как SYBYL-X Suite [SYBYL-X, 2016], MOE [MOE, 2016], Schrödinger Small-Molecular Drug Discovery Suite [Schrödinger, 2016], BIOVIA Discovery Studio [BIOVA, 2016].

Для моделирования равновесных состояний разработаны пакеты молекулярной динамики, наиболее известными из которых являются GROMACS [Berendsen, 1995], AMBER [Pearlman, 1995], NAMD [Phillips, 2005]. Модули молекулярной динамики обычно входят и в состав интегрированных сред молекулярного моделирования.

Прогресс молекулярной механики определялся достижениями рентгеноструктурного анализа, начиная с 1957 г., когда была определена трехмерная структура гемоглобина [Kendrew, 1958]. С развитием метода ядерно-магнитного резонанса стало возможным исследовать белки не в кристаллическом, а в аморфном состоянии или даже в растворе [Kowalsky, 1962]. В настоящее время рентгеноструктурный анализ и ЯМР являются основными экспериментальными методами изучения трехмерного строения белков и их комплексов с низкомолекулярными соединениями, информация об этом аккумулирована в известном банке данных Protein Data Bank (PDB) [RCSB, 2016]. Поскольку обычно такие комплексы включают в себя селективные лиганды, в 3D-моделях легко установить связывающие аминокислоты специфического сайта, например, с помощью программы LigPlot [Wallace, 1995].

В случае трансмембранных белков, которые очень трудно получить в чистом виде с сохранением нативной конформации, в молекулярном моделировании применяют теоретические модели, построенные по гомологии [Structure-Based, 2007]. Например, выравнивание аминокислотных последовательностей моделируемого белка и экспериментально изученного шаблона выполняют с помощью программы CLUSTAL [Thompson, 1994], затем в программе ROSETTA формируют первичную модель [Das, 2008] и оптимизируют ее методами молекулярной динамики. Практически во всех современных программах докинга предусмотрена возможность расчетного нахождения в теоретических моделях наиболее вероятного сайта связывания. Теоретические модели белков, как и экспериментальные, представлены в нескольких общедоступных базах данных. Наиболее известная из них ModBase [ModBase, 2016] на сегодня содержит более 35.7 млн. моделей.

Как уже упоминалось, методы квантовой химии использовались в прогнозе биологической активности еще в середине 1940-х годов

[Pullman, 1946]. Однако квантово-химические расчеты вычислительно весьма затратны, поэтому широкое применение их в QSAR началось только в 1970-х годах [Kier, 1971]. Полномасштабное моделирование белков методами квантовой химии и сейчас невозможно, несмотря на доступность суперкомпьютерной техники, однако квантовую химию успешно применяют в моделировании низкомолекулярных лигандов [De Benedetti, 2010]. Квантово-химические молекулярные модели можно использовать в 3D-QSAR, например, при анализе методами CoMFA [Cramer, 1988] или CoMSIA [Klebe, 1994]. Разработаны комбинированные методы QM/MM, когда лиганд и связывающие его аминокислоты сайта обрабатываются квантово-химическим методом, а вся остальную часть белка – методом молекулярной механики [Senn, 2009].

Фармакофорная концепция является одной из парадигм методов *in silico* [Pharmacophores, 2009]. Поэтому квантовая химия успешно использовалась, прежде всего, для фармакофорного анализа. Однако были разработаны и иные способы фармакофорного моделирования, реализованные, например, в программе LigandScout [Inte:ligand, 2016]. Пакет Schrödinger [Schrödinger, 2016] предусматривает два способа построения фармакофоров: основанный на структуре лигандов – с помощью модуля Phase; использующий энергии взаимодействия лигандов с сайтом биомишени – с помощью модуля e-Pharmacophores.

Все это многообразие методов успешно используется в виртуальном скрининге известных и новых химических структур [Virtual, 2011], который сейчас предшествует экспериментальному скринингу. Доступность суперкомпьютеров позволяет использовать в виртуальном скрининге как формальные подходы 2D- и 3D-QSAR, так и методы молекулярного моделирования, включая продолжительную молекулярную динамику [Naga, 2016]. Специально для виртуального скрининга сформирована база данных коммерчески доступных веществ ZINC объемом более 35 млн. структур в готовом для докинга 3D-формате [ZINC, 2016], через которую можно приобрести наиболее перспективные по прогнозу соединения.

Появление и развитие биоинформатики [Bioinformatics, 1995] существенно расширило возможности компьютерного поиска лекарственных веществ. Были созданы международные базы данных, аккумулирующие информацию о белках-мишенях, их строении и функциях. На конец октября 2016 г. в наиболее известной базе знаний UniProtKB [UniProt, 2016]

содержатся записи о более чем 71,5 млн. белков, в том числе ссылки на базы данных по экспериментальным и теоретическим 3D-моделям, межбелковым взаимодействиям, специфическим лигандам и т. д.

Впервые полный геном был расшифрован для бактерии *Haemophilus influenza* в 1995 г. [Fleischmann, 1995], а первый полный геном эукариота, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, получен в 1996 г. [Goffeau, 1996]. В 2003 г. был расшифрован полный геном человека [Finishing, 2004]. С появлением таких наук, как геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика, интерактомика [Handbook, 2005], ныне объединенных под общим сокращением «omic's подходы» [Omics, 2013] стали намного понятнее тонкие и сложные механизмы регуляции гомеостаза в человеческом организме и, как следствие, многоаспектное действие лекарственных веществ [OMICS, 2012].

Появилась и бурно развивается новая наука, системная биология [Klipp, 2016], одной из основных задач которой является построение и исследование биологических сетей [Palsson, 2015]. Моделирование смешанных геномно-протеомных, интерактомных, метаболомных сетей, устанавливающих соотношения между различными биомишенями, послужило базисом для создания еще одной новой науки – сетевой фармакологии (network pharmacology) [Hopkins, 2008; Moodley, 2016], в рамках которой действие любого фармакологически активного вещества рассматривалось как мультитаргетное [Designing, 2016]. Разработка полномасштабных моделей, связывающих массив лигандов с массивом множества биомишеней, объединенных в единую сеть, породила проблему «больших данных» (big data) [Costa, 2014; Vajogath, 2016]. Для обработки сверхбольших массивов была создана нейросетевая технология «глубокого обучения» (deep learning) [LeCun, 2015; Gawehn, 2016], которая позволяет, например, проводить построение многоцелевых моделей для 40 млн. пар белок-лиганд и 256 биомишеней или 2 млн. лигандов, взаимодействующих с 1280 биомишенями [Баскин, 2016].

Следует подчеркнуть, что в рамках полифармакологии [Лиц, 2013; Anighoro, 2014; Tan, 2016] идеи мультитаргетности [Ma, 2010; Koutsoukas, 2011] и полифункциональности [Stahl, 2009; Bansal, 2014] рассматриваются как рабочие парадигмы создания новых лекарств в XXI веке.

По мере развития методов *in silico* для поиска фармакологически активных соединений стало очевидно, что плохие фармакокинетические и

токсикологические показатели могут свести на нет высокую фармакологическую активность. В идеологии массового виртуального скрининга новых химических структур произошла инверсия – до прогноза полезных эффектов стали оценивать показатели ADMET (Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) [Kerns, 2008].

Концептуальной публикацией в этом направлении стала работа Липински [Lipinski, 1997], в которой была сформулирована парадигма лекарственного подобия (drug-likeness) и предложено знаменитое «правило пяти» для расчетной оценки этого важного интегрального свойства новых молекул. В настоящее время разработано большое число подобных правил. Например, в программе DruLiTo [Drug, 2015] используется 8 фильтров лекарственного подобия: Lipinski, Ghose, CMC-50, Veber, MDDR, BBB, UQED, WQED. Модуль QikProp системы Schrödinger [QikProp, 2015] позволяет по структурной формуле соединения рассчитывать 35 различных показателей лекарственного подобия, в том числе характеризующих биодоступность, всасываемость в ЖКТ, связывание с сывороточным альбумином, проникновение через ГЭБ, острую токсичность.

Широкое распространение получили консенсусный подход к поиску *in silico* биологически активных соединений, называемый также ансамблевым или комитетным [Hewitt, 2007; Shao, 2010; Pissurlenkar, 2011; Sun, 2014]. В его основе лежит естественный постулат о том, что при совпадении прогнозных оценок, полученных с использованием нескольких QSAR-моделей, их ошибки взаимно компенсируются [Vassiliev, 2014]. Например, консенсусным методом успешно выполнены прогнозы следующих видов активности: генотоксичности [Votano, 2004], канцерогенной [Lagunin, 2009], ингибирующей ацетилхолинэстеразу [Kuz'min, 2009], противогриппозной [Sharma, 2012].

Как итог, необходимо отметить, что сегодня в системе CAS зарегистрировано почти 125 млн. соединений [CAS, 2016]. Уже смоделировано полное химическое пространство, включающее все стабильные структуры, состоящие из 17 атомов C, N, O, S и галогенов – всего более 166 млрд. структур [Ruddigkeit, 2012]. Альтернативы использованию в скрининге методов *in silico* нет, ибо синтезировать и испытать все эти соединения невозможно.

## Литература

1. Авидон В.В. Критерии сравнения химических структур и принципы построения информационного языка для информационно-логической системы по биологически активным соединениям // Хим.-фарм. журн. – 1974. – Т. 8. – № 8. – С. 22-25.
2. Авидон В.В., Аролович В.С., Козлова С.П., Пирузян Л.А. Статистическое исследование информационного массива по биологически активным соединениям. 3. Прогнозирование биологической активности по методу подструктурного анализа // Хим.-фарм. журн. – 1978. – Т. 12. – № 6. – С. 99-106.
3. Альберт Э. Избирательная токсичность / Пер. с англ., М.: Мир, 1971. – 431 с.
4. Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов: химия, фармакология, клиника: монография / под ред. А.А. Спасова, В.И. Петрова, В.И. Минкина. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – 548 с.
5. Аншаков О.М., Скворцов Д.П., Финн В.К. О логической конструкции ДСМ-метода автоматического порождения гипотез // Докл. АН СССР. – 1991. – Т. 320. – № 6. – С. 1331-1334.
6. Баренбойм Г.М., Маленков А.Г. Биологически активные вещества. Новые принципы поиска. – М.: Наука, 1986. – 363 с.
7. Барлоу Р. Введение в химическую фармакологию. – М.: ИЛ, 1959. – 463 с.
8. Баскин И.И., Маджидов Т.И., Варнек А.А. Методы машинного обучения / Введение в хемоинформатику: учеб. пособие. – Ч. 4. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2016. – 330 с.
9. Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. Вычислительные нейронные сети как альтернатива линейному регрессионному анализу при изучении количественных соотношений «структура-свойство» на примере физико-химических свойств углеводов // Докл. РАН. – 1993. – Т. 332. – № 6. – С. 713-716.
10. Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. Применение искусственных нейронных сетей в химических и биохимических исследованиях // Вестник МГУ. Серия 2. Химия. – 1999. – Т. 40. – № 5. – С. 323-326.
11. Вапник В.Н., Червоненкис А.Я. Теория распознавания образов (статистические проблемы обучения). – М.: Наука, 1974. – 416 с.
12. Васильев П.М., Спасов А.А. Языки фрагментарного кодирования структуры соединений для компьютерного прогноза биологической активности // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева). – 2006. – Т. 50. – № 2. – С. 108-127.
13. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. – М.: Медицина, 1974. – 143 с.
14. Голендер В.Е., Розенблит А.Б. Вычислительные методы конструирования лекарств. – Рига: Зинатне, 1978. – 238 с.

15. Джурс П., Айзенауэр Т. Распознавание образов в химии. – М.: Мир, 1977. – 230 с.
16. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Т. 1-3. – 1120 с.
17. Дрейпер Н., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ. В 2-х кн. – М.: Финансы и статистика, 1986, 1987. – 717 с.
18. Дэйвисон М. Многомерное шкалирование. – М.: Финансы и статистика, 1988. – 254 с.
19. Иберла К. Факторный анализ. – М.: Статистика, 1980. – 398 с.
20. Ковалев В.Г. Ноотропные средства. – Волгоград: Ниж.-Волж. кн. изд-во, 1990. – 368 с.
21. Комиссаров И.В. Элементы теории рецепторов в молекулярной фармакологии. – М.: Медицина, 1969. – 143 с.
22. Лагунин А.А., Филимонов Д.А., Поройков В.В. Экспертная система для интерпретации результатов прогноза спектра биологической активности веществ // Тез. докл. V Всероссийского Национального конгресса «Человек и лекарство» (М., 22-24 апр. 1998 г.). – М., 1998. – С. 582.
23. Мандель И.Д. Кластерный анализ. – М.: Финансы и статистика, 1988. – 176 с.
24. Медицинская биофизика. Биологические испытания химических соединений. В 2 т. Т. 1. Уроки истории. – М.: Медицина, 2005. – 844 с.
25. Медицинская биофизика. Биологические испытания химических соединений. В 2 т. Т. 2. Документы. – М.: Медицина, 2006. – 752 с.
26. Пальцев М.А., Белушкина Н.Н. Трансляционная медицина – новый этап развития молекулярной медицины // молекулярная медицина. – 2012. – № 4. – 4 с.
27. Раевский О.А. Дескрипторы молекулярной структуры в компьютерном дизайне биологически активных веществ // Успехи химии. – 1999. – Т. 68. – № 6. – С. 555-576.
28. Розенблит А.Б., Голендер В.Е. Логико-комбинаторные методы в конструировании лекарств. – Рига: Зинатне, 1983. – 352 с.
29. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ. – Волгоград: Семь ветров, 1999. – 640 с.
30. Тюрина Л.А., Тюрина О.В., Колбин А.М. Методы и результаты дизайна и прогноза биологически активных веществ. – Уфа: Гилем, 2007. – 336 с.
31. Хей Дж. Введение в методы байесовского статистического вывода. – М.: Финансы и статистика, 1987. – 336 с.
32. Хельтзе Х.-Д., Зиппл В., Роньян Д. и др. Молекулярное моделирование: теория и практика. – М.: Изд-во «БИНОМ. Лаборатория знаний», 2013. – 319 с.
33. Химические приложения топологии и теории графов / Под ред. Р. Кинга. – М.: Мир, 1987. – 560 с.

34. Черкес А.И., Луганский Н.И., Родионов П.В. Руководство по токсикологии отравляющих веществ. – Киев: Здоровье, 1964. – 464 с.
35. Aggarwal C.C. Data Mining: The Textbook. – Cham (Switzerland): Springer, 2015. – 734 p.
36. Ahlquist R.P. A study of the adrenotropic receptors // *Am. J. Physiol.* – 1948. – V. 153. – № 3. – P. 586-600.
37. An W.F., Tolliday N. Cell-based assays for high-throughput screening // *Mol. Biotechnol.* – 2010. – V. 45. – № 2. – P. 180–186.
38. Andersag H., Breitner S., Jung H. Quinoline compound and process of making the same // Patent US2233970 (USA). – 1938.
39. Anighoro A., Bajorath J., Rastelli G. Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery // *J. Med. Chem.* – 2014. – V. 57. – № 19. – P. 7874-7887.
40. Bajorath J., Overington J., Jenkins J.L. et al. Drug discovery and development in the era of Big Data // *Future Med. Chem.* – 2016. – V. 8. – № 15. – P. 1807–1813.
41. Baker R.W., Chothia C.H., Pauling P. et al. Structure and activity of muscarinic stimulants // *Nature.* – 1971. – V. 230. – P. 439–445.
42. Ban T.A. Fifty years chlorpromazine: a historical perspective // *Neuropsychiatr. Dis Treat.* – 2007. – V. 3. – № 4. – P. 495–500.
43. Bansal Y., Silakari O. Multifunctional compounds: smart molecules for multifactorial diseases // *Eur. J. Med. Chem.* – 2014. – V. 76. – P. 31–42. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.01.060. Epub 2014 Jan 31.
44. Belleau B. Rational drug design: mirage or miracle? // *Can. Med. Assoc. J.* – 1970. – V. 103. – № 8. – P. 850–853.
45. Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation // *Comp. Phys. Comm.* – 1995. – V. 91. – № 1-3. – P. 43–56.
46. Berson S.A., Valow R.S. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods // *Nature.* – 1959. – V. 184. – Suppl. 21. – P. 1648–1649.
47. Biau G., Devroye L. Lectures on the Nearest Neighbor Method / Springer Series in the Data Sciences. – Cham (Switzerland): Springer. – 2015. – 290 p.
48. Bick I.R.C. Absolute stereochemical configuration of morphine // *Nature.* – 1952. – V. 169. – P. 755–756.
49. Bioinformatics: From Nucleic Acids and Proteins to Cell Metabolism / Eds. Schomburg D., Lessel U. / Gbf Monographs. – Book 18. – Hoboken (USA): Wiley-Blackwell, 1995. – 196 p.
50. BIOVIA Discovery Studio: Официальный сайт компании Dassault Systemes (France) [Электронный ресурс]. URL: <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/> (дата обращения 28.10.2016).
51. Bovet D., Staub A. Action protectrice des ethers phenoliques au cours de l'intoxication histaminique // *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* – 1936. – V. 124. – P. 547–549.

52. Breiman L., Friedman J., Stone C.J. et al. Classification and Regression Trees. – Boca Raton (USA): Chapman and Hall/CRC, 1984. – 368 p.
53. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D. et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations // J. Comp. Chem. – 1983. – V. 4. – № 2. – P. 187–217.
54. Burkert U., Allinger N.L. Molecular Mechanics. – Washington, D.C. (USA): ACS, 1982. – 340 p.
55. CAS: A Division of the American Chemical Society: Официальный сайт American Chemical Society [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cas.org/> (дата обращения 28.10.2016).
56. Chaudhuri K. Recombinant DNA Technology. – New Dely (India): TERI Press, 2013. – 298 p.
57. Cohen S., Chang A., Boyer H. et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1973. – V. 70. – № 11. – P. 3240–3244.
58. Combinatorial Chemistry: A Practical Approach / Ed. Fenniri H. / Practical Approach Series. – Book 233. – New-York: Oxford University Press, 2000. – 526 p.
59. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I. et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules // J. Am. Chem. Soc. – 1995. – V. 117. – P. 5179–5197.
60. Costa F.F. Big data in biomedicine // Drug Discov. Today. – 2014. – V. 19. – № 4. – P. 433–440.
61. Coveney P.V., Shublaq N.W. Computational biomedicine: a challenge for the twenty-first century // Stud. Health Technol. Inform. – 2012. – V. 174. – P. 105–110.
62. Cramer R.D., Patterson D.E., Bunce J.D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins // J. Am. Chem. Soc. – 1988. – V. 110. – № 18. – P. 5959–5967.
63. Cramer R.D., Redl G., Berkoff C.E. Substructural analysis. Novel approach to the problem of drug design // J. Med. Chem. – 1974. – V. 17. – № 5. – P. 533–535.
64. Cross S.S.J. Improved FlexX docking using FlexS-determined base fragment placement // J. Chem. Inf. Model. – 2005. – V. 45. – № 4. – P. 993–1001.
65. Das R., Baker D. Macromolecular modeling with ROSETTA // Annu. Rev. Biochem. – 2008. – V. 77. – P. 363–382.
66. Daudel R. Sur les applications de in mecanique ondulatoire a l'etude des phenomenes de cancerisation // Bull. Cancer. – 1948. – V. 35. – P. 110–124.
67. De Benedetti P.G., Fanelli F. Computational quantum chemistry and adaptive ligand modeling in mechanistic QSAR // Drug Discov. Today. – 2010. – V. 15. – № 19–20. – P. 859–866.
68. Debnath A.K. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) paradigm – Hansch era to new millennium // Mini Rev. Med. Chem. – 2001. – V. 1. – № 2. – P. 187–195.



69. Designing Multi-Target Drugs / Eds. Morphy J.R, Harris C.J. / Drug Discovery / Ser. Ed. Rotella D. – Book 21. – London: Royal Society of Chemistry, 2016. – 394 p.

70. Drug Likeness Tool (DruLiTo): Официальный сайт National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER S.A.S.) [Электронный ресурс]. URL: [http://www.niper.gov.in/pi\\_dev\\_tools/DruLiTo\\_Web/DruLiTo\\_index.html](http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiTo_Web/DruLiTo_index.html) (дата обращения 23.06.2015).

71. Ewing T.J.A., Makino S., Skillman A.G. et al. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases // J. Comput. Aided Mol. Des. – 2001. – V. 15. – № 5. – P. 411–428.

72. Fallarero A., Pohjanoksa K., Wissel G. et al. High-throughput screening with a miniaturized radioligand competition assay identifies new modulators of human  $\alpha$ -adrenoceptors // Eur. J. Pharm. Sci. – 2012. – V. 47. – № 5. – P. 941–951.

73. Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A. et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource // Chem. Heterocycl. Compd. – 2014. – V. 50. – № 3. – P. 444–457.

74. Filimonov D.A., Poroikov V.V. Probabilistic approach in activity prediction // Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening / Eds. Varnek A., Tropsha A. Cambridge (UK): Royal Society of Chemistry Publishing, 2008. – 356 p. – P. 182–216.

75. Filz O.A., Lagunin A.A., Filimonov D.A. et al. *In silico* fragment-based drug design using PASS approach // SAR & QSAR Environ. Res. – 2012. – V. 23. – № 3–4. – P. 279–296.

76. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium // Nature. – 2004. – V. 431. – P. 931–945.

77. Fisher R.A. The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems // Annals of Eugenics. – 1936. – V. 7. – № 2. – P. 179–188.

78. Flanagan C.A. GPCR-radioligand binding assays // Methods. Cell Biol. – 2016. – V. 132. – P. 191–215.

79. Fleischmann R.D., Adams M.D., White O. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd // Science. – 1995. – V. 269. – P. 496–512.

80. Free S.M., Wilson J.W. A mathematical contribution to structure-activity studies // J. Med. Chem. – 1964. – V. 7. – № 4. – P. 395–399.

81. Gawehn E., Hiss J.A., Schneider G. Deep Learning in Drug Discovery // Mol. Inform. – 2016. – V. 35. – P. 1. – P. 3–14.

82. Goddard J.P., Reymond J.L. Enzyme assays for high-throughput screening // Curr. Opin. Biotechnol. – 2004. – V. 15. – № 4. – P. 314–322.

83. Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H. et al. Life with 6000 genes // Science. – 1996. – V. 274. – P. 546, 563–567.

84. Goodsell D.S., Morris G.M., Olson A.J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock // J. Mol. Recognit. – 1996. – V. 9. – № 1. – P. 1–5.

85. Haga J.H., Ichikawa K., Date S. Virtual Screening Techniques and Current Computational Infrastructures // *Curr. Pharm. Des.* – 2016. – V. 22. – № 23. – P. 3576–384.
86. Handbook of Genome Research, Two Volume Set: Genomics, Proteomics, Metabolomics, Bioinformatics, Ethical and Legal Issues / Ed. Sensen C.W. – Hoboken (USA): Wiley-Blackwell, 2005. – 646 p.
87. Hansch C., Fujita T.  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure // *J. Am. Chem. Soc.* – 1964. – V. 86. – № 8. – P. 178–180.
88. Hansch C., Maloney P.P., Fujita T. et al. Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients // *Nature.* – 1962. – V. 194. – P. 178–180.
89. Hassoun M.H. Fundamentals of Artificial Neural Networks. – Cambridge (USA): MIT Press, 1995. – 544 p.
90. Hertzberg R.P. Whole cell assays in screening for biologically active substances // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1993. – V. 4. – № 1. – P. 80–84.
91. Hewitt M., Cronin M.T., Madden J.C. et al. Consensus QSAR models: do the benefits outweigh the complexity? – *J. Chem. Inf. Model.* – 2007. – V. 47. – № 4. – P. 1460–1468.
92. High Throughput Screening: Methods and Protocols / Ed. Janzen W.P. / *Methods in Molecular Biology.* – Book 1439. – New-York: Humana Press, 2016. – 308 p.
93. Hirschmann R. Medicinal chemistry in the golden age of biology: lessons from steroid and peptide research // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1991. – V. 30. – P. 1278–1301.
94. Hoever M., Zbinden P. The evolution of microarrayed compound screening // *Drug Discov. Today.* – 2004. – V. 9. – № 8. – P. 358–365.
95. Hopkins A.L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery // *Nat. Chem. Biol.* – 2008. – V. 4. – № 11. – P. 682–690.
96. Inte:ligand: Официальный сайт компании Inte:Ligand GmbH [Электронный ресурс]. URL: <http://www.inteligand.com/> (дата обращения 24.10.2016).
97. Ivanciuc O. Chemical graphs, molecular matrices and topological indices in chemoinformatics and quantitative structure-activity relationships // *Curr. Comput. Aided Drug. Des.* – 2013. – V. 9. – № 2. – P. 153–163.
98. Jones G., Willett P., Glen R.C. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking // *J. Mol. Biol.* – 1997. – V. 267. – № 3. – P. 727–748.
99. Jonkheijm P., Weinrich D., Schröder H. et al. Chemical strategies for generating protein biochips // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2008. – V. 47. – № 50. – P. 9618–9647.
100. Jorgensen W.L., Tirado-Rives J. The OPLS Force Field for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. – *J. Am. Chem. Soc.* – 1988. – V. 110. – № 6. – P. 1657–1666.

101. Kauskot A., Hoylaerts M.F. Platelet Receptors // *Antiplatelet Agents* / Eds. Gresele P., Born G.V.R., Patrono C. et al. / *Handbook of Experimental Pharmacology* / Ser. Eds. Beavo J.A., Barrett J.E., Ganten D. et al. – Vol. 210. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. – 616 p. – P. 23-57.
102. Kendrew J.C., Bodo G., Dintzis H.M. et al. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis // *Nature*. – 1958. – V. 181. – P. 662-666.
103. Kerns E.H., Di L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*. – Burlington (USA): Academic Press (Elsevier Inc.), 2008. – 552 p.
104. Kier L. B. *Molecular orbital theory in drug research*. – New-York: Academic Press, 1971. – 258 p.
105. Klebe G., Abraham U., Mietzner T. Molecular similarity indexes in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological-activity // *J. Med. Chem.* – 1994. – V. 37. – № 24. – P. 4130-4146.
106. Klipp E., Liebermeister W., Wierling C. et al. *Systems Biology: A Textbook*. – Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016. – 504 p.
107. Koutsoukas A., Simms B., Kirchmair J. et al. From in silico target prediction to multi-target drug design: current databases, methods and applications // *J. Proteomics*. – 2011. – V. 74. – № 12. – P. 2554-2574.
108. Kowalsky A. Nuclear magnetic resonance studies of proteins // *J. Biol. Chem.* – 1962. – V. 237. – P. 1807-1819.
109. 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. Mol. Model.* – 2005. – V. 11. – № 6. – P. 457-467.
110. Kuz'min V.E., Artemenko A.G., Muratov E.N. Hierarchical QSAR technology based on the simplex representation of molecular structure // *J. Comput. Aided Mol. Des.* – 2008. – V. 22. – № 6-7. – P. 403-421.
111. Kuz'min V.E., Muratov E.N., Artemenko A.G. et al. Consensus QSAR modeling of phosphor-containing chiral AChE inhibitors // *QSAR Comb. Sci.* – 2009. – V. 28. – № 6-7. – P. 664-677.
112. Lagunin A., Filimonov D., Zakharov A. et al. Computer-aided prediction of rodent carcinogenicity by PASS and CISOC-PSCT // *QSAR Comb. Sci.* – 2009. – V. 28. – № 8. – P. 806-809.
113. Langley J.N. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curare // *J. Physiol.* – 1905. – V. 33. – № 4-5. – P. 374-413.
114. Leach A.R. *Molecular modelling: principles and application* / 2-nd ed. – Harlow, England: Pearson Education, 2001. – 744 c.
115. LeCun Y., Bengio Y., Hinton G. Deep learning // *Nature*. – 2015. – V. 521. – P. 436-444.

116. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 1997. – V. 23. – № 1-3. – P. 3-25.

117. Liu X., Zhu F., Ma X.H. et al. Predicting targeted polypharmacology for drug repositioning and multi-target drug discovery // *Curr. Med. Chem.* – 2013. – V. 20. – № 13. P. 1646-1661.

118. Ma X.H., Shi Z., Tan C. et al. In-silico approaches to multi-target drug discovery : computer aided multi-target drug design, multi-target virtual screening // *Pharm. Res.* – 2010. – V. 27. – № 5. – P. 739-749.

119. Maehle A.-H. «Receptive Substances»: John Newport Langley (1852–1925) and his Path to a Receptor Theory of Drug Action // *Med. Hist.* – 2004 – V. 48. – № 2. – P. 153-174.

120. Mahe P., Ueda N., Akutsu T. et al. Graph Kernels for Molecular Structure–Activity Relationship Analysis with Support Vector Machines // *J. Chem. Inf. Model.* – 2005. – V. 45. – № 4. – P. 939-951.

121. McLachlan G.J. Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition. – Toronto (Canada): Wiley-Interscience, 1992. – 526 p.

122. Medina M.A. Systems biology for molecular life sciences and its impact in biomedicine // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2013. – V. 70. – № 6. – P. 1035-1053.

123. Miao F., Todd P., Kompala D.S. A single-cell assay of beta-galactosidase in recombinant *Escherichia coli* using flow cytometry // *Biotechnol. Bioeng.* – 1993. – V. 42. – № 6. P. 708-715.

124. Moda T.L., Andricopulo A.D. Consensus hologram QSAR modeling for the prediction of human intestinal absorption // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2012. – V. 22. – № 8. – P. 2889-2893.

125. ModBase: Database of Comparative Protein Structure Models: Официальный сайт Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences and California Institute for Quantitative Biomedical Research, University of California San Francisco (USA) [Электронный ресурс]. URL: <https://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/index.cgi> (дата обращения 28.10.2016).

126. MOE: Molecular Operating Environment: Официальный сайт компании Chemical Computing Group Inc. (Canada) [Электронный ресурс]. URL: [https://www.chemcomp.com/MOE-Molecular\\_Operating\\_Environment.htm](https://www.chemcomp.com/MOE-Molecular_Operating_Environment.htm) (дата обращения 28.10.2016).

127. Moodley D., Yoshida H., Mostafavi S. et al. Network pharmacology of JAK inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – V. 113. – № 35. – P. 9852-9857.

128. Nierode G., Kwon P.S., Dordick J.S., Kwon S.J. Cell-Based Assay Design for High-Content Screening of Drug Candidates // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – V. 26. – № 2. – P. 213-225.

129. Omics for Personalized Medicine / Eds. Barh D., Dhawan D., Ganguly N.K. – New Delhi: Springer India, 2013. – 832 p.

130. OMICS: Biomedical Perspectives and Applications / Eds. Barh D., Blum K., Madigan M.A. – Boca Raton (USA): CRC Press Taylor & Francis Group, 2012. – 622 p.
131. Overington J.P., Al-Lazikani B., Hopkins A.L. How many drug targets are there? // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2006. – V. 5. – № 12. – P. 993-996.
132. Palsson B.O. *Systems Biology. Constraint-based Reconstruction and Analysis.* – New-York: Cambridge University Press, 2015. – 550 p.
133. Palyulin V.A., Radchenko E.V., Zefirov N.S. Molecular Field Topology Analysis method in QSAR studies of organic compounds // *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* – 2000. – V. 40. – № 3. – P. 659-667.
134. Pauling L. *Molecular Architecture and Biological Reactions* // *Biol. Sci.* – 1946. – V. 24. – № 25. – P. 1375-1377.
135. Pearlman D.A., Case D.A., Caldwell J.W. et al. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules // *Comp. Phys. Comm.* – 1995. – V. 91. – № 1-3. – P. 1-41.
136. PerkinElmer: Lab Products & Services: Официальный сайт компании PerkinElmer Inc. (USA) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.perkinelmer.com/lab-solutions> (дата обращения 28.10.2016).
137. Pert C.B., Snyder S.H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue // *Science.* – 1973. – V. 179(4077). – P. 1011-1014.
138. *Pharmacophores and Pharmacophore Searches* / Eds. Langer T., Hoffmann R.D. / *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* / Ser. Eds. Mannhold R., Kubinyi H., Folkers G. – Vol. 32. – Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. – 395 p.
139. Phillips J.C., Braun R., Wang W. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD // *J. Comput. Chem.* – 2005. – V. 26. – № 16. – P. 1781-1802.
140. Pissurlenkar R.R., Khedkar V.M., Iyer R.P. et al. Ensemble QSAR: a QSAR method based on conformational ensembles and metric descriptors // *J. Comput. Chem.* – 2011. – V. 32. – № 10. – P. 2204-2218.
141. Poroikov V., Filimonov D. PASS: Prediction of Biological Activity Spectra for Substances // *Predictive Toxicology* / Ed. Helma C. – New-York: CRC Press, Taylor & Francis, 2005. – 520 p. – P. 459-478.
142. Poroikov V., Lagunin A., Filimonov D. Pharmaexpert: diseases, targets and ligands – three in one // *QSAR and Molecular Modelling in Rational Design of Bioactive Molecules: Proceedings of the European Symposium on Structure-Activity Relationships (QSAR) and Molecular Modelling, 15th (Istanbul, Turkey, Sept. 5-10, 2004)* / Eds. Sener E.A., Yalcin I. – Ankara (Turkey): CADD & D Society, 2005. – P. 514-515.
143. Pullman A. Structure electronique et pouvoir cancerigene des hydrocarbures aromatiques condenses // *Bull. Assoc. Franc. l'Etude du Cancer.* – 1946. – V. 33. – P. 120-130.

144. QikProp: Rapid ADME predictions of drug candidates: Официальный сайт компании Schrödinger, LLC, 2015.
145. Оре О. Теория графов. – М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1980 – 336 с.
146. Radchenko E.V., Palyulin V.A., Zefirov N.S. Molecular Field Topology Analysis in drug design and virtual screening // *Cheminformatics Approaches to Virtual Screening* / Eds. Varnek A., Tropsha A. Cambridge (UK): Royal Society of Chemistry Publishing, 2008. – 356 p. – P. 150-181.
147. Radnoti: Setting the Standard in Isolated Perfusion: Официальный сайт компании Radnoti LLC (USA) [Электронный ресурс]. URL: <http://radnoti.com/> (дата обращения 28.10.2016).
148. RCSB PDB: Официальный сайт Protein Data Bank of The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics [Электронный ресурс]. URL: <http://www.pdb.org/> (дата обращения 26.10.2016).
149. Rentier-Delrue F., Voz M., Martial J.A. The possibilities of recombinant DNA technology for the elucidation of the structure of steroid receptors and their mode of action // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1990. – V. 342. – P. 163-167.
150. Reymond J.L., Fluxa V.S., Maillard N. Enzyme assays // *Chem. Commun. (Camb)*. – 2009. – V. 7. – № 1. – P. 34-46.
151. Richardson D.C., Richardson J.S. The kinemage: a tool for scientific communication // *Protein Sci.* – 1992. – V. 1. – № 1. – P. 3-9.
152. Rogl H., Kosemund K., Kuhlbrandt W. et al. Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography // *FEBS Lett.* – 1998. – V. 432. – № 1-2. – P. 21-26.
153. Rosell S., Kopin I.J., Axelrod J. Fate of H3-noradrenaline in skeletal muscle before and following sympathetic stimulation // *Am. J. Physiol.* – 1963. – V. 205. – P. 317-321.
154. Ruddigkeit L., van Deursen R., Blum L.C. et al. Enumeration of 166 billion organic small molecules in the chemical universe database GDB-17 // *J. Chem. Inf. Model.* – 2012. – V. 52. – № 11. – P. 2864-2875.
155. Salmon S.E. Applications of the human tumor stem cell assay to new drug evaluation and screening // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1980. – V. 48. – P. 291-312.
156. Sayle R.A., Milner-White E.J. RASMOL: biomolecular graphics for all // *Trends Biochem. Sci.* – 1995. – V. 20. – № 9. – P. 374-376.
157. Schrödinger Small-Molecular Drug Discovery Suite: A comprehensive suite to accelerate lead discovery and lead optimization: Официальный сайт компании Schrödinger LLC (USA) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.schrodinger.com/suites/small-molecule-drug-discovery-suite> (дата обращения 28.10.2016).
158. Schulemann W., Schönhöfer F., Wingler A. Verfahren zur Darstellung N-substituierter Aminochinoline // Patent DE486079 (Deutschland). – 1924.

159. Seeman P., Chau-Wong M., Tedesco J. et al. Dopamine receptors in human and calf brains, using [3H]apomorphine and an antipsychotic drug // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1976. – V. 73. – № 12. – P. 4354-4358.
160. Senn H.M., Thiel W. QM/MM methods for biomolecular systems // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2009. – V. 48. – № 7. – P. 1198-1229.
161. Shao L., Wu L., Fan X. et al. Consensus ranking approach to understanding the underlying mechanism with QSAR // *J. Chem. Inf. Model.* – 2010. – V. 50. – № 11. – P. 1941-1948.
162. Sharma N., Yap C.W. Consensus QSAR model for identifying novel H5N1 inhibitors // *Mol. Divers.* – 2012. – V. 16. – № 3. – P. 513-524.
163. Stahl S.M. Multifunctional drugs: a novel concept for psychopharmacology // *CNS Spectr.* – 2009. – V. 14. – № 2. – P. 71-73.
164. Statsoft®: Электронный учебник по статистике: Официальный сайт компании StatSoft Inc. (USA) [Электронный ресурс]. URL: <http://statsoft.ru/home/textbook/default.htm> (дата обращения 28.10.2016).
165. Structure-Based Drug Discovery / Eds.: Jhoti H., Leach A.R. – Dordrecht (Netherlands): Springer, 2007 – 250 p.
166. Sun X.Q., Chen L., Li Y.Z. et al. Structure-based ensemble-QSAR model: a novel approach to the study of the EGFR tyrosine kinase and its inhibitors // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2014. – V. 35. – № 2. P. 301-310.
167. SYBYL-X Suite: Molecular Modeling from Sequence Through Lead Optimization: Официальный сайт компании Certara USA Inc. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.certara.com/software/molecular-modeling-and-simulation/sybyl-x-suite/>
168. Tan S.Y., Grimes S. Paul Ehrlich (1854-1915): man with the magic bullet // *Singapore Med. J.* – 2010. – V. 51. – № 11. – P. 842-843.
169. Tan Z., Chaudhai R., Zhang S. Polypharmacology in Drug Development: A Minireview of Current Technologies // *ChemMedChem.* – 2016. – V. 11. – № 12. – P. 1211-1218.
170. Tecan: Multimode readers with bright field imaging: Официальный сайт компании Tecan Trading AG (Switzerland) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.tecan.com/> (дата обращения 28.10.2016).
171. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – V. 22. – № 22. – P. 4673-480.
172. Thompson P.E. Antimalarial Agents: Chemistry and Pharmacology. – New-York: Academic Press, 2012. – 408 p.
173. Todeschini R., Consonni V., Handbook of Molecular Descriptors // *Methods and Principles in Medicinal Chemistry.* – Vol. 11 / Eds.: Mannhold R., Kubinyi H., Timmerman H. – Weinheim: Wiley-VCH, 2000. – 668 p.

174. UniProt: UniProtKB: Официальный сайт UniProt Consortium [Электронный ресурс]. URL: <http://www.uniprot.org/help/uniprotkb> (дата обращения 28.10.2016).

175. Van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C. Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual. – Groningen (Netherlands): Biomos, 1987. – P. 1-221.

176. Vapnik V.N. The Nature of Statistical Learning Theory. – New-York: Springer-Verlag, 1995. – 187 p.

177. Vassiliev P.M., Spasov A.A., Kosolapov V.A. et al. Consensus Drug Design Using IT Microcosm // Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine / Eds. Gorb L., Kuz'min V., Muratov E. / Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics / Ser. Ed. J. Leszczynski. – Vol. 17. – Dordrecht (Netherlands): Springer Science + Business Media, 2014. – 550 p. – P. 369-431.

178. Virtual Screening: Principles, Challenges, and Practical Guidelines / Ed. Sottriffer C. / Methods and Principles in Medicinal Chemistry / Ser Eds. Mannhold R., Kubinyi H., Folkers G. – Vol. 48. – Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. – 550 p.

179. Votano J.R., Parham M., Hall L.H. et al. Three new consensus QSAR models for the prediction of Ames genotoxicity // Mutagenesis. – 2004. – V. 19. – № 5. – P. 365-377.

180. Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions // Protein Eng. – 1995. – V. 8. – № 2. – P. 127-134.

181. Weinberger S.R., Morris T.S., Pawlak M. Recent trends in protein biochip technology // Pharmacogenomics. – 2000. – V. 1. – № 4. – P. 395-416.

182. Zefirov N.S., Palyulin V.A. Fragmental approach in QSPR // J. Chem. Inf. Comput. Sci. – 2002. – V. 42. – № 5. – P. 1112-1122.

183. ZINC: Официальный сайт University of California San Francisco (USA) [Электронный ресурс]. URL: <http://zinc.docking.org/> (дата обращения 28.10.2016).

184. Zou J., Zheng M.W., Li G. et al. Advanced systems biology methods in drug discovery and translational biomedicine // Biomed. Res. Int. – 2013. – Pub. 742835.



### **3. Научные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета**

*В. И. Петров, А. А. Спасов, К. В. Ленская, Н. И. Чепляева*

Сахарный диабет 2 типа (СД 2) представляет собой серьезную медико-социальную проблему, значимость которой обусловлена его высокой распространенностью, сохраняющейся тенденцией к росту числа больных, хроническим течением, высокой инвалидизацией и смертностью больных в результате развития поздних сосудистых осложнений (микро-, макроангиопатии), а также необходимостью создания системы специализированной помощи больным [International Diabetes Federation; 2001; Дедов, 2008].

Не менее тревожным является и тот факт, что СД 2 занимает третье место среди непосредственных причин смерти после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [Manson, 1991; Niskanen, 1998; International Diabetes Federation, 2001]. По статистическим данным, каждые 6–7 пациентов из 10 погибают от макроангиопатических осложнений диабета [International Diabetes Federation, 2001]. Причем, наряду с распространенностью СД нарастают и социально-экономические потери, связанные с развитием тяжелых инвалидизирующих осложнений [Stratton, 2000; Дедов, 2003; Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов ... , 2016].

Как известно, причиной развития и прогрессирования осложнений заболевания является именно хроническая гипергликемия [Дедов, 2003]. В отношении эффективного управления СД существуют убедительные доказательства, свидетельствующие, что улучшение гликемического контроля может значительно уменьшить риск развития как микро-, так и макроангиопатии [Чепурнова, 2010]. Исходя из этого, основной целью лечения болезни является как можно более полная компенсация нарушенного углеводного обмена [Волчегарский, 2000]. Следует отметить, что за прошедшие 20 лет цели лечения СД кардинально изменились [Дедов, 2007]. До недавнего времени доминирующая цель терапии диабета заключалась лишь в устранении симптомов гипергликемии, таких как жажда, полиурия, слабость. В настоящее время эффективное управление

СД направлено на предохранение  $\beta$ -клеток поджелудочной железы от истощения, создание оптимального баланса глюкозы в организме, предотвращение и/или замедление прогрессирования как микро-, так и макрососудистых осложнений заболевания, которые приводят к инвалидизации пациентов и ранней смертности.

Как хорошо известно, в основе развития СД 2 лежат три основных эндокринных дефекта: нарушение секреции инсулина, инсулинорезистентность жировой и мышечной тканей и инсулинорезистентность печени [Дедов, 2007]. Резистентность к инсулину может уменьшаться в результате снижения веса и/или фармакотерапии гипергликемии, однако она редко восстанавливается до нормальной. Секреция инсулина у этих больных неполноценна и недостаточна для того, чтобы компенсировать инсулинорезистентность [Дедов, 2003, 2007].

Развитие сахарного диабета [Дедов, 2008] можно представить в виде процесса, который протекает в следующие фазы:

**1 фаза** – наличие первичной инсулинрезистентности (снижение чувствительности тканей к инсулину) и других генетически обусловленных нарушений, способствующих снижению действия инсулина;

**2 фаза** – адаптация аппарата поджелудочной железы к повышенной потребности в инсулине, позволяющая обеспечить образование инсулина в таком количестве, которое необходимо для преодоления имеющейся инсулиновой резистентности. Это сопровождается нормализацией состояния углеводного обмена и увеличением (гиперплазией)  $\beta$ -клеток островкового аппарата, в которых синтезируется инсулин;

**3 фаза** – умеренная декомпенсация островкового аппарата поджелудочной железы, проявляющаяся в изменении уровня глюкозы в крови натощак и /или нарушении толерантности к глюкозе. Это состояние обозначают как преддиабет;

**4 фаза** – выраженная декомпенсация  $\beta$ -клеток островкового аппарата поджелудочной железы, сопровождающаяся клинической манифестацией (симптомами) сахарного диабета. При этом существует возможность компенсации диабета при помощи диеты и сахароснижающих лекарственных препаратов;

**5 фаза** – декомпенсация, сопровождающаяся структурными изменениями  $\beta$ -клеток и недостаточностью секреции инсулина. При этом за счет лечения пероральными глюкозоснижающими препаратами невозможно

добиться компенсации сахарного диабета, что диктует необходимость введения инсулина. В результате возникает инсулинзависимый диабет второго типа.

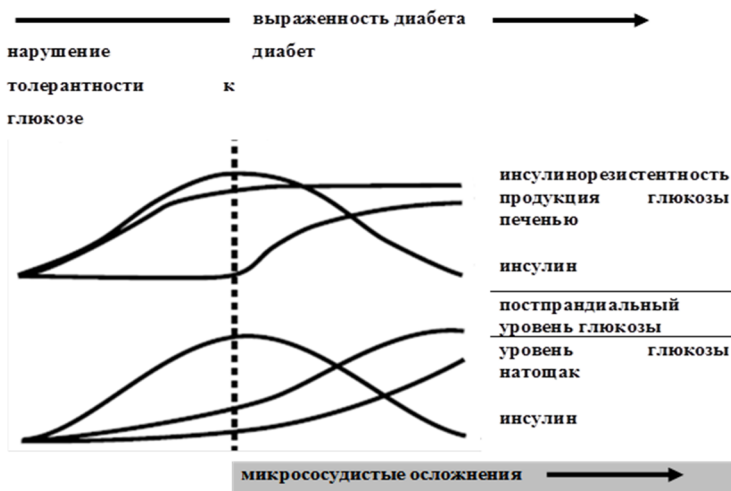


Рис. 3.1. Изменение основных метаболических параметров при формировании СД [Capasso, 2006]

Препараты для фармакологической коррекции сахарного диабета типа 2, используемые в клинике в настоящее время, представлены следующими группами: секретогены инсулина (производные сульфонилмочевины, постпрандиальные регуляторы секреции инсулина), бигуаниды (метформин), сенситайзеры инсулина (розиглитазон, пиоглитазон), инкретиномиметики [Дедов, 2007].

Широкая распространенность сахарного диабета и многообразие патогенетических вариантов данного заболевания, обуславливает актуальность поиска и разработки новых пероральных противодиабетических препаратов.

В последнее время при терапии инсулиннезависимого СД предпочтение отдается средствам, способным не только компенсировать диабет, но и задерживать развитие и прогрессирование его осложнений. В комплексной терапии с этой целью используют реокорректоры, антиокси-

данты и другие группы лекарственных средств. Тем не менее, для ряда препаратов выбора имеются существенные ограничения в использовании, из-за риска развития побочных эффектов.

В связи с этим, в настоящее время, ведется поиск новых веществ, способных не только регулировать гомеостаз глюкозы, но и предупреждать риск возникновения осложнений СД, является актуальным и имеет перспективность.

Современные течения поиска гипогликемических средств включают в себя несколько направлений [Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов ... , 2016]:

1. Нормализация механизмов биологического действия инсулина и снижение инсулиновой резистентности.
2. Восстановление нормальной функции механизмов, регулирующих секрецию инсулина.
- 3 Восстановление физиологических механизмов секреции инсулина.
4. Угнетение скорости образования глюкозы печенью.
5. Усиление выделения углеводов через почки.
6. Ингибирование апоптоза и стимуляция регенерации  $\beta$ -клеток.
7. Новые направления (антагонисты меланокортин, агонисты соматостатина, модуляторы цитокинов, ингибиторы карнитин-пальмитил-трансферазы)

### **Нормализация механизмов биологического действия инсулина и снижение инсулиновой резистентности**

Основные мишени – ИВК-киназа, тирозинфосфатазы (PTPs),  $\delta$  диаглицеролкиназа (DAG),  $\beta_3$ -адрено-рецепторов, PPAR $\gamma$ .

**ИКВ киназа** – молекула, моделирующая сигнальные пути инсулина и участвующая в механизмах инсулиновой резистентности типа  $\beta$  (ИКК $\beta$ ), которая также является отрицательным регулятором сигнальных путей инсулина и активатором транскрипционного фактора NF – K $\beta$  (не исключается, что именно ИКК $\beta$  опосредует инсулинрезистентную активность ФНО- $\alpha$ ) [15].

У больных СД2 выявлено повышение содержания маркеров воспаления (СРБ, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ ), их взаимосвязь с тяжестью вегетативных нарушений, дисфункцией эндотелия, что подтверждает роль воспаления в патогенезе поражения нервной системы [Rybalkin, 2003]. Извест-

но, что улучшение компенсации углеводного обмена происходит за счет уменьшения секреции гормонов жировой ткани, в частности,  $\alpha$ -ФНО.

Один из механизмов снижения инсулиновой резистентности связан с созданием веществ, влияющих на клеточные **тирозинфосфатазы (PTPs)**, повышенный уровень активности которых мышечной и жировой тканях выявляется у больных, страдающих ожирением и СД типа 2, что коррелирует со степенью инсулиновой резистентности [Дедов, 2000]. Дефосфорилирование инсулинового рецептора, наступающего под воздействием указанных клеточных тирозинфосфатаз, сопровождается деактивированием сигнальных путей действия инсулина [Rybalkin, 2003].

Международному коллективу учёных [Chibalin et al., 2008] удалось найти фермент, играющий ключевую роль в развитии резистентности к инсулину – это  **$\delta$  диаглицеролкиназа (DAG)**. DAG оказался ключевым звеном в двух цепочках – передачи инсулинового сигнала внутри клетки и энергетического обмена. При его недостатке клетки остаются глухими к отчаянным инсулиновым «просьбам» организма потреблять больше глюкозы, а жиры (липиды) остаются не окисленными, во всё большем количестве откладываясь в белой жировой ткани. Этот фермент сам по себе «глюкозозависимый», то есть его количество в клетке зависит от концентрации глюкозы, при этом, чем больше её в крови, тем меньше фермента вырабатывается. Чем больше глюкозы, тем меньше фермента, тем хуже передаётся сигнал от инсулиновых рецепторов внутрь клетки, тем меньше глюкозы забирается из крови и тем ещё больше глюкозы в ней остаётся.

Параллельно развивается ожирение → ткани не реагируют на инсулин → уровень глюкозы в крови растёт → инсулина выделяется все больше → производящие его клетки истощаются, что сочетается с нарушением работы нервной ткани и почек → начинается диабет [Дедов, 2000, 2008; Rybalkin, 2003].

Нарушение липидного обмена, приводящее к повышенному уровню ЖК в сыворотке крови и их внутриклеточному накоплению, что наблюдается при СД 2 типа, является одно из причин печеночной и инсулиновой резистентности скелетных мышц. Повышения содержания триглицеридов и ЖК в  $\beta$ -клетках сопровождается нарушением их функции с участием PPAR $\alpha$ . Как показали исследования [Дедов, 2000, 2003] – новый агонист рецепторов PPAR $\alpha$  значительно снижают уровень триглицеридов

и ЖК в сыворотке крови в мышцах у трансгенных животных – модель СД 2-го типа.

**PPAR $\gamma$**  регуляция модулируется антидиабетическими агентами [Forman, et al, 1996]. Сейчас белки PPAR выделяют в семейство ядерных рецепторов, связанных с метаболизмом жирных кислот [Gallwitz, 2010]. PPAR $\gamma$  специфически активируется тиазолидиндионами – группой противодиабетических лекарств. Среди данной новой группы веществ выделяют производные тиазолидиндионов (DRF-2189, KRP-297) и вещества, не являющиеся по химической структуре тиазолидиндионами (ITT-501, BSM-298585 (Muraglitazar), AZ-242 (Tesaglitazar), NNC 61-0029 (Ragaglitazar)).

Изучение фармакологической активности  **$\beta_3$ -адренорецепторов** проводили в экспериментах на мышах. Была определена гипогликемическая активность, что позволило определить данную группу как важную мишень, которая в дальнейшем может более подробно, изучена для получения лекарственных средств для лечения ожирения и сахарного диабета [Bharatam, 2007].

### **Восстановление нормальной функции механизмов, регулирующих секрецию инсулина**

Для восстановления нормальной функции механизмов, регулирующих секрецию инсулина можно использовать каннабиноидные рецепторы (CB1) и ингибиторы глюкозо-6-фосфатазы.

Глюкозо-6-фосфатаза – это фермент, находящийся в печени и катализирующий заключительный этап превращения глюкозо-6-фосфата в глюкозу, в процессах гликогенолиза и гликонеогенеза [Rybalkin, 2003]. Замедление или ингибирование активности этого фермента – один из методов, используемых в лечении сахарного диабета и ожирения [Senzaki, 2001, Bharatam, 2007].

В литературе описана важная роль эндогенной каннабиноидной системы в регуляции аппетита и метаболизма липидов. Недавно, было опубликовано предположение о роли CB1, в развитии ожирения, резистентности к инсулину и вызванных этими процессами поздними осложнениями. Это привело к идее использования антагонистов CB1 рецептора как нового класса соединений, используемых для лечения диабета [Bharatam, 2007, Gallwitz, 2010].

## **Восстановление физиологических механизмов секреции инсулина**

Еще одно направление в лечении сахарного диабета 2 типа основано на использовании инкретинового эффекта. Инкретины выделяются в ответ на прием пищи, оказывают мощное глюкозозависимое действие, тем самым играя ключевую роль в поддержании уровня глюкозы в крови. Инкретиномиметики (глюкагоноподобный пептид (GLP-1), ингибиторы ДПП4 (дипептидилпептидазы 4) – стимулируют секрецию инсулина и ингибируют секрецию глюкагона, тормозят процессы апоптоза  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и усиливают их регенерацию, что позволяет достичь пролонгированного эффекта и воздействовать на одно из звеньев патогенеза заболевания [Draznin, 1987; Ross, 2010]. К препаратам, используемым в терапии СД 2-го типа, относятся эксенатид, лираглутид (GLP-1) и ситаглиптин, вилдаглиптин (ингибиторы ДПП4) [Gallwitz, 2010]. Эксенатид (Баета) является первым представителем лекарственного класса инкретиномиметиков, агонистом GLP-1, синтетической формой экзендина-4, первоначально выделенного из слюны ядовитой южноамериканской ящерицы. Еще один препарат, аналог человеческого GLP-1, представляющий собой на 97% гомологичную структуру нативному человеческому GLP-1 – лираглутид (Виктоза) [Ranganath, 2008; Chena, 2007]. Наличие данных препаратов только в инъекционных формах несколько ограничивает их применение. Помимо этого, ведется поиск низкомолекулярных агонистов GLP-1 среди замещенных хиноксалина и производных циклобутана, которые возможно будут применяться в пероральной терапии СД [Hinnen, 2006; Dharmalingam, 2011].

### **Соединения, снижающие продукцию глюкозы печенью**

Инсулин является основным гормональным регулятором гомеостаза глюкозы в организме, а его относительная или абсолютная недостаточность и/или инсулинорезистентность приводит к дисбалансу между поступлением глюкозы и ее утилизацией периферическими тканями. Глюконеогенез является естественным метаболическим процессом, поддерживающим оптимальный уровень глюкозы в период между приемами пищи. Однако при сахарном диабете, как вследствие снижения уровня инсулина, так и вследствие резистентности тканей к инсулиновому сигналу, активируется процесс синтеза глюкозы в печени из неуглеводных

источников. Таким образом, повышение продукции глюкозы печенью является одним из основных и ведущих факторов в патогенезе сахарного диабета и требует дополнительной фармакологической коррекции. Следует отметить, что повышение глюконеогенеза в печени в 3 раза и более, наблюдающееся при умеренной недостаточности инсулина, связано с тем, что для угнетения глюконеогенеза требуется сравнительно больше количества инсулина, чем для угнетения гликогенолиза [Felig, 1971].

Регуляция метаболизма углеводов в печени является точкой приложения для действия новых препаратов для лечения сахарного диабета, которые активно разрабатываются в мире. Метформин является единственным препаратом, ингибирующим глюконеогенез в печени, однако данный эффект связан со снижением печеночной инсулинорезистентности. Согласно данным Long Y.C. и соавт., метформин стимулирует АМФ-активируемую протеинкиназу и внутриклеточный сигнал истощения запасов энергии, что приводит к повышению захвата глюкозы скелетными мышцами и торможению глюконеогенеза [Long, 2006]. Следует отметить, что повышение чувствительности периферических тканей к инсулину при применении данного препарата неустойчиво. Кроме того, бигуаниды способствуют увеличению концентрации лактата, пирувата, аланина, что связано с нарушением их клиренса вследствие изменения активности митохондриального пируватдегидрогеназного комплекса и, как следствие, развитием лактат-ацидоза. Риск развития лактат-ацидоза увеличивается при заболеваниях почек, печени и сердечно-сосудистой системы, что ограничивает применение препарата [Alice, 2005].

Перспективными направлениями создания новых лекарственных препаратов для терапии сахарного диабета является регуляция ключевых ферментов углеводного обмена, активация ферментов гликолиза и синтеза гликогена (гликогенсинтазы, гексокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы) и ингибирование ферментов глюконеогенеза и гликогенолиза (гликогенфосфорилаза, фруктозобифосфатазы, фосфоенолпируваткарбоксилаза) [Wu, 2005].

Активно ведется поиск препаратов – активаторов гексокиназы, однако все исследования находятся на доклиническом этапе и лишь некоторые соединения проходят клинические испытания. Данный класс препаратов является весьма перспективным, так как гексокиназа не только контролирует переход глюкозы в гликоген, но и является глюкозным



сенсором инсулинопродуцирующих клеток поджелудочной железы, что позволит препарату воздействовать на два основных звена патогенеза сахарного диабета: дисфункцию  $\beta$ -клеток и продукцию глюкозы печенью. Среди соединений, способных активировать гексокиназу в зависимости от фармакофора, располагающегося в центре молекулы выделяют четыре основных класса: с углеродом в центре (RO0281675, RO4389620, LY2121260, PsN-GK1), с ароматическим кольцом (GKA-50), с аминокислотой и другими структурами [Matschinsky, 2009].

В качестве эффективных антидиабетических препаратов могут применяться селективные ингибиторы киназы гликогенсинтазы типа 3. Так, у солей лития были обнаружены инсулиноподобные свойства, которые возможно связаны с ингибированием киназы гликогенсинтазы, однако следует помнить, что ионы лития селективны не только к данному ферменту, но также ингибируют инозитолмонофосфатазу и могут вмешиваться в инозитидный цикл [Matschinsky, 2010; Meijer, 2004]. Низкомолекулярные ингибиторы киназы гликогенсинтазы типа 3 активно разрабатывались исследовательской группой компании GlaxoSmithKline, ими были получены производные малеимидов SB-216763 и SB-415286, которые стимулировали синтез гликогена изолированными гепатоцитами человека. Кроме того, производные аминопиримидина, СТ98014 и СТ98023, эффективно блокировали киназу гликогенсинтазы и увеличивали синтез гликогена, а также повышали инсулинопосредованный захват глюкозы периферическими тканями при экспериментальном сахарном диабете [Woodgett, 2003].

S-3483 – производное хлорогеновой кислоты, ингибитор глюкозо-6-фосфатазы, на модели перфузии изолированной печени крыс дозозависимо подавлял глюконеогенез и гликогенолиз [Andreas, 1998]. Широко исследуются соединения из группы ингибиторов фруктозо-1,6-бисфосфатазы, так CS-917 (MB 06322) супрессировал глюконеогенез на различных генетических моделях СД (ZDF и GK крысы) и снижал уровень глюкозы в плазме у пациентов с сахарным диабетом. Ведется поиск ингибиторов гликогенфосфорилазы. Выявлен ряд соединений с данным видом активности: производные дигидропиримидина, которые эффективны в условиях *in vitro* и на экспериментальных моделях сахарного диабета [Bergans, 2000].

Таким образом, поиск препаратов, снижающих продукцию глюкозы печенью, является одним из приоритетных направлений в диабетологии.

### **Ингибиторы $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ обменника**

Существует несколько общих путей внутриклеточной регуляции секреции и действия инсулина. Возможно, недостаточность этих функций объясняется одним общим биохимическим дефектом [RuizPalomo, 1993]. Известно, что фосфолипаза С стимулирует высвобождение инсулина из  $\beta$ -клеток [Metz, 1987]. Фосфолипаза С способствует образованию инозитол-3-фосфата и диацилглицеридов путем гидролиза фосфоинозитидов [Bharatam, 2007]. Гиперактивность  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  антипортера может создавать порочный круг, в котором повышение  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  обмена провоцирует увеличение концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  и последующую активацию фосфолипазы А2. Происходящее в результате этого образование арахидоновой кислоты порождает дальнейшую активацию фосфолипазы С, вызывая новую мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  и активацию протеинкиназы С, замыкая, таким образом, круг, запущенный  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  обменником [RuizPalomo, 1993]. Все звенья этой цепи могут приводить к повышению секреции инсулина  $\beta$ -клетками [Efendic, 1991]. Гиперинсулинемия обеспечивает повышенную активность  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  – обменника в тканях-мишенях, приводя к повышению уровня цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  [MahnenSmith, 1985].

Накоплены данные о взаимосвязи между длительным повышением концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и инсулинорезистентностью. Существуют определенные значения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле, в рамках которых осуществляется действие инсулина. Этот оптимум колеблется от 140 до 370 нМ  $\text{Ca}^{2+}$ , и отклонение уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в любую из сторон вызывает снижение чувствительности к инсулину [Draznin, 1987].

### **Соединения, ингибирующие апоптоз и стимулирующие регенерацию $\beta$ -клеток поджелудочной железы**

Хроническая гипергликемия при сахарном диабете приводит к нарушениям функций инсулинопродуцирующих клеток, которые со временем становятся необратимыми. Токсическое действие высоких концентраций глюкозы связано с десенситизацией  $\beta$ -клеток, снижением высвобождения, а затем синтеза и депонирования инсулина. Данные изменения связаны со снижением экспрессии гена инсулина и связаны с дефектом посттранскрипционного созревания мРНК PDX-1. Ингибирование сигнального пути инсулина/инсулиноподобного ростового фактора следующее за

снижением экспрессии транскрипционного фактора PDX-1 основной механизм индукции апоптоза  $\beta$ -клеток [Fujimoto, 2009].

Кроме того, определенный вклад вносят свободнорадикальные процессы, индуцированные при повышении содержания глюкозы, так длительная экспозиция изолированных островков крысы с АФК приводила к супрессии синтеза мРНК, активности промотора гена инсулина и связывания ДНК с транскрипционными факторами PDX-1 и Maf A, основных регуляторов синтеза инсулина, процессов дифференцировки и регенерации  $\beta$ -клеток [Robertson, 2004].

Первым из средств, применяемых для профилактики повреждения инсулиносекреторных клеток поджелудочной железы, является никотинамид.

In vivo никотинамид повышает репликацию  $\beta$ -клеток, в трансплантируемых островках, стимулирует регенерацию у животных с частичной панкреатэктомией, предотвращает повреждение поджелудочной железы при стрептозотоциновым диабетом, улучшает инсулиносекреторную функцию у пациентов с высоким риском развития СД типа 1 [Yonemura, 1984]. Механизм действия никотинамида связан с угнетением активности поли-(АДФ-рибозо)-полимеразы (ПАРП) и (моно)АДФ-рибозилтрансфераз, что предотвращается снижение уровня  $NAD^+$  в  $\beta$ -клетках, что важно для синтеза инсулина и контроля аутоиммунных процессов, в частности, экспрессии генов HLA II класса [Gallwitz, 2010]. По данным ряда авторов, терапия никотинамидом приводит к существенному увеличению частоты клинической ремиссии заболевания со снижением потребности в экзогенном инсулине [Pozzilli, 1997]. Однако передозировка никотинамида (более 2 мг/кг) может приводить к повышению концентрации его метаболита,  $N^1$ -метилникоти-намида потенциального триггера окислительного стресса и инсулинорезистентности при СД типа 2 [Zhou, 2009]. Клинические исследования о профилактическом действии данного препарата противоречивы и требуют дальнейшего уточнения.

Ведется поиск новых высокоселективных ингибиторов ПАРП-1 среди различных классов веществ. Ингибиторы ПАРП разделяют на две основных группы: производные нуклеиновых кислот и нуклеозидов и ингибиторы, созданные с учетом строения каталитического центра фермента (PJ-34 и INO-1001) [Jagtap, 2005]. Некоторые из этих соединений проходят 1 и 2 фазу клинических испытаний [Szabo, 2006].

Перспективным классом соединений, ингибирующих апоптоз и стимулирующих регенерацию  $\beta$ -клеток, являются агонисты GLP-1 рецепторов и ингибиторы ДПП4, так как GLP-1 не только опосредует глюкозостимулированную секрецию инсулина, но и регулирует процесс дифференцировки клеток-предшественников в инсулинопродуцирующие, усиливает процессы пролиферации и неогенеза в островках Лангерганса и резистентность к апоптозу [Szabo, 2006, Li, 2005].

INGAP (islet neogenesis associated protein – островковый неогенезис-ассоциированный белок) – один из первых кандидатов для создания препаратов, индуцирующих неогенезис островков, выделенный из протоков поджелудочной железы хомячков. Результаты исследований *in vitro* на животных и человеке подтвердили активность пептида, INGAP повышает уровень С-пептида у пациентов с сахарным диабетом типа 1 и улучшает контроль уровня глюкозы у пациентов с сахарным диабетом типа 2.

Проводятся исследования по применению в качестве протектора от свободнорадикальных повреждений и апоптоза поджелудочной железы, миметика СОД, АЕОЛ10150 (manganese [III] 5,10,15,20-tetrakis [1,3-diethyl-2imidazolyl] manganese-porphyrin pentachloride). При инкубации соединения с клетками островков снижалась способность NF- $\kappa$ B связываться с ДНК и повышать экспрессию генов некроза и апоптоза, уменьшалась активация ПАРП [Bottino, 2004].

### **Группа новых мишеней противодиабетических средств**

Существует группа перспективных мишеней (антагонисты меланокортина, агонисты соматостатина, модуляторы цитокинов, ингибиторы карнитин-пальмитил-трансферазы), которых начали изучать относительно недавно, и поэтому экспериментальных и клинических данных недостаточно.

#### **Антагонисты меланокортина**

Изучение влияния внутрижелудочкового введения различных агонистов и антагонистов меланокортиновых рецепторов на пищевое поведение показало, что МС4 рецепторы регулируют потребление пищи и энергетический гомеостаз не только у млекопитающих, но и у птиц [Bharatam, 2007]. Механизмы действия МС4 рецепторов на потребление пищи до конца не изучены. Некоторые данные говорят о взаимодействии этих

рецепторов с системой лептина. Так, блокатор MC4R HS014 подавляет эффекты лептина на пищевое поведение [Wikberg, 1999]. Кроме того, животные с нокаутом MC4 рецепторов не реагировали на введение лептина. Таким образом, возможно действие лептина на пищевое поведение опосредуется через MC4 рецепторы.

### **Модуляторы цитокинов (хемокинов)**

К хемокинам относят большой субкласс цитокинов – растворимых низкомолекулярных гормоноподобных иммуномодуляторов, обладающих свойствами хемоаттрактантов, то есть цитокинов, которые контролируют миграцию различных видов лейкоцитов, имеющих к ним рецепторы, из кровяного русла в ткани, очаги воспаления, аутоиммунного процесса и опухоли [Chang, 2005]. Ряд ученых выявили значительную роль хемокинов в патогенезе инсулиновой резистентности, метаболического синдрома (МС), СД и тесно связанных с этой патологией таких тяжелых заболеваний, как атеросклероз, артериальная гипертензия, сердечно-сосудистая недостаточность. Установлено, что между уровнем ряда цитокинов и инсулиновой резистентностью, выраженностью МС, риском развития атеросклероза и кардиоваскулярных заболеваний, СД 2 имеется прямая зависимость [Noll, 1995].

### **Агонисты соматостатина**

Соматостатин угнетает выработку гипофизом гормона роста и синтез ферментов клетками экзокринной части поджелудочной железы, а также выделение инсулина и глюкагона  $\beta$ - и  $\alpha$ -клетками.

Соматостатин – пептидный гормон, ингибирующий секрецию множества других гормонов и моноаминов. Соматостатин тормозит высвобождение тиротропина и кортикотропина из гипофиза, глюкагона и инсулина из поджелудочной железы. Гипоталамический соматостатин обеспечивает ингибиторный контроль гормона роста в передней доле гипофиза. Функционально коррелирует с веществом Р как в мозговых структурах, так и на периферии, однако сведения о взаимодействии соматостатина с другими химическими регуляторами немногочисленны. В основной структуре 12-членного пептида цистеиновые аминокислотные остатки образуют циклическую форму [Wallace, 1993].

### **Ингибиторы карнитин-пальмитил-трансферазы**

Окисление жирных кислот с высвобождением энергии протекает в печени, скелетных и сердечной мышцах, жировой ткани и в почках. В мозговой ткани основным источником энергии служит глюкоза. Доставка жирных кислот к месту их окисления, то есть к митохондриям, осуществляется с различными транспортными белками: альбумин осуществляет транспорт жирных кислот в клетку, а внутри цитозоля в их транспорте принимают участие специальные белки, связывающие и транспортирующие жирные кислоты (fatty acid binding proteins, FABP). Окисление жирных кислот – сложный и многоступенчатый процесс.

Для инициации процесса окисления жирная кислота должна быть обязательно активирована (СЖК являются метаболически инертными), что и осуществляется на наружной поверхности мембраны митохондрия с помощью коэнзима А (HS-CoA) и ионов  $Mg^{2+}$  при участии ацил-СоА синтетазы. Образовавшийся жирнокислотный ацил-СоА с помощью переносчика (шатла), которым является карнитин, и при обязательном участии карнитин-пальмитилтрансферазы-1 (КАТ-1, контролирующая комплексообразование карнитина с жирнокислотным ацил-СоА) [McGarry, 1978].

На основе литературных данных становится ясно, что рациональные подходы, используемые для любой парадигмы создания новых антидиабетических средств, могут быть разделены на две категории – поиск новых мишеней действия, их лигандов или их аналогов. Это указывает на применимость молекулярных исследований для анализа взаимодействия рецептора и лекарственного средства, изучение фармакокинетических особенностей потенциальных антидиабетических препаратов. Ожидается, что идентификация цели и ее структурный анализ будет способствовать облегчению поиска новых антидиабетических средств. Таким образом, создание лекарственных средств, способных влиять на факторы, непосредственно участвующие в патогенезе СД, а также не только корректирующих уровень гликемии, но и существенным образом влияющих на течение заболевания и способствующих профилактике его осложнений, представляется весьма актуальным.

## Литература

1. Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов: химия, фармакология, клиника: монография / под ред. А.А. Спасова, В.И. Петрова, В.И. Минкина. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – 548 с.
2. Волчегарский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. – Челябинск, 2000. – 16 с.
3. Дедов И.И. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. – М., 2007.
4. Дедов И.И. Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия. М., Универсум Паблишинг, 2000г., с.239.
5. Дедов И.И. Шестакова М.В. Сахарный диабет. М., Универсум Паблишинг, 2003 г., с. 231–242; 244–256; 263–267, 282–289.
6. Дедов И.И., Шестакова М.В., Сунцов Ю.И. Сахарный диабет в России: проблемы и решения. –М., 2008. –С. 3-6.
7. Дедов И.И., Шестакова М.В. Сахарный диабет. Руководство для врачей. Универсум Паблишинг, М., 2003.
8. Чепурнова М.В., М.П. Воронкова, Н.И.Чепляева. Комбинированная терапия сахарного типа 2 типа. Ж-л Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы II Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии») – стр. 26, 2010.
9. Alice, Y.Y. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus / Y.Y. Alice, I. Cheng, G. Fantus // CMAJ. – 2005. – V. 172, № 2. – P.213–226.
10. Andreas H. W., Burger H.-J., Schwab D. et al. Pharmacodynamic profile of a novel inhibitor of the hepatic glucose-6-phosphatase system. // Am. J. Physiol. 1998. 274 (Gastrointest. Liver Physiol. 37): G1087–G1093,
11. Bharatam P.V., Patel D.S.// Current pharmaceutical design -2007-V.13-P.3518- 3530.
12. Bottino, R. Response of Human Islets to Isolation Stress and the Effect of Antioxidant Treatment / R. Bottino, A.N. Balamurugan, H. Tse // Diabetes. – 2004. – V. 53. – P. 2559-2568.
13. Capasso G., Evangelista C., Zacchio M. Acid-base transport in Henle's loop: the effects of reduced renal mass and diabetes // J. Nephrol. – 2006. – Vol. 19, Suppl. 9. – S. 11–17.
14. Chang Y., Piao S.L., Gao S. et al. Regulatory effects of micronutrient complex on the expression of Th1and Th2 cytokines in diabetic C57BL mice // Wei Sheng Yan Jiu. 2005. V. 34, №1. P. 64–66.

15. Chena D., Liaoa J., Lia, N. et al. A nonpeptidic agonist of glucagon-like peptide 1 receptors with efficacy in diabetic db/ db mice // PNAS January 16, 2007 vol. 104 no. 3 p. 943–948.
16. Chibalin A.V. et al. Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance // Cell. – 2008. – V. 132. – No. 3. – P. 375-386.
17. Crino, A. A randomized trial of nicotinamide and vitamin E in children with recent onset type 1 diabetes (IMDIAB IX) / A. Crino, R. Schiaffini1, S. Manfrini // European Journal of Endocrinology. – 2004. – V. 150. – P. 719-724.
18. Dharmalingam M., Sriram U., Baruah M. P. Liraglutide: A review of its therapeutic use as a once daily GLP-1 analog for the management of type 2 diabetes mellitus // Indian J Endocrinol Metab. 2011 Jan-Mar; 15(1): 9–17.
19. Draznin B. et al. // J. Biol. Chem.-1987-V.262-P.14385.
20. Dungan K.M., Buse J.B., Ratner R.E. Effects of therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus with a peptide derived from islet neogenesis associated protein (INGAP) // Diabetes Metab. Res. Rev. 2009 Sep;25(6):558-65.
21. Efendic S., Kindmark H., Berggren P.O. // J. Intern. Med.-1991-V.229-Suppl 2-P.9.
22. Felig P, Wahren J. Influence of endogenous insulin secretion on splanchnic glucose and amino acid metabolism in man.// J. Clin. Invest. 1971 Aug;50(8):1702-11.
23. Fujimoto K., Polonsky K. S. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic  $\beta$ -cell survival // Diabetes Obes Metab. 2009 November ; 11(Suppl 4): 30–37.
24. Gallwitz B. The evolving place of incretin-based therapies in type 2 diabetes // Pediatr Nephrol (2010) 25:1207–1217
25. Hanifi-Moghaddam P., Schloot N.C., Kappler S. et al. An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes // Diabetes. 2003. V. 52, № 5. P. 1137–1142.
26. Hinnen D., Nielsen L. L., Waninger A. et al. Incretin Mimetics and DPP-IV Inhibitors: New Paradigms for the Treatment of Type 2 Diabetes // J Am Board Fam Med 2006;19:612–20.
27. Hu, Y. Effects of nicotinamide on prevention and treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. / Y. Hu, Y. Wang, L. Wang et al. // Chin. Med. J. (Engl.). – 1996. – V. 109, № 11. – P. 819-822.
28. International Diabetes Federation. Diabetes and Cardiovascular disease: Time to Act. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2001.
29. Jagtap P. G., Baloglu E., Southan G. J. et al. Discovery of Potent Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Inhibitors from the Modification of Indeno[1,2-c]isoquinolinone // J. Med. Chem. 2005, 48, 5100-5103
30. Li F., Dre V. R., Szabo C. et al. Low-Dose Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor-Containing Combination Therapies Reverse Early Peripheral Diabetic Neuropathy // Diabetes May 2005 vol. 54 no. 5 1514-1522



31. Long, Y.C. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. / Y.C. Long, J.R. Zierath // *J. Clin. Invest.* – 2006. – V. 116. – P. 1776–1783.
32. Mahnensmith R.L., Aronson P.S. // *Circ. Res.* -1985-V.57-P.773
33. Manna, R. Nicotinamide treatment in subjects at high risk of developing IDDM improves insulin secretion. / R. Manna, A. Migliore, L.S. Martin et al. // *Br. J. Clin. Pract.* – 1992. – V. 46. – P. 177-179.
34. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. A prospective study of maturity-onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Arch Intern Med.* 1991; 151: 1141–1147.
35. Matschinsky F. M. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy// *Nature Reviews Drug Discovery* 2009 8, 399-416.
36. Matschinsky F. M., Porte D. Glucokinase activators (GKAs) promise a new pharmacotherapy for diabetics // *F1000 Medicine Reports* 2010, 2:43.
37. McGarry J. D., Leatherman G. F., Foster D. W. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA // *Journal of Biological Chemistry.* – 1978. – T. 253. – №. 12. – C. 4128-4136.
38. Meijer L., Flajolet M., Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3 *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol.25 No.9 September 2004 471-480.
39. Metz S.A. // *Am. J. Med.*-1988-V.85-Suppl. 5A-P.9.
40. Metz S.A. // *Endocrinology*-1987-V.120-P.2534.
41. Niskanen L, Turpeinen A, Penttila I, Uusitupa MI. Hyperglycemia and compositional lipoprotein abnormalities as predictors of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: a 15– year follow– up from the time of diagnosis. *Diabetes Care* 1998; 21 (11):1861–1869.
42. Noll J.; Pouyssegur J.// *Am. J. Physiol.*-1995-N2-Pt.1 -P.283-296.
43. Pittenger G.L., Taylor-Fishwick D., Vinik A.I. The role of islet neogenesis-associated protein (INGAP) in pancreatic islet neogenesis // *Curr. Protein Pept Sci.* 2009 Feb;10(1):37-45.
44. Pozzilli, P. Vitamin E and nicotinamide have similar effects in maintaining residual beta cell function in recent onset insulin-dependent diabetes (the IMDIAB IV study) / P. Pozzilli, N. Visalli, M.G. Cavallo // *European Journal of Endocrinology.* – 1997. – V. 137. – P. 234-239.
45. Rahbar S., Figarola J. L. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2003. V. 419. P. 63-79.
46. Ranganath L. R. The entero-insular axis: implications for human metabolism // *Clin Chem Lab Med* 2008;46(1):43–56.
47. Robertson, R.P.  $\beta$ -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes / R.P. Robertson, J. Harmon, P.T. Oanh Tran et al. // *Diabetes.* – 2004. – V. 53, Suppl. 1. – P. S119–S124.

48. Ross S. A., Ekoe J.-M. Incretin agents in type 2 diabetes // *Can Fam Physician* 2010;56:639-48.
49. RuizPalomo F.; Toledo T. // *Med. Hypotheses*. -1993-V.41-P.1 86-189.
50. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE et al. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 2003; 93: 280–91.
51. Sandler, S. Stimulation of cell replication in transplanted pancreatic islets by nicotinamide treatment. / S. Sandler, A. Andersson // *Transplantation*. – 1988. – V. 46. – P. 30–31.
52. Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ et al. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates  $\alpha$ -adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J* 2001; 15: 1718–26.
53. Stratton JM, Adler AI, Neil AW, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective, observational study. *BMJ*.2000; 321:405–412.
54. Szabo C., Biser A., Benko R. et al. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors Ameliorate Nephropathy of Type 2 Diabetic Leprdb/db Mice // *Diabetes* November 2006 vol. 55 no. 11 3004-3012
55. V.A. Anisimova, A.A. Spasov, A.V. Stepanov, N.V. Ar'kova and D. S. Jakovlev Synthesis and pharmacological activity N-aryloxyethyl derivatives of 9H-2,3-dihydroimidazo-and 10H-2,3,4,10-tetrahydropyrimido [1,2-a]benzimidazoles. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2006, Volume 40, Number 9, Pages 485-488.
56. Wallace J. Protective effects of somatostatin against damage induced by hemorrhagic shock, stress and PAF in the rat. // *Regul.Pept.* 1993, – Vol. 47, – P. 195.
57. Wikberg J.E.C. Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. // *Eur. J. Pharmacol.*, 1999, v. 375, N 1-3, p. 295-310.
58. Woodgett J.R. Physiological Roles of Glycogen Synthase Kinase-3: Potential as a Therapeutic Target for Diabetes and Other Disorders // *Current Drug Targets – Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 2003, 3, 275-284.
59. Wu C., Okar D. A., Kang J. et al. Reduction of Hepatic Glucose Production as a Therapeutic Target in the Treatment of Diabetes // *Current Drug Targets – Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 2005, 5, 51-59.
60. Yonemura, Y. Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors: evidence of islet B-cell regeneration. / Y. Yonemura, T. Takashima, K. Miwa et al. // *Diabetes*. – 1984. – V. 33. – P. 401-404.
61. Zhou, S.-S. Nicotinamide overload may play a role in the development of type 2 diabetes / S.-S. Zhou, D. Li, W.-P. Sun // *World J. Gastroenterol.* – 2009. – V. 43, №15. – P. 5674-5684.

## **4. Инкретины в коррекции нарушений углеводного обмена при сахарном диабете 2 типа**

*А. А. Спасов, М. П. Воронкова, Н. В. Рогова, Д. А. Бабков*

Дисрегуляция секреции инсулина в ответ на естественные стимуляторы, к которым относится углеводная пища, поступающая в кишечник, приводит к недостаточности функции эндокриноцитов поджелудочной железы [Анциферов, Дорофеева, 2007].

Известно, что пероральный прием углеводов вызывает значительно более сильную секрецию инсулина, чем при их парентеральном введении, несмотря на одинаковую концентрацию углеводов в крови в обоих случаях [Балаболкин, Креминская, Клебанова, 2005; Aronoff, Berkowitz, Shireiner, 2004]. Наряду с концентрацией глюкозы в данном случае, очевидно, участвуют некоторые стимулированные приемом пищи гастроинтестинальные гормоны (инкретины) такие как гастрин, секретин, глюкозозависимый инсулинотропный белок (GIP) и (глюкагоноподобный пептид типа 1) (GLP-1) [Drucker, 2003; Ноу, Yan, Ding, et al., 2007].

После приема пищи L-клетки тонкого кишечника секретируют GLP-1, а K-клетки – GIP. Оба инкретина являются важными гормонами и влияют почти на 60 % секреции инсулина, вырабатываемого в постпрандиальный период (табл. 4.1).

Структура GIP представлена 42 аминокислотами [Балаболкин, Креминская, Клебанова, 2005]. Высвобождение пептида происходит под влиянием моносахаридов, при этом длинноцепочечные триглицериды стимулируют процессы секреции и высвобождения GIP, а неметаболизированные моносахариды, такие как манноза и 2-дезоксиглюкоза не влияют на эти процессы. GIP обладает способностью угнетать липолитический эффект глюкагона, уменьшать выход глюкозы из печени (табл. 4.1).

Кроме того, GIP способствует замедлению поступления пищи из желудка в кишечник, способствуя возникновению чувства сытости. Рядом авторов выяснено, что гиперинсулинемия, наблюдаемая при ожирении, является следствием повышенной секреции GIP, что, очевидно, зависит от скорости прохождения пищи из желудка в двенадцатиперстную кишку

[Hou, Yan, Ding, et al., 2007; Mier, Yucking, Holst, et al., 2001]. При ожирении увеличение объема желудка, как правило, сочетается с его быстрым опорожнением, что приводит к увеличению секреции GIP с последующим увеличением высвобождения инсулина [Балаболкин, Кремнинская, Клебанова, 2005; Kieffer, Habener, 2005].

Таблица 4.1

### Биологические эффекты инкретинов

Органы и системы	GLP-1	GIP
Поджелудочная железа:		
Стимуляция глюкозозависимой секреции инсулина	+	+
Усиление транскрипции гена инсулина, повышение стабильности мРНК	+	+
Ингибирование секреции глюкагона	+	-
Повышение чувствительности $\beta$ -клеток к глюкозе	+	+
Ингибирование процессов апоптоза в $\beta$ -клетках	+	+
Стимуляция неогенеза и пролиферации $\beta$ -клеток	+	+
Повышение экспрессии генов, важных для осуществления различных функции $\beta$ -клеток	+	+
Желудочно-кишечный тракт:		
Снижение скорости опорожнения желудка	+	-
Уменьшение количества секретируемого желудочного сока	+	+
Центральная нервная система:		
Подавление чувства жажды и голода	+	-
Усиление потери веса	+	-
Сердечно-сосудистая система:		
Восстановление функции сердечно-сосудистой системы после ишемии	+	+
Жировая ткань:		
Ингибирование гормоночувствительной липазы, повышение проницаемости липолитических мембран липоцитов	-	+

При сахарном диабете 1 типа (СД1) секреция GIP не изменяется, в то время как при СД типа 2 (СД2) его величина повышена, однако при этом отмечаются и случаи гипосекреции, что косвенным образом подтверждает гетерогенность этого заболевания [Joffe, 2001].

GLP-1 образуется из энтерального проглюкагона (с аминокислотной последовательностью предшественника 7-36-амид), и в настоящее время GLP-1 рассматривается как самый сильный эндогенный стимулятор сек-

реции инсулина, так как принимает непосредственное участие в регуляции биосинтеза проинсулина [Venkatesham, Vasu, Rao, 1993; Hou, Yan, Ding, et al., 2007; Kieffer, Habener, 2005]. Однако стоит отметить, что GLP-1 и GIP стимулируют секрецию инсулина только при условии гипергликемии, практически не влияя на высвобождение сахароснижающего гормона при гипогликемии или нормогликемии [Балаболкин, Креминская, Клебанова, 2005]. При этом GIP не способен стимулировать секрецию инсулина при СД2 даже в высоких концентрациях, в то время как GLP-1 при этих же условиях эффективно стимулирует высвобождение гормона. Эти эффекты, а также влияние GLP-1 на повышение периферической утилизации глюкозы, являясь антидиабетогенным, способствуют улучшению гомеостаза глюкозы и, в частности, уменьшают уровень гликемии как натощак, так и после приема пищи у больных СД обоих типов.

В  $\beta$ -клетках, при участии сАМР происходит индуцированное глюкозой закрытие АТР-чувствительных  $K^+$  каналов, таким образом стимулируется клеточная деполяризация и активация потенциалзависимых  $Ca^{2+}$  каналов (VDCCs), что способствует увеличению внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . GLP-1 может также увеличить внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$ , мобилизуя ионы из внутриклеточного пространства путем активации фосфолипазы С и сАМР-зависимого высвобождения  $Ca^{2+}$  [Joffe, 2001; Mc Donagh, Lee, Izzo et al., 2007]. GLP-1-индуцированное повышение внутриклеточного  $Ca^{2+}$  служит важным пусковым механизмом для экзотоза инсулина.

Влияние GLP-1 также проявляется в прямом стимулирующем влиянии на вход  $Ca^{2+}$  через дигидропиридин-чувствительный канал (L-тип) VDCCs [Kieffer, J Habener, 2005], что стимулирует открытие  $Ca^{2+}$  активированного неселективного катионного канала (NSCCs), через который происходит проникновение ионов  $Ca^{2+}$  и  $Na^+$  [Drucker, 2003; Habener, Kieffer, 2005; Schjoldager, Mortensen, Christiansen, et al., 1989]. Этому катионному каналу может принадлежать критическая роль в регулировании мембранного потенциала  $\beta$ -клетки. Его активация GLP-1 вместе с уменьшением в деятельности каналов  $K^+$ -АТР приводит к мембранной деполяризации, активации вольтажзависимых каналов  $Ca^{2+}$  и стимуляции секреции инсулина, при этом регуляция количества внутриклеточного  $Na^+$  (через NSCCs) и  $K^+$  (через каналы  $K^+$ -АТР) регулируется влиянием  $Na^+K^+$  АТФазы (рис. 4.1).

GLP-1 является пептидом, имеющим короткий период полураспада. Так, по данным В. Т. Schjoldager и соавторов, период его полураспада при циркуляции составляет у человека 8-10 мин., а по данным А. Wettergren и соавторов, – 1-1,5 мин, что свидетельствует, что только часть секретируемого гормона достигает тканей-мишеней посредством циркуляции [Wettergren, Schjoldager, Mortensen, et al.,1993; Roges, Baron, Philis-Tsimikas, 2003].

Исследования, проведенные на изолированной перфузируемой тонкой кишке крыс, доказали, что 50-70% секретируемого гормона метаболизируется уже до того, как GLP-1 покидает кишечник, и преимущественно катализируется ферментом дипептидилпептидазой 4 типа (ДПП4), который осуществляет отщепление 2 аминокислот от интактного пептида, в результате чего образуются 2 укороченных пептида GLP-1 (9-36) и GLP-1 (3-42), которые выводятся из организма главным образом почками [Roges, Baron, Philis-Tsimikas, 2003; Meier, Nauck, Kranz, et al., 2000].

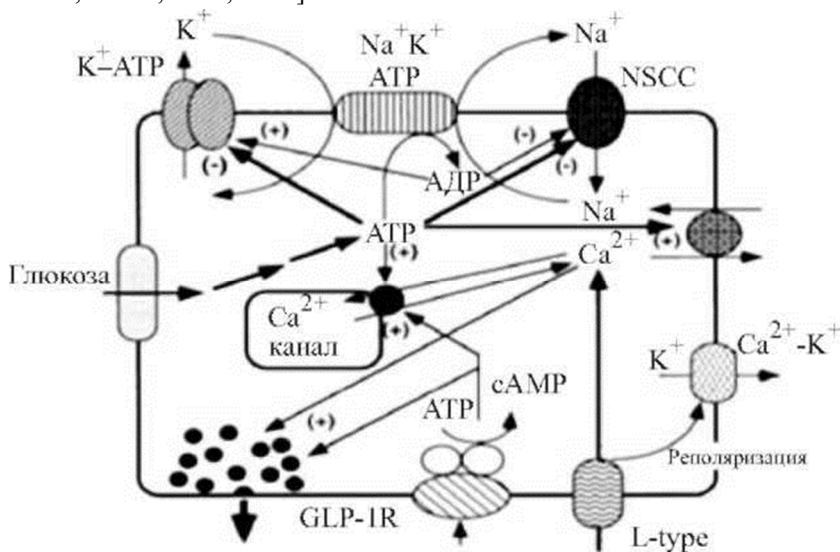


Рис. 4.1. Модель ионных каналов и проводящих путей трансдукции сигнала в панкреатическом В-лимфоците, участвующего в механизмах глюкозо-инкретинозависимой секреции инсулина [Kiefer, 2005]:

VDCCs – вольтажзависимые  $Ca^{2+}$  каналы; VDCCs – дигидропиридин-чувствительный канал (L-тип); NSCCs –  $Ca^{2+}$  активированный неселективный катионный канал

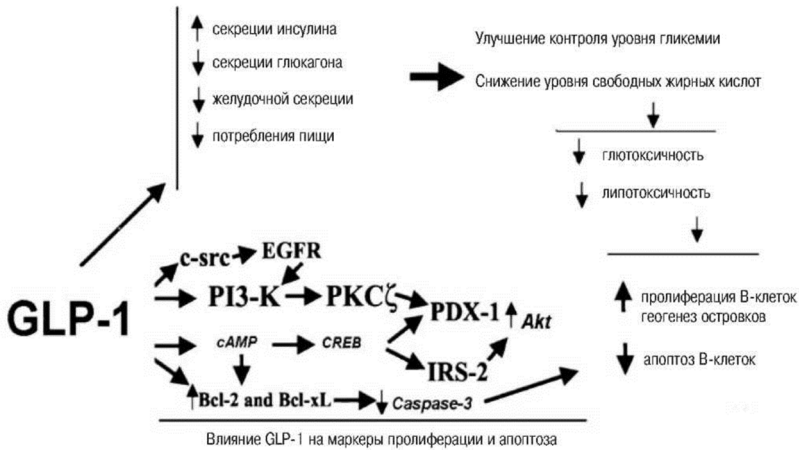


Рис. 4.2. Предполагаемый механизм действия GLP-1 и инкретиномиметиков при СД2 [Spasov, 2007]

Данные укороченные пептиды не активируют соответствующие GLP-1 и GIP рецепторы [Meier, Nauck, Kranz, et al., 2000] и не влияют на выброс инсулина и уровень глюкозы крови [Vilsboll, Krarup, Deacon, et al., 2001, Vahl, Paty, Fuller, et al., 2003]. ДПП4 располагается на мембранах щеточной каемки кишечного и почечного эпителия, на поверхности капилляров и присутствует в кровотоке в растворимой форме [Vilsboll, Krarup, Deacon, et al., 2001; Vahl, Paty, Fuller, et al., 2003; Nauck, Heimesaat, Benle, et al., 2002]. Этот фермент обнаруживается в эндотелии различных органов, при этом субстратами для ДПП4, кроме GLP-1 и GIP, являются и другие белки, такие как PACAP (белок, активирующий аденилатциклазу слизистой оболочки), желудочный релизингпептид (GRP) [Hou, Yan, Ding, et al. 2007].

Учитывая, что ДПП4 взаимодействует с GLP-1 за несколько минут, терапию нативным GLP-1 невозможно использовать для продолжительного лечения СД2. Поэтому проводятся исследования, направленные на создание лекарственных веществ, способных продлить биологическую активность GLP-1.

Одним из направлений работы является создание аналога GLP-1, обладающего более длительным периодом полураспада. Например, вещество экседин-4, полученный из слюны ящера-ядозуба. Способ

применения – постоянная инфузия, позволяющая поддерживать постпрандиальный уровень глюкозы, а также гликемию натощак и в течение суток до других приемов пищи в пределах нормы [Балаболкин, Креминская, Клебанова, 2005]. Эксенатид является синтетическим аналогом экседина-4, его аминокислотная последовательность на 50 % совпадает с GLP-1 человека.

В настоящее время проводятся исследования фармакологических свойств эксенатида при парентеральном введении 2 раза в сутки в комбинации с пероральными сахароснижающими препаратами (фаза клинических испытаний) [Анциферов, Дорофеева, 2007]; аналоги GLP-1 (под кодовым названием NN2211 («Ново-Нордикс», Дания), LY307 161SR («Эли-Лилли»), CJC-1131 [Балаболкин, Креминская, Клебанова, 2005].

Также активно применяются и разрабатываются селективные ингибиторы ДПП4 (рис. 4.3), например, вилдаглиптин и ситаглиптин ((2R)-4-оксо-4-[3-(трифторметил)-5,6-дигидро [1,2,4]триазоло[4,3-а]пирозин-7(8H)-ил]-1-(2,4,5-трифтофенил)бутан-2-амин), последний является одним из самых сильных ингибиторов ДПП4. В основе механизма действия лежит подавление плазменной активности ДПП4 >80%, что соответствует его концентрационному значению >100 нМ и способствует увеличению уровней активного GLP-1 и GIP практически в 2 раза [Анциферов, Дорофеева, 2007].

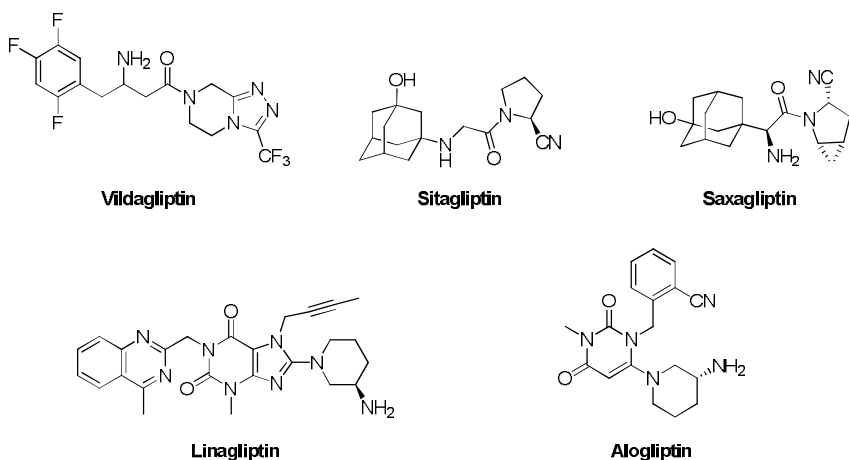
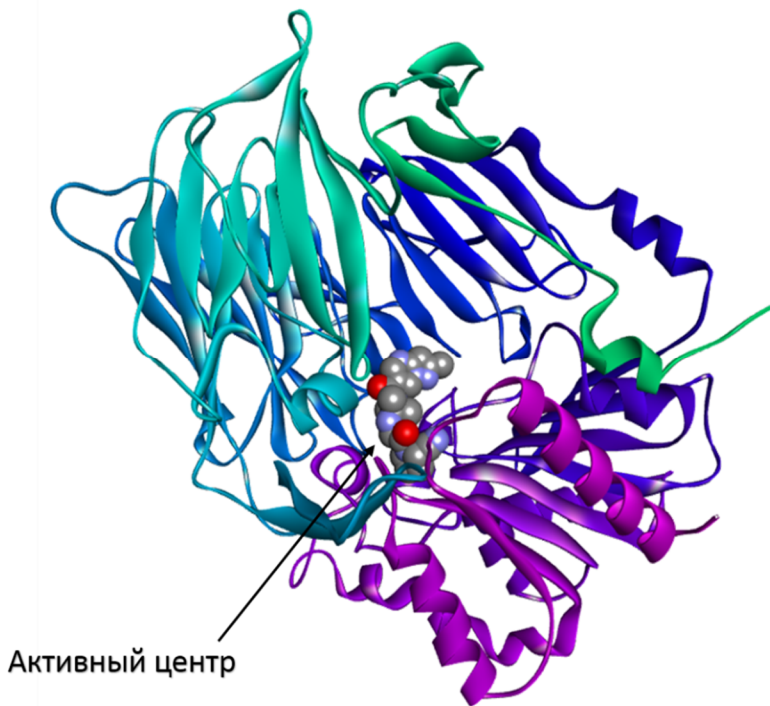


Рис. 4.3. Ингибиторы ДПП4





*Рис. 4.4. Третичная структура ДПП4*

Дипептидилпептидаза типа 4, также известная как антиген активации Т-клеток CD26, или аденозиндезаминаза комплексообразующий белок 2 (рис. 4.4). Это многофункциональный мембранный гликопротеин, присутствующий на поверхности большинства типов клеток и участвующий в иммунной регуляции, трансдукции ряда сигнальных путей и апоптозе. В организме человека ДПП4 экспрессируется почти во всех органах и тканях, особенно в почках, тонком кишечнике и плаценте. Растворимая форма ДПП4 циркулирует в крови человека и семенной жидкости и характеризуется как протеолитическое производное мембраносвязанной формы. ДПП4 является сериновой экзопептидазой, которая отщепляет X-пролин или X-аланин дипептиды от N-конца полипептидов. Существуют, по крайней мере 63 субстрата, специфически связывающихся с ДПП4, включая факторы роста, гемокины, нейропептиды и вазоактивных пептидов.

Важной характеристикой ингибиторов ДПП4 является изоформная селективность. Все существующие ингибиторы, в том числе производные адамантана, связываются с активным центром ДПП4, являясь конкурентными ингибиторами. Строение активного центра всех членов семейства дипептидилпептидаз высоко консервативно [Ajami и др., 2003], следствием чего является наличие остаточной активности относительно гомологов ДПП4. В частности, описано, что ингибирование изоформ ДПП8 и ДПП9 ассоциировано с рядом серьезных побочных эффектов, включая тромбоцитопению, ретикулопению и спленомегалию [Lankas и др., 2005].

Экспериментально установлено, одним из направлений восстановления нарушенного каскадного механизма действия инсулина, сопровождающегося инсулинорезистентностью, является регуляция количества инкретинов, в частности GLP-1 (рис. 4.2), который, в свою очередь, не только стимулирует биосинтез инсулина, уменьшает уровень гликемии, но и способствует неогенезу и пролиферации клеток панкреатических островков, снижая при этом скорость апоптоза, которая повышена при СД. Причиной этого является то, что СД – это хроническое аутоиммунное заболевание, при котором происходит селективная органоспецифичная деструкция инсулинпродуцирующих  $\beta$ -эндокриноцитов панкреатических островков.

В результате постепенного разрушения  $\beta$ -эндокриноцитов наступает инсулиновая недостаточность, приводящая к расстройству гомеостаза глюкозы, т.е. возникновению СД. Именно поэтому особое внимание уделяется апоптозу, как завершающему этапу в механизме деструкции  $\beta$ -эндокриноцитов [Venkatesham, Vasu, Rao, 1993].

Апоптоз, очевидно, играет ведущую роль в патогенезе системных аутоиммунных болезней, в частности сахарного диабета. Недостаточный контроль иммунной системы по отношению к реактивности Т-клеток, направленной на островки, может повлечь за собой активацию апоптоза и разрушение  $\beta$ -клеток [Hou, Yan, Ding, et al., 2007].

Гибель  $\beta$ -клетки – это итог предшествующих проапоптозных патологических процессов, протекающих опосредованно через различные медиаторы: оксид азота, реактивные формы кислорода, глюкозу и систему Fas. Как иммунный, так и метаболический патологические процессы могут действовать согласованно, разрушая  $\beta$ -клетки [Meier, Nauck, Kranz, et al., 2000].

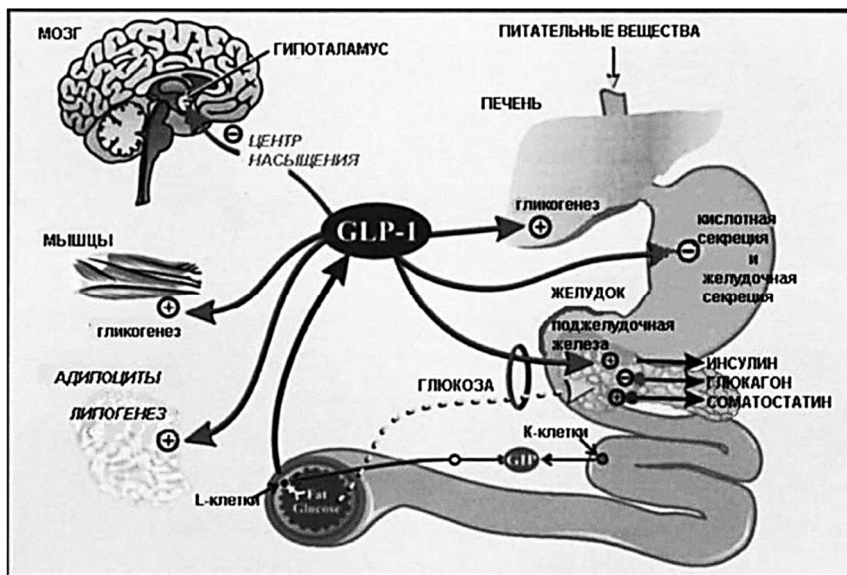


Рис. 4.5. Обобщенная схема влияния *GLP-1* на процессы всасывания и утилизации глюкозы

Существуют внутриклеточные механизмы, предотвращающие преждевременную гибель клетки. Существенную роль в механизме деструкции  $\beta$ -клетки придает ген *Bcl-2* (ген, кодирующий белок – B cell lymphoma 2 protein), который является одним из главных 8 регуляторов апоптоза [Lamhamedi-Cherradi, Zheng et al., 2003]. Выявлено снижение экспрессии этого гена в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса и Т-клетках, инфильтрирующих инсулиты у больных СД1. С другой стороны, выявлено, что сверхэкспрессия *Bcl-2* в  $\beta$ -клетках способна защищать эти клетки от гибели, наступающей в результате цитотоксического действия цитокинов (ИЛ-1, фактора некроза опухоли – ФНО- $\alpha$ ,  $\gamma$ ). Эксперименты, направленные на модуляцию экспрессии генов, регулирующих апоптоз в  $\beta$ -клетках, выявили, что фактор транскрипции, ядерный фактор каппа В (NF- $\kappa$ B) провоцируют экспрессию некоторых генов  $\beta$ -клетки, включающих про- и антиапоптозные гены [Karasik, Charbonnel, Liu, 2006; Scott, Morgan, 2007]. Продукция медиаторов апоптоза может существенно влиять на развитие аутоиммунного диабета, а понимание механизмов, провоцирующих гибель  $\beta$ -клетки или изменение периода продолжительно-

сти функционирования активированных аутореактивных клеток, дает большое поле деятельности для разработки средств с принципиально новым механизмом действия.

Учитывая вышеприведенные данные, создание лекарственного препарата, способного влиять на факторы, непосредственно участвующие в патогенезе СД, фактически может не только корректировать уровень гликемии, но и полностью изменить течение заболевания, а также способствовать профилактике его осложнений.

## Литература

1. Ajami K. и др. Structural Requirements for Catalysis, Expression, and Dimerization in the CD26/DPIV Gene Family // *Biochemistry*. 2003. Т. 42. № 3. С. 694–701.
2. Aronoff S. L., Berkowitz K., Shireiner B. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon // *Diabetes Spectrum*. – 2004. – Т. 17. – №. 3. – С. 183-190.
3. Charbonnel B., Karasik A., Liu J. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone // *Diabetes care*. – 2006. – Т. 29. – №. 12. – С. 2638-2643.
4. Drucker D. J. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes // *Diabetes care*. – 2003. – Т. 26. – №. 10. – С. 2929-2940.
5. Habener J. F., Kieffer T. J. Glucagon and glucagon-like peptides // *Joslin's diabetes mellitus*, 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. – 2005. – С. 179-184.
6. Hou, J. R. Yan, D. Ding, et al. High-level expression of fusion protein containing 10 tandem repeated GLP-1 analogs in yeast *Pichia pastoris* and its biological activity in a diabetic rat model // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2007. – Т. 71. – №. 6. – С. 1462-1469.
7. Joffe D. J., Freed S. H. Diabetes In Control Newsletter // *Issue*. – 2001. – Т. 76. – №. 1. – С. 23-24.
8. Lamhamedi-Cherradi S. E., Zheng S., Tisch R. M., Chen Y. H. Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes // *Diabetes*. – 2003. – Т. 52. – №. 9. – С. 2274-2278.
9. Lankas G.R. и др. Dipeptidyl Peptidase IV Inhibition for the Treatment of Type 2 Diabetes: Potential Importance of Selectivity Over Dipeptidyl Peptidases 8 and 9 // *Diabetes*. 2005. Т. 54. № 10. С. 2988–2994.
10. Mc Donagh S. C., J. Lee, A. Izzo, P. L. Brubakar, Role of glial cell-line derived neurotropic factor family receptor  $\alpha 2$  in the actions of the glucagon-like peptides

on the murine intestine // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2007. – Т. 293. – №. 2. – С. G461-G468.

62. Meier J. J., Nauck M. A., Heimesaat M. M., Benle K., et al. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives // *European journal of pharmacology*. – 2002. – Т. 440. – №. 2. – С. 269–279.

63. Meier J.J., Nauck M. A., Kranz D., et al., и др. Секреция, деградация и устранение глюкагон-подобный пептид 1 и желудочный ингибиторный полипептид, у больных с хронической почечной недостаточностью и здоровых субъектов контроля // *Диабет*. – 2004. – Т. 53. – №. 3. – С. 654-662.

64. Roges O. A., Baron M., Philis-Tsimikas A. The incretin effect and its potentiation by glucagon-like peptide 1-based therapies: a revolution in diabetes management // *Expert opinion on investigational drugs*. – 2005. – Т. 14. – №. 6. – С. 705-727.

65. Schjoldager B. T., Mortensen P. E., Christiansen J., et al., GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans // *Digestive diseases and sciences*. – 1989. – Т. 34. – №. 5. – С. 703-708.

66. Vahl T. P., Paty B. W., Fuller B. D., et al. Effects of GLP-1-(7–36) NH<sub>2</sub>, GLP-1-(7–37), and GLP-1-(9–36) NH<sub>2</sub> on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2003. – Т. 88. – №. 4. – С. 1772-1779.

67. Venkatesham A., Kshetty Vasu, Santhosh Rao. New molecular screening from a folk lore medicine gymnema, using its active moieties for lead optimization. *Lawrence Review of Natural Products* Aug. (1993).

68. Vilsbøll T., Krarup T., Deacon C. F., et al., Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients // *Diabetes*. – 2001. – Т. 50. – №. 3. – С. 609-613.

69. Wettergren A., Schjoldager B., Mortensen P. E. Truncated GLP-1 (proglucagon 78–107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man // *Digestive diseases and sciences*. – 1993. – Т. 38. – №. 4. – С. 665-673.

70. Анциферов М. Б., Дорофеева Л. Г. НовоМикс 30®: Новые возможности терапии сахарного диабета 2 типа // *Фарматека*. – 2007. – Т. 3. – №. 138. – С. 64-68.

71. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М. Лечение сахарного диабета и его осложнений. – М.: Медицина, 2005.

## **5. Роль ингибиторов гликогенфосфорилазы в регуляции углеводного обмена при сахарном диабете 2 типа**

*А. А. Спасов, Н. И. Чепляева, Е. С. Воробьев*

Согласно современным подходам к терапии сахарного диабета, созданным при совместной работе Европейской ассоциации по изучению диабета (EASD) и Американской диабетической ассоциации (ADA) медикаментозные мероприятия в лечении целесообразно начинать с метформина. Метформин является единственным препаратом, ингибирующим глюконеогенез в печени, однако данный эффект связан со снижением печеночной инсулинорезистентности. Согласно Long Y.C. (2006), метформин стимулирует АМФ-активируемую протеинкиназу и внутриклеточный сигнал истощения запасов энергии, что приводит к повышению захвата глюкозы скелетными мышцами и торможению глюконеогенеза [Long, Zierath, 2006.]. Следует отметить, что повышение чувствительности периферических тканей к инсулину данного препарата неустойчиво. Кроме того, бигуаниды способствуют увеличению лактата, пирувата, аланина, что связано с нарушением их клиренса вследствие изменения активности митохондриального пируватдегидрогеназного комплекса и как следствие развитие лактатацидоза. Риск развития лактатацидоза увеличивается при заболеваниях почек, печени и сердечно-сосудистой системы, что ограничивает применение препарата [Alice, Cheng, Fantus, 2005].

Инсулинорезистентность и относительная или абсолютная инсулиновая недостаточность приводят к нарушению метаболизма глюкозы в печени сопровождающемуся снижением активности ферментов гликолиза (процесс окисления глюкозы до пировиноградной кислоты) и синтеза гликогена и повышением активности ферментов гликогенолиза (расщепление гликогена до глюкозы) и глюконеогенеза (синтез глюкозы из неуглеводных источников).

Перспективными направлениями создания новых лекарственных препаратов для терапии СД является регуляция ключевых ферментов углеводного обмена: ингибирование гликогенфосфорилазы, фосфоенол-

пируваткарбоксилазы, фруктозобифосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы и/или активация гликогенсинтазы, гексокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы. Регуляция метаболизма углеводов в печени является точкой приложения действия для новых препаратов для лечения СД, которые активно разрабатываются в настоящее время.

В норме уровень глюкозы в плазме поддерживается в узких пределах во время голодания и приёма пищи. Гомеостаз глюкозы обеспечивается балансом между всасыванием глюкозы из кишечника и потреблением глюкозы периферическими тканями. Было доказано, что печень играет центральную роль в гомеостазе глюкозы [Аметов, 2014]. Эта роль заключается в способности печени контролировать продукцию глюкозы печенью (ППП), с одной стороны, ППП повышается во время голодания, а с другой стороны, ППП подавляется во время еды и глюкоза запасается в печени в виде гликогена [Hellerstein, Neese, et al., 1997]. Таким образом, контроль ППП является одним из основных регулятором гомеостаза глюкозы.

ППП определяется балансом между четырьмя основными процессами: глюконеогенез, гликогенолиз и гликолиз, гликогенез (распад гликогена до глюкозы).

Между приемами пищи большая часть глюкозы в циркулирующую кровь поставляется за счет гликогенолиза [Дедов И.И., Шестакова М.В., 2011]. Регуляция гликогенолиза осуществляется совместно с гликогеногенезом по типу переключения. Это переключение происходит при переходе из абсорбтивного состояния (после приема пищи) в постабсорбтивное (между приемами пищи), а также при смене состояния покоя на режим физической работы. В печени оно осуществляется при участии гормонов инсулина, глюкагона и адреналина, а в мышцах -инсулина и адреналина.

Распад гликогена (рис. 5.1) происходит путём последовательного отщепления остатков глюкозы в виде глюкозо-1-фосфата [Ross, Gulve, Wang, 2004]. Влияние гормонов на синтез и распад гликогена осуществляется путём изменения в противоположных направлениях активности двух ключевых ферментов: гликогенсинтазы и гликогенфосфорилазы (ГФ) с помощью их фосфорилирования и дефосфорилирования [Балаболкин, 2011; Hayes, Kantsadi, Leonidas, 2014]. Так, инсулин ингибирует гликогенфосфорилазу и является гормональным регулятором гомеостаза

глюкозы в организме. Его относительная или абсолютная недостаточность либо инсулинорезистентность приводят к дисбалансу между поступлением глюкозы и ее утилизацией периферическими тканями [Aiston, Coghlan, Agius, 2003].

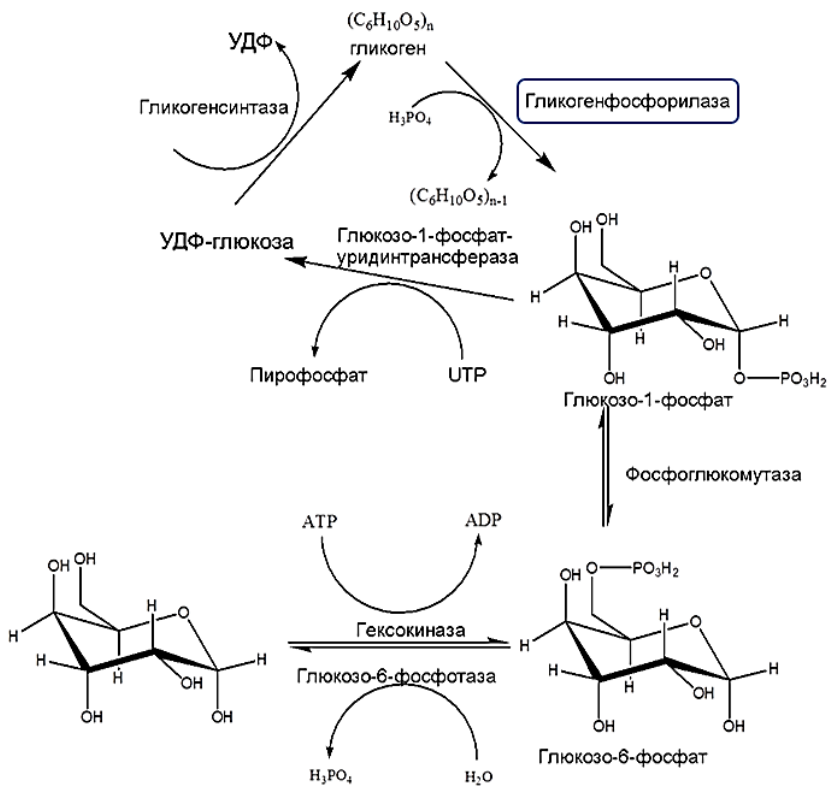


Рис. 5.1. Место гликогенфосфорилазы в процессе гликогенолиза

При голодании и истощении запасов гликогена глюконеогенез становится источником глюкозы в крови [Wagman, Nuss, 2001]. Наряду с гликогенолизом, этот путь поддерживает в крови уровень глюкозы, необходимый для работы многих тканей и органов, в первую очередь, нервной ткани и эритроцитов. Он служит важным источником глюкозы в условиях недостаточного количества гликогена. Глюконеогенез является обяза-



тельной частью цикла Кори, кроме того, этот процесс может быть использован для превращения пирувата, образованного при дезаминировании аминокислот аланина и серина.

Однако при СД, как вследствие снижения уровня инсулина, так и вследствие резистентности тканей к инсулиновому сигналу, активируется процесс синтеза глюкозы в печени из неуглеводных источников. Таким образом, повышение продукции глюкозы печенью является одним из основных и ведущих факторов в патогенезе СД и требует дополнительной фармакологической коррекции. Следует отметить, что повышение глюконеогенеза в печени в 3 раза и более, наблюдающееся при умеренной недостаточности инсулина, связано с тем, что для угнетения глюконеогенеза требуется сравнительно больше количества инсулина, чем для угнетения гликогенолиза.

Регуляция ключевых ферментов углеводного обмена в печени, а также ингибирование ферментов глюконеогенеза и гликогенолиза является важнейшей точкой приложения действия соединений и перспективным направлением поиска новых веществ для лечения СД2.

### **Гликогенфосфоорилаза**

Гликогенфосфоорилаза (ЕС 2.4.1.1., КФ 2.4) катализирует реакцию фосфоролитического расщепления  $\alpha$ -1,4-гликозидной связи в молекуле гликогена, в результате которой отщепляется концевой не редуцирующий остаток глюкозы с образованием глюкозо-1-фосфата [Ross, Gulve, Wang, 2004].

В результате этого процесса происходит расщепление гликогена до глюкозы, это связано с процессом сокращения мышц, контролем уровня глюкозы в крови и межклеточной передачи энергии в условиях аноксии [Oikonomakos, 2002; Andersen, Westergaard, 2002; Treadway, Mendys, Hoover, 2001].

ГФ является димерным ферментом, состоящим из двух субъединиц, находящихся в нескольких формах [Oikonomakos, Skamnaki, et al., 2000; Hoover, Lefkowitz-Snow et al., 1998]: фосфорилированная – каталитически активная форма гликогенфосфоорилаза а; дефосфорилированная – каталитически неактивная форма гликогенфосфоорилаза b. Каждая из форм фермента имеет две конформации, активную (R) и неактивную (T). ГФ b преимущественно находится в T-конформации и превращается в высоко

активную R-конформацию ГФа при фосфорилировании Ser14 [Newgard, Hwang, Fletterick, 1989; Barford, Hu, Johnson, 1991]

В результате рентгеноструктурного анализа кроличьей мышечной и человеческой печёночной ГФ были найдены следующие сайты связывания для физиологических и фармакологических лигандов (Рис. 2.) [Barford, Johnson, 1989; Sprang, Acharya, et al., 1988; Sprang, Withers, et al., 1991; Grimm, Lancelin, Praly, 2012]: каталитический сайт, аллостерический сайт АМФ, кофеин-связывающий ингибирующий сайт (связывает пуриновые нуклеозиды), сайт хранения гликогена, индолкарбоксамидный сайт (рис. 5.2).

Каталитический центр располагается в центре субъединицы и является доступным для большинства лигандов. Связывание конкурентного ингибитора способствует образованию менее активной Т конформации через стабилизацию закрытого положения 280 S петли [Johnson, 1992].

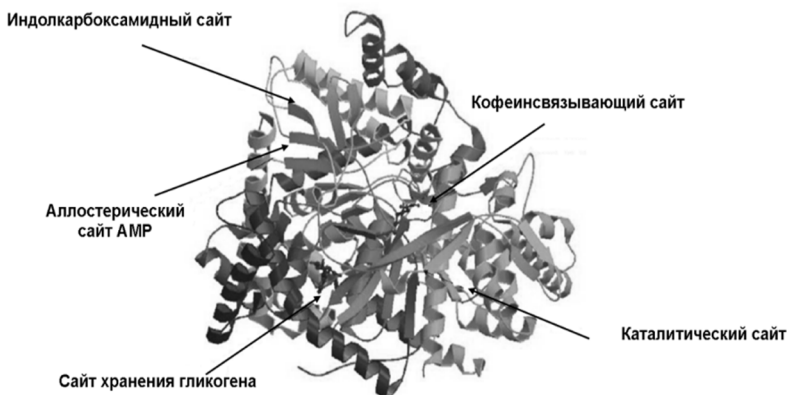


Рис. 5.2. Сайты связывания ГФ

Кофеин-связывающий сайт находится на поверхности фермента на расстоянии и в неактивной конформации препятствует входу лиганда в каталитический сайт. Он хорошо описан в кристаллографических исследованиях, однако мало что известно о его физиологической роли [Oikonomakos, Tiraidis и др, 2006; Kasvinsky, Madsen, et al., 1978].

Сайт хранения гликогена находится на поверхности молекулы на расстоянии 30 Å от каталитического сайта, в 40 Å от аллостерического

сайта. Данный сайт не значим для поиска новых лекарственных средств [Somsak, Czifrak, et al., 2008].

Индолкарбоксамидный сайт, расположенный внутри центральной полости, образован объединением двух субъединиц.

В зависимости от сайта связывания ингибиторы ГФ делятся на: соединения, блокирующие каталитический сайт, соединения, блокирующие аллостерические сайты [Gaboriaud, Skaltsounis, 2013].

### **Ингибиторы каталитического сайта**

В качестве ингибиторов каталитического сайта ГФ изучались следующие группы химических соединений: производные N-ацил-β-D-глюкопиранозиламина, N-β-D-глюкопиранозилоксаниловой кислоты, N-β-D-глюкопиранозил мочевины, 2-(D-глюкопиранозил)-5-метил-1,3,4-оксадиазола, 2-(D-глюкопиранозил)-бензотиазола, 2-(D-глюкопиранозил)-бензимидазола, β-D-глюкопиранозиламмонийкарбамата; N β-D-глюкопиранозилмоноамиды дикарбоновых кислот; p-D-глюкопиранозил нуклеозиды; производные β-D-глюкопиранозиламмонийкарбамата; 3-замещенные производные 5-β-D-глюкопиранозил-1, 2, 4-оксадиазола; глюкопиранозилиден-спиро-тиогидантоины; иминосахара [Gaboriaud, Skaltsounis, 2013; Bokor, Szilagy, et al., 2013; Parmenopoulou, Kantsadi, et al., 2014].

Ингибиторы каталитического сайта представлены соединениями на основе глюкозы, связано это с тем, что глюкоза контролирует метаболизм гликогена двумя способами: путём связывания с каталитическим доменом и стабилизации T-конформации фермента (менее активной), а также путём дефосфорилирования R-конформации (активной) ГФ и инактивации фермента [Somsak, 2011].

В результате многочисленных исследований было изучено огромное количество соединений на основе глюкозы, которые имели более высокое сродство к ГФ, чем глюкоза ( $K_i = 2$  мМ). Первые попытки по созданию ингибиторов каталитического сайта ГФ связаны с синтезом ряда соединений на основе β-D-глюкозы (I) (рис. 5.3.) [Somsak, 2011; Somsak, Kovacs, et al., 2001]. Одним из наиболее ранних исследованных соединений с ГФ ингибирующей активностью посвящены, N-ацетил-β-D-глюкопиранозиламину (II) (рис. 5.3.) N-ацил-β-D-глюкопиранозиламин является конкурентным ингибитором, как для p ( $K_i = 32$  мкМ) и a ( $K_i = 35$  мкМ) формы

фермента и в синергизме с кофеином, стимулирует связывание глюкозы [Martin, Veluraja, et al., 1991; Oikonomakos, Kontou, et al., 1995]. Эксперименты по определению скорости седиментации показали, что N-ацил-β-D-глюкопиранозиламин способен индуцировать диссоциацию тетрамерной фосфорилазы и стабилизировать димерную T-конформацию [Oikonomakos, Kontou, et al., 1995; Nagy, Docsa, Szanto, et al., 2013]. KB228 – N-(3,5-диметил-бензоил)-N-β-D-глюкопиранозил мочевины (III), один из наиболее активных ингибиторов каталитического сайта ГФ. В экспериментах на животных KB228 усиливал чувствительность к глюкозе у мышей с диабетом, что сопровождалось увеличением захвата глюкозы в печени и увеличивало депонирование гликогена [Nagy, Docsa, Szanto, et al., 2013].

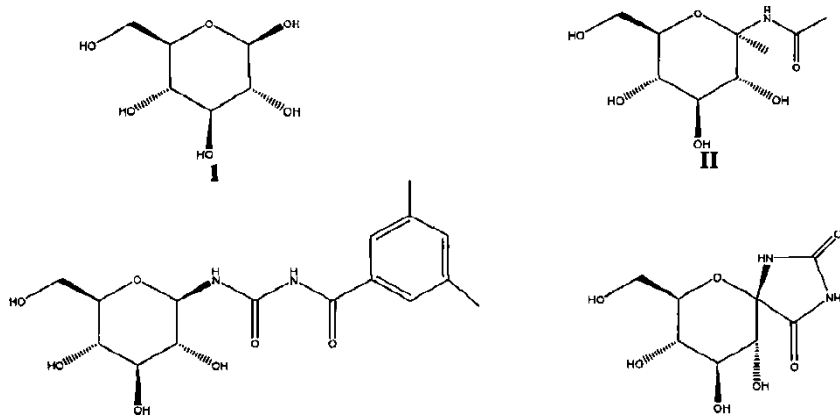


Рис. 5.3. Ингибиторы каталитического сайта ГФ:

I – D-глюкоза, II – N-ацетил-β-D-глюкопиранозиламин мочевины, III – N-(3,5-диметил-бензоил)-N-β-D-глюкопиранозил, IV – глюकोпиранозил спирогиантонин (гидан)

Одним из мощных ингибиторов каталитического сайта ГФ является и глюकोпиранозил спирогиантонин (гидан) (IV) (Рис. 3.), который по константе ингибирования в 550 раз превосходит естественный лиганд α-D-глюкозу. Так же были синтезированы и изучены на связывание с ГФ аналоги спирогиантона [Archontis, Watson, et al., 2005; Nagy, Benltifa, et al., 1995; Benltifa, Hayes, et al., 2009; Somsak L., Bokor E., et al., 2014; Czifrak, Pahi, et al., 2014].

Глюкопиранозилиден-спиро-тиогидантоин (ТН) представитель следующего класса на основе глюкозы с показателем  $K_i = 3-4$  мкМ. В ходе исследований *in vitro* на экстракте печени выявлено, что ТН в дозе 50 мкМ усиливал активацию гликогенсинтазы (ГС), значительно снижая время необходимое для дефосфорилирования фермента. Кроме того, ТН уменьшал ГФ активность и повышал фосфатазную активность. При стрептозотоциновом СД ТН восстанавливал до физиологических значений уровень глюкозы и гликогена в печени [Docsa, Czifrak, et al., 2011].

Ингибиторами каталитического сайта могут быть соединения класса аминсахара подразделяющиеся на моно и бициклические структуры [Home, Wilson, et al., 2011; Oikonomakos, Tiraidis, et al., 2006]. Соединение 1, 4-дидезокси-1,4-имино-D-арабинтол (DAB), относящиеся к данному классу, является мощным ингибитором фосфорилированной и дефосфорилированной формы ГФ [Oikonomakos, Tiraidis, et al., 2006; Andersen, Rassov, et al., 1999]. Тормозит гликогенолиз путем прямого ингибирования ГФ, так же было выяснено DAB не влияет на протеинфосфатазу 1 (PP1) или киназы [Fosgerau, Westergaard, et al., 2000].

Исследование активности данного соединения показало ингибирование ГФ печени свиньи ( $IC_{50} = 740 \pm 9$  нМ) [Oikonomakos, 2002; Andersen, Westergaard, 2002]. К ингибиторам данного класса проявляющим высокую активность относятся соединения исофагомин (ИФГ) (V) (Рис. 5.4.) и его N-замещенные 3-фенилпропил производные (VI) (Рис. 5.4.) [Oikonomakos, Tiraidis, et al., 2006].

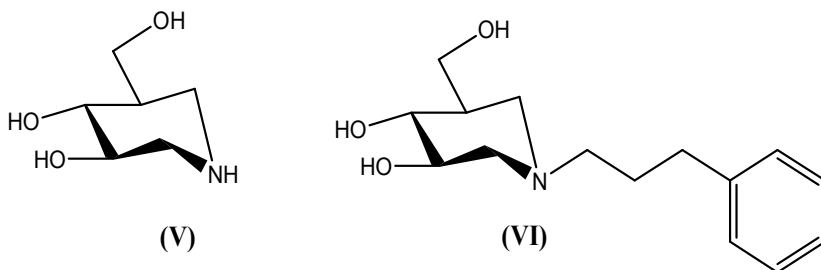


Рис. 5.4. Ингибиторы каталитического сайта ГФ:  
 V – Исофагомин, VI – N-замещенные 3-фенилпропил производные исофагомина

### Ингибиторы кофеин связывающего (пуринового) сайта

Ингибиторы кофеин связывающего сайта ГФ представлены следующими группами соединений: пурины (мочевая кислота, ксантин, гипоксантин, теofilлин, аллопуринол, 3 – метилксантин, 7 – метилксантина, 1 – метилксантина), флавопиридол и его аналоги, витамины (рибофлавин, фолиевая кислота), индирубины (индирубин–3'-аминооксиацетата (IX)) (Рис. 5.5) [Hampson, Arden, et al., 2006; Oikonomakos, Schnier, et al., 2000; Ekstrom, Pauly, et al., 2002].

Связывание лигандов с данным сайтом происходит за счет образования п – п связей между остатком ароматической боковой цепи Фен 285, 280s петель и Тир613. Кофеин (VII) (Рис. 5.5.) был первым ингибитором пуринового сайта [Kasvinsky, Madsen, et al., 1978; Ekstrom, Pauly, et al., 2002]. Мочевая кислота, ксантин, гипоксантин и аллопуринол связываются в кофеин-связывающий сайт, но проявляют меньшую аффинность, чем кофеин, в то время как рибофлавин связывается с более высокой аффинностью. Однако не установлено, какую физиологическую роль данные эндогенные лиганды играют в регуляции печёночного гликогенолиза [Ekstrom, Pauly, et al., 2002].

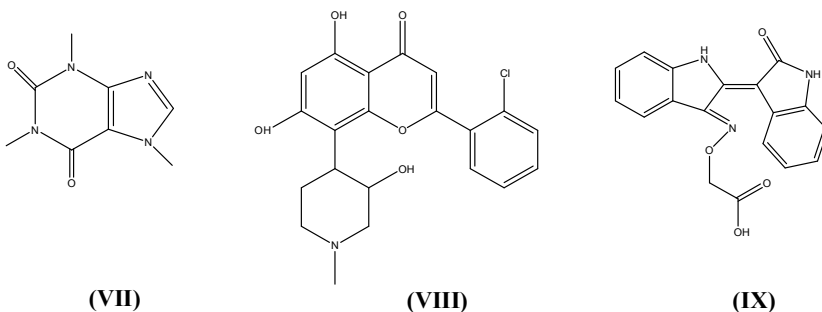


Рис. 5.5. Ингибиторы кофеин связывающего (пуринового) сайта ГФ:  
VII – кофеин, VIII – флавопиридол, IX – индирубин-3'-аминооксиацетат

Флавопиридол (VII) (Рис 5.5), потенциальный ингибитор циклин-зависимой киназы с антипролифератическим эффектом на опухолевые клетки [Kaiser, Nishi, et al., 2001], является ещё одним высокоаффинным конкурентным ингибитором печёночной гликогенфосфорилазы и лигандом кофеин-связывающего сайта [Oikonomakos, Schnier, et al., 2000; Rochester, Akiyode, 2014; Tsitsanou, Hayes, et al., 2013]. Данное соедине-

ние используют для определения фармакологической активности ингибиторов кофеин-связывающего сайта ГФ при сравнении с другими ингибиторами сайта. На основе флавопиридола было синтезировано ряд аналогов [Hayes, Kantsadi, Leonidas, et al., 2014; Tsitsanou, Hayes, et al., 2013].

### **Ингибиторы аллостерического АМФ связывающего сайта**

Аллостерический сайт, с которым связывается активатор АМФ и естественный ингибитор глюкозо-6-фосфат, расположен на поверхности двух субъединиц на расстоянии – 30 Å от каталитического сайта. Этот сайт вызывает в последнее время значительный интерес исследователей [Oikonomakos, 2002].

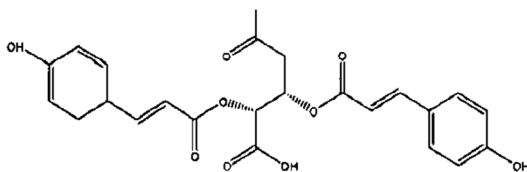
Одними из первых соединений, которые исследовались в качестве лигандов АМФ-связывающего сайта W1807 и пролекарство R3401 [Hayes, Kantsadi, Leonidas, et al., 2014; Bergans, Stalmans, et al., 2000]. Выявлен ряд соединений ингибирующих ГФ в наномолекулярных концентрациях среди производных дигидропиридина, бензоилфенилмочевины, ацетилмочевины, фталевой кислоты [Hayes, Kantsadi, Leonidas, et al., 2014; Somsak, Czifrak, et al., 2008].

Соединение W1807 (XI) (Рис. 5.6.), некоторые аналоги дигидропиридина, аналоги фенилдикарбоновых кислот и феноксифталаты, связываясь с данным сайтом, ингибируют базальную и глюкагон-индуцированную продукцию глюкозы в культуре клеток гепатоцитов, что приводит к значительному снижению пика глюкагон-индуцируемой гипергликемии при введении крысам [Oikonomakos, 2002; Somsak, Czifrak, et al., 2008; Zographos, Oikonomakos, et al., 1997].

Соединение FR 258900 (X) связывается с аллостерическим сайтом для АМФ ГФ и оказывает ингибирующее воздействие на печёночную ГФ человека. При моделировании СД у мышей данное соединение значительно уменьшает концентрацию глюкозы в плазме, а также стимулирует синтез гликогена и гликогенсинтазы в гепатоцитах крыс,  $IC_{50} = 2.5$  мкМ (человеческая ГФ печени)  $K_i = 0.46$  мкМ (мышечная ГФ кролика) [Andersen, Rassov, et al., 1999]. Таким образом, FR 258900 можно считать новым потенциальным антидиабетическим препаратом. На основе FR 258900 было синтезировано ряд активных производных [Hayes, Kantsadi, Leonidas, et al., 2014; Somsak, Czifrak, et al., 2008].

### Ингибиторы индолкарбоксамидного сайта

Данная группа представлена: производными индола 2-карбоксамидов (CP-320626 (12) (Рис. 5.6), CP-91149, CP-316819), индол-2-тиенопиррола карбоксамидом, N-ароил-фенилаланинамида, 5-хлориндол-2-карбоксамидом и фенил и бензил замещенными 2-оксо-гексагидро и тетрагидробензоиндол карбоновой кислоты [Hayes, Kantsadi, Leonidas, et al., 2014; Somsak, Czifrak, et al., 2008].



X

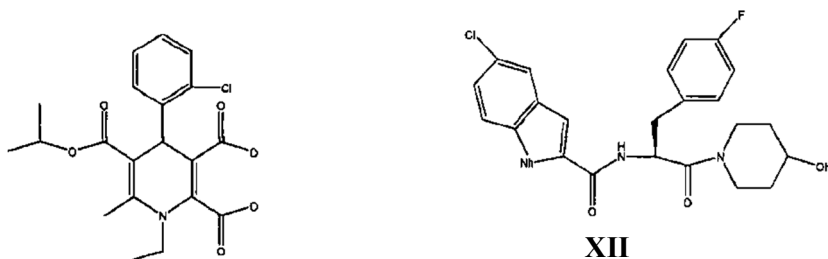


Рис. 5.6. Ингибиторы индол связывающего и АМФ связывающего сайта ГФ:  
X – FR 258900, XI – W1807, XII – CP320626

Из ингибиторов индол связывающего сайта наиболее изучено соединение CP-316819 и его аналог CP-91149, которые связываются с менее активной  $\beta$  формой ГФ и препятствуют её переходу в активную конформацию [Martin, Hoover, et al., 1998; Baker, Timmons, Greenhaffl, 2005]. При анализе активности соединения было доказано, что CP-91149 имеет схожую структуру, что и кофеин и ингибирует глюкагон. При проведении эксперимента у мышей с СД типа 2 вещество снижало уровень глюкозы не вызывая гипогликемию и не влияло на уровень глюкозы у интактных животных [Martin, Hoover, et al., 1998].



Доказано, что этот класс ингибиторов ГФ оказывает кардиопротекторное воздействие, что делает эти соединения привлекательными для дальнейшего доклинического исследования, для пациентов с сердечно – сосудистыми осложнениями [Tracey, Treadway, et al., 2004].

Действие ингибитора ГФ, GPi688 направлено на регуляцию секреции глюкагона, который вызывают гипергликемию. В печени крысы, GPi688 ингибирует глюкагон, в результате чего активность ГФ снижается, а ГС возрастает в семь раз. При исследовании на крысах разных видов GPJ688 ингибирует глюкагон- индуцированную гипергликемию у Wistar (65%) и Zucker (100%) крыс [Poucher, Freeman, et al., 2007].

Ингибиторы ГФ снижают распад гликогена и ППП и воздействуют на один из основных патогенетических факторов СД 2 типа, помимо всех этих функций так же описаны кардиопротекторные свойства и противоопухольевый эффект [Tracey, Treadway, et al., 2004; Ma, Wang, Zhao, et al., 2012]. Больные СД 2 имеют повышенный риск развития сердечно – сосудистых осложнений, вследствие изменений в метаболизме жирных кислот, минимальной скорости окисления глюкозы, а также из-за значительного нарушения баланса гликолиза увеличивается чувствительность к ишемическим повреждениям. В связи с этим возникает вопрос о предотвращении неблагоприятных последствий СД 2 [Кононенко, Смирнова, 2007; Дедов, Шестаковой, 2011; Балаболкин Диабетология, 2000].

Таким образом, если повысить гликолитическую и окислительную функцию за счет снижения гликолиза, то можно будет ожидать протекторное действие на кардиомиоциты [Depge, Vanoverschelde, Taegt-meyer, 1999]. При уменьшении гликогенолиза посредством снижения активности превращения ГФ в активную форму, а, приводит к уменьшению накопления лактата и  $H^+$  [Murry, Richard, et al., 1990; Mamedova, Shneyvaus, et al., 2003]. В результате ингибирования ГФ в конечном итоге получаем улучшение гликолиза и снижение нагрузки ионных каналов и тем самым достигается кардиопротекция без нежелательных изменений в сердечной функции и гемодинамики [Knight, Smith, et al., 2001; Pescador, Villar, Cifuentes, et al., 2010; Shen, Zhang, et al., 2010]. При истощении гликогена, в результате ограничения миокардиального анаэробного гликолиза и связанного с ним увеличения выброса ионов, уменьшает ишемическое повреждение сердца [Pescador, Villar, Cifuentes, et al., 2010; Shen, Zhang, et al., 2010]. Данный эффект был подтвержден Tracey

и соав., так при исследовании ингибитора ГФ, CP-368296 5 (ingliforib,) снижался размер инфаркта миокарда на 69 %, как *in vitro*, так и в естественных условиях моделирования ишемии-реперфузии сердца у кроликов. Кроме того, не отмечалось значительных изменений в функции сердца, вызванных соединением [Tracey, Treadway, et al., 2004].

Таким образом, ингибирование ГФ может представлять собой привлекательную цель для кардиопротекции, при лечении диабетических больных с повышенным риском сердечно – сосудистых осложнений.

Различные наблюдения показывают, что количество гликогена варьирует в опухолевых клетках. Особенно высокий уровень был найден в раковых клетках молочной железы, почек, матки, мочевого пузыря, кожи и головного мозга [Berg, Tymoczko, et al., 2002].

Недавние исследования доказывают, что гликоген играет важную роль в жизнеспособности опухолевых клеток [Pelletier, Bellot, et al., 2012; Favaro, Bensaad, et al., 2012]. Было выяснено, что ингибирование распада гликогена приводит к индуцированию апоптоза в опухолевых клетках поджелудочной железы [Pelletier, Bellot, et al., 2012; Favaro, Bensaad, et al., 2012; Lee, Guo, et al., 2004].

Увеличение числа раковых клеток происходит за счет активного синтеза РНК, ДНК и жирных кислот, что в свою очередь вызывает повышенную потребность в глюкозе. В "S" фазе жизненного цикла опухолевой клетки требуется быстрое расходование внутриклеточного хранилища глюкозы, регуляторным ферментом которого является гликогенфосфоорилаза [Ma, Wang, Zhao, et al., 2012; Favaro, Bensaad, et al., 2012]. Следовательно, воздействуя на активность ГФ, можно будет управлять клеточным циклом раковых клеток.

Так же было доказано, что синтез гликогена индуцируется в условиях гипоксии, что повышает выживаемость опухолевых клеток. Распад гликогена путем ингибирования ГФ обеспечивает источник глюкозо-6-фосфат, и ограничивает внутриклеточный уровень гликогена [Pescador, Villar, Cifuentes, et al., 2010; Shen, Zhang, et al., 2010; Favaro, Bensaad, et al., 2012].

Lee W.-N.P. [Ma, Wang, Zhao, et al., 2012] продемонстрировано, что ингибирование ГФ тормозит распада гликогена также ингибирует пролиферацию раковых клеток и индуцирует апоптоз путем ограничения окисления глюкозы, а и синтеза жирных кислот *de novo*. Повышенные

концентрации (50 – 100 мМ) ингибитора ГФ СР-320676 изменяли перераспределение глюкозы и пентозы во время гликолиза и синтеза жирных кислот в клетках аденокарциномы поджелудочной железы. Ограничение окислительного пентозофосфатного пути и вклада глюкозы в синтез ацетил-КоА и жирных кислот *de novo* тесно коррелировал со снижением пролиферации клеток. В заключение следует отметить, торможение роста раковых клеток поджелудочной железы и гибель тесно связаны с характерным снижением распада гликогена и перераспределением углерода глюкозы для синтеза РНК/ДНК и жирных кислот при инкубации с ингибитором ГФ. При оценке динамики обмена веществ раковых клеток установлено значительное дозозависимое уменьшение синтеза макромолекул, которые были обнаружены при более низких дозах испытуемого соединения, до появления маркеров апоптоза.

Таким образом, торможение синтеза гликогена при ингибировании ГФ может успешно использоваться для создания лекарственных препаратов, эффективно снижающих рост быстро делящихся клеток опухолей.

Ингибирование гликогенолиза является одним из перспективных фармакологических подходов возможной терапии СД2. Ингибиторы ГФ снижают распад гликогена и ППП и воздействуют на один из основных патогенетических факторов. ППП определяется балансом между четырьмя основными процессами: глюконеогенез, гликогенолиз и гликолиз, глюконеогенез. Снижение активности ГФ значительно ослабляет гипергликемию, а также не приводит к гипогликемии, что является одним из важнейших аспектов в сахароснижающей терапии. Выше сказанное подтверждает актуальность и перспективность поиска новых соединений, ингибирующих ГФ.

## **Литература**

1. Аметов А. С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения //М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2012. – Т. 704.
2. Балаболкин М. И., Дедов И. И. Генетические аспекты сахарного диабета // Сахарный диабет. – 2000. – №. 1.
3. Дедов И.И. Шестаковой М.В. и др. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика //М.: ООО Изд-во «Медицинское информационное агентство». – 2011.
4. Aiston S., Coghlan M. P., Agius L. Inactivation of phosphorylase is a major component of the mechanism by which insulin stimulates hepatic glycogen synthesis // European Journal of Biochemistry. – 2003. – Т. 270. – №. 13. – С. 2773-2781.

5. Andersen B., Westergaard N. The effect of glucose on the potency of two distinct glycogen phosphorylase inhibitors // *Biochemical Journal*. – 2002. – T. 367. – №. 2. – C. 443-450.
6. Andersen B., Rassov A., Westergaard N., Lundgren K. Inhibition of glycogenolysis in primary rat hepatocytes by 1, 4-dideoxy-1, 4-imino-D-arabinitol // *Biochemical Journal*. – 1999. – T. 342. – №. 3. – C. 545-550.
7. Archontis G., Watson K.A., Xie Q., Andreou G.5 Chrysin E.D., Zographos S.E., Oikonomakos N.G., Karplus M. Glycogen phosphorylase inhibitors: a free energy perturbation analysis of glucopyranose spirohydantoin analogues // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2005. – T. 61. – №. 4. – C. 984-998.
8. Baker D.J., Timmons J.A., Greenhaff P.L. Glycogen Phosphorylase Inhibition in Type 2 Diabetes Therapy // *Diabetes*. 2005. V. 54. P. 2453-2454.
9. Barford D., Hu S. H., Johnson L. N. Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP // *Journal of molecular biology*. – 1991. – T. 218. – №. 1. – C. 233-260.
10. Barford D., Johnson L. N. The allosteric transition of glycogen phosphorylase. – 1989.
11. Benlifa M, Hayes J.M., Vidal S., Gueyrard D., Goekjian P.G., Praly J-P., Kizilis G., Tiraidis C, Alexacou K.M., Chrysin E.D., Zographos S.E., Leonidas D.D., Archontis G, Oikonomakos N.G. Glucose-based spiro-isoxazolines: A new family of potent glycogen phosphorylase inhibitors // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2009. – T. 17. – №. 20. – C. 7368-7380.
12. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry*. New York; W.H. Freeman. 2002.
13. Bergans N., Stalmans W., Goldmann S., Vanstapel F. BAY R3401 // *Diabetes*. 2000. V. 49. P. 1419-1426.
14. Bokor E., Szilagy E.; Doca T., Gergely P., Somsak L. Synthesis of substituted 2-( $\beta$ -d-glucopyranosyl)-benzimidazoles and their evaluation as inhibitors of glycogen phosphorylase // *Carbohydrate research*. – 2013. – T. 381. – C. 179-186.
15. Cheng A. Y. Y., Fantus I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus // *Canadian Medical Association Journal*. – 2005. – T. 172. – №. 2. – C. 213-226.
16. Czifrak K., Pahi A., Deak S., Kiss-Szikszai A., Kover K.E., Doca T., Gergely P., Alexacou K.M., Papakonstantinou M., Leonidas D.D., Zographos S.E., Chrysin E.D., Somsak L. Glucopyranosylidene-spiro-iminothiazolidinone, a new bicyclic ring system: Synthesis, derivatization, and evaluation for inhibition of glycogen phosphorylase by enzyme kinetic and crystallographic methods // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2014. – T. 22. – №. 15. – C. 4028-4041.
17. Depre C., Vanoverschelde J. L. J., Taegtmeier H. Glucose for the heart // *Circulation*. – 1999. – T. 99. – №. 4. – C. 578-588.

18. Docsa T., Czifrak K., Huse C, Somsak L., Gergely P. Glycogen Phosphorylase Inhibitor N-(3,5-Dimethyl-Benzoyl)-N'-(β-D-Glucopyranosyl) Urea Improves Glucose Tolerance under Normoglycemic and Diabetic Conditions and Rearranges Hepatic Metabolism// *Molecular Medicine REREPORTS*. 2011. V. 4. P. 477-481.
19. Ekstrom J.L., Pauly T.A., Carry M.D., Soeller W.C., Culp J., Danley D.E., Hoover D.J., Treadway J.L., Gibbs E.M., Fletterick R.J., Day Y.S., Myszka D.G., Rath V.L. Structure-activity analysis of the purine binding site of human liver glycogen phosphorylase // *Chemistry & biology*. – 2002. – T. 9. – №. 8. – C. 915-924.
20. Favaro E., Bensaad K., Chong M.G., Tennant D.A., Ferguson D.J., Snell C, Steers G., Turley H., Li J.L., Gunther U.L., Buffa F.M., McIntyre A., Harris A.L. Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells // *Cell metabolism*. – 2012. – T. 16. – №. 6. – C. 751-764.
21. Fosgerau K., Westergaard N., Quistorff B., Grunnet N., Kristiansen M., Lundgren K. Kinetic and functional characterization of 1, 4-dideoxy-1, 4-imino-d-arabinitol: a potent inhibitor of glycogen phosphorylase with anti-hyperglycemic effect in ob/ob mice // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2000. – T. 380. – №. 2. – C. 274-284.
22. Gaboriaud-Kolar N., Skaltsounis A. L. Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review (2008–2012) // *Expert opinion on therapeutic patents*. – 2013. – T. 23. – №. 8. – C. 1017-1032.
23. Hampson L.J, Arden C, Agius L, Ganotidis M, Kosmopoulou M.N, Tiraidis C, Elemen Y, Sakarellos C, Leonidas D.D., Oikonomakos N.G. Bioactivity of glycogen phosphorylase inhibitors that bind to the purine nucleoside site // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2006. – T. 14. – №. 23. – C. 7835-7845.
24. Hayes J. M., Kantsadi A. L., Leonidas D. D. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes // *Phytochemistry Reviews*. – 2014. – T. 13. – №. 2. – C. 471-498.
25. Hellerstein M.K., Neese R.A., Linfoot P., Christiansen M., Turner S., Letscher A. Hepatic gluconeogenic fluxes and glycogen turnover during fasting in humans. A stable isotope study // *J. Clin. Invest.* 1997. V. 100. P. 1305-1319.
26. Home G., Wilson F.X., Tinsley J., Williams D.H., Storer R. Iminosugars past, present and future: medicines for tomorrow // *Drug discovery today*. – 2011. – T. 16. – №. 3. – C. 107-118.
27. Hoover D.J., Lefkowitz-Snow S., Burgess-Henry J.L., Martin W.H., Armento S.J., Stock I.A., McPherson R.K., Genereux P.E., Gibbs E.M., Treadway J.L. Indole-2-carboxamide inhibitors of human liver glycogen phosphorylase // *Journal of medicinal chemistry*. – 1998. – T. 41. – №. 16. – C. 2934-2938.
28. Johnson L. N. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors // *The FASEB journal*. – 1992. – T. 6. – №. 6. – C. 2274-2282.

29. Kaiser A., Nishi K., Gorin F.A., Walsh D.A., Bradbury E.M., Schnier J.B. The cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase //Archives of biochemistry and biophysics. – 2001. – T. 386. – №. 2. – C. 179-187.
30. Kasvinsky P.J., Madsen N.B., Sygusch J., Fletterick R.J. The regulation of glycogen phosphorylase a by nucleotide derivatives //J Biol Chem. – 1978. – T. 253. – C. 3343-3351.
31. Knight D.R., Smith A.H., Flynn D.M., MacAndrew J.T., Ellery S.S., Kong J.X., Marala R.B., Wester R.T., Guzman-Perez A., Hill R.J., Magee W.P., Tracey W.R. A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, zoniporide, reduces ischemic myocardial injury in vitro and in vivo //Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2001. – T. 297. – №. 1. – C. 254-259.
32. Krimm I., Lancelin J. M., Praly J. P. Binding evaluation of fragment-based scaffolds for probing allosteric enzymes //Journal of medicinal chemistry. – 2012. – T. 55. – №. 3. – C. 1287-1295.
33. Lee W.N., Guo P., Lim S., Bassilian S., Lee ST., Boren J., Cascante M., Go V.L., Boros L.G. Metabolic sensitivity of pancreatic tumour cell apoptosis to glycogen phosphorylase inhibitor treatment //British journal of cancer. – 2004. – T. 91. – №. 12. – C. 2094-2100.
34. Lerario A.C., Chacra A. R., Pimazoni-Netto A. Algorithm for the treatment of type 2 diabetes: a position statement of Brazilian Diabetes Society //Diabetology & metabolic syndrome. – 2010. – T. 2. – №. 1. – C. 1.
35. Long Y. C., Zierath J. R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation //The Journal of clinical investigation. – 2006. – T. 116. – №. 7. – C. 1776-1783.
36. Ma D., Wang J., Zhao Y., Lee W.N., Xiao J, Go V.L., Wang Q., Recker R.R., Xiao G.G. Inhibition of glycogen phosphorylation induces changes in cellular proteome and signaling pathways in MIA pancreatic cancer cells.// Pancreas. 2012. V. 41. P. 397-408.
37. Mamedova L.K., Shneyvays V., Katz A., Shainberg A. Mechanism of glycogen supercompensation in rat skeletal muscle cultures. // Mol. Cell. Biochem. 2003. V. 250. P. 11-19.
38. Martin J.L., Veluraja K., Ross K., Johnson L.N., Fleet G. W.J., Ramsden N.G., Bruce I., Orchard M.G., Oikonomakos N.G., Papageorgiou A.C., Leonidas D.D., Tsitoura H.S. Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylase: the design of potential drugs for diabetes //Biochemistry. – 1991. – T. 30. – №. 42. – C. 10101-10116.
39. Martin W.H., Hoover D.J., Armento S.J., Stock I.A., McPherson R.K., Danley D.E., Stevenson R.W., Barrett E.J., Treadway J.L. Indole-2-carboxamide inhibitors of human liver glycogen phosphorylase //Journal of medicinal chemistry. – 1998. – T. 41. – №. 16. – C. 2934-2938

40. Murry C.E., Richard V.J., Reimer K.A., Jennings R.B. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. // *Circ Res.* 1990. V. 66 P. 913-931.
41. Nagy L., Docsa T., Szanto M., Brunyanszki A., Hegedus C., Marton J., Konya B., Virag L., Somsak L., Gergely P., Bai P. Glycogen phosphorylase inhibitor N-(3, 5-dimethyl-benzoyl)-N'-( $\beta$ -D-glucopyranosyl) urea improves glucose tolerance under normoglycemic and diabetic conditions and rearranges hepatic metabolism // *PLoS one.* – 2013. – T. 8. – №. 7. – C. e69420.
42. Nagy V., Benlifa M., Vidal S., Berzsenyi E., Teilhet C, Czifrak K., Batta G., Docsa T., Gergely P., Somsak L., Praly J-P. Glucose-based spiro-heterocycles as potent inhibitors of glycogen phosphorylase // *Bioorg. Med. Chem.* 1995. V. 17. P. 5696-5707.
43. Newgard C. B., Hwang P. K., Fletterick R. J. The Family of Glycogen Phosphorylases: Structure and Function // *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* – 1989. – T. 24. – №. 1. – C. 69-99.
44. Oikonomakos N. G. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy // *Current Protein and Peptide Science.* – 2002. – T. 3. – №. 6. – C. 561-586.
45. Oikonomakos N.G, Tiraidis C, Leonidas D.D, Zographos S.E, Kristiansen M, Jessen C.U, Norskov-Lauritsen L, Agius L. Iminosugars as potential inhibitors of glycogenolysis: structural insights into the molecular basis of glycogen phosphorylase inhibition // *Journal of medicinal chemistry.* – 2006. – T. 49. – №. 19. – C. 5687-5701.
46. Oikonomakos N.G., Kontou M., Zographos S.E., Watson K.A., Johnson L.N., Bichard J.F., Fleet G.W.J. Potent inhibition of glycogen phosphorylase by a spirohydantoin of glucopyranose: first pyranose analogues of hydantocidin // *Tetrahedron letters.* – 1995. – T. 36. – №. 12. – C. 2145-2148.
47. Oikonomakos N.G., Schnier J.B., Zographos S.E., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Johnson L.N. Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site // *Journal of Biological Chemistry.* – 2000. – T. 275. – №. 44. – C. 34566-34573.
48. Oikonomakos N.G., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Gavalas N.G., Johnson L.N. A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions // *Structure.* – 2000. – T. 8. – №. 6. – C. 575-584.
49. Oikonomakos N.G., Tiraidis C, Leonidas D.D., Zographos S.E., Kristiansen M, Jessen C.U, Norskov-Lauritsen L, Agius L. Iminosugars as potential inhibitors of glycogenolysis: structural insights into the molecular basis of glycogen phosphorylase inhibition // *Journal of medicinal chemistry.* – 2006. – T. 49. – №. 19. – C. 5687-5701.
50. Parmenopoulou V., Kantsadi A.L., Tsirkone V.G., Chatzileontiadou D.S., Manta S., Zographos S.E., Molfeta C, Archontis G., Agius L., Hayes J.M., Leonidas D.D., Komiotis D. Structure based inhibitor design targeting glycogen phosphorylase b. Virtual screening, synthesis, biochemical and biological assessment of novel N-acyl- $\beta$ -

d-glucopyranosylamines //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2014. – T. 22. – №. 17. – C. 4810-4825.

51. Pelletier J., Bellot G., Gounon P., Lacas-Gervais S., Pouysse'gur J., Mazure N.M. Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival // Front Oncol. 2012. V. 2. P. 18.

52. Pescador N., Villar D., Cifuentes D., Garcia-Rocha M., Ortiz-Barahona A., Vazquez S., Ordonez A., Cuevas Y., Saez-Morales D., Garcia-Bermejo M.L. Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1 //PLoS One. – 2010. – T. 5. – №. 3. – C. e9644.

53. Poucher S.M., Freeman S., Loxham S.J., Convey G., Bartlett J.B., De Schoolmeester J., Teague J., Walker M., Turnbull A.V., Charles A.D., Carey F., Berg S. An assessment of the in vivo efficacy of the glycogen phosphorylase inhibitor GPI688 in rat models of hyperglycaemia //British journal of pharmacology. – 2007. – T. 152. – №. 8. – C. 1239-1247.

54. Rochester C. D., Akiyode O. Novel and emerging diabetes mellitus drug therapies for the type 2 diabetes patient //World J Diab. – 2014. – T. 5. – №. 3. – C. 305-15.

55. Ross S.A., Gulve E.A., Wang M. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. // Chem. Rev. 2004. V. 104. P. 1255-82.

56. Shen G.M., Zhang F.L., Liu X.L., Zhang J.W. Hypoxia-inducible factor 1-mediated regulation of PPP1R3C promotes glycogen accumulation in human MCF-7 cells under hypoxia //FEBS letters. – 2010. – T. 584. – №. 20. – C. 4366-4372.

57. Somsak L. Synthesis of 2-(β-D-glucopyranosylamino)-5-substituted-1,3,4-oxadi-azoles for inhibition of glycogen phosphorylase// C. R. Chim. 2011. V. 14. P. 211-223.

58. Somsak L., Bokor E., Czibere B., Czifrak K., Koppány C, Kulcsar L., Kun S., Szilágyi E., Toth M., Docsa T., Gergely P. Synthesis of C-xylopyranosyl-and xylopyranosylidene-spiro-heterocycles as potential inhibitors of glycogen phosphorylase // Carbohydrate research. – 2014. – T. 399. – C. 38-48.

59. Somsak L., Czifrak K., Toth M., Bokor E., Chrysiná E.D., Alexácou K.M., Hayes J.M., Tiráidis C, Lazoura E., Leonidas D.D., Zographos S.E., Oikonomákos N.G. New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents // Current medicinal chemistry. – 2008. – T. 15. – №. 28. – C. 2933-2983.

60. Somsak L., Kovács L., Toth M., Osz E., Szilágyi L., Györgydeák Z., Dinya Z., Docsa T., Toth B., Gergely P. Synthesis of and a comparative study on the inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by epimeric pairs of d-glucopyranosylidene-spiro-(thio) hydantoins and N-(d-glucopyranosyl) amides // Journal of medicinal chemistry. – 2001. – T. 44. – №. 17. – C. 2843-2848.



61. Sprang S.R., Withers S.G., Goldsmith E.J., Fletterick R.J., Madsen N.B. Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate // *Science*. – 1991. – T. 254. – №. 5036. – C. 1367-1371.

62. Sprang S.R., Acharya K.R., Goldsmith E.J., Stuart D.I., Varvill K., Fletterick R.J., Madsen N.B., Johnson L.N. Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate // *Science*. – 1991. – T. 254. – №. 5036. – C. 1367-1371.

63. Tracey W.R., Treadway J.L., Magee W.P., Sutt J.C., McPherson R.K., Levy C.B., Wilder D.E., Yu L.J., Chen Y., Shanker R.M., Mutchler A.K., Smith A.H., Flynn D.M., Knight D.R. Cardioprotective effects of ingliforib, a novel glycogen phosphorylase inhibitor // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2004. – T. 286. – №. 3. – C. H1177-H1184.

64. Treadway J. L., Mendys P., Hoover D. J. Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus // *Expert opinion on investigational drugs*. – 2001. – T. 10. – №. 3. – C. 439-454.

65. Tsitsanou K.E., Hayes J.M., Keramioti M., Mamais M., Oikonomakos N.G., Kato A., Leonidas D.D., Zographos S.E. Sourcing the affinity of flavonoids for the glycogen phosphorylase inhibitor site via crystallography, kinetics and QM/MM-PBSA binding studies: Comparison of chrysin and flavopiridol // *Food and chemical toxicology*. – 2013. – T. 61. – C. 14-27.

66. Varga G., Docsa T., Gergely P., Juhasz L., Somsak L. Synthesis of tartaric acid analogues of FR258900 and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2013. – T. 23. – №. 6. – C. 1789-1792.

67. Wagman A. S., Nuss J. M. Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes // *Current pharmaceutical design*. – 2001. – T. 7, №. 6. – C. 417-450.

68. Zographos S.E., Oikonomakos N.G., Tsitsanou K.E., Leonidas D.D., Chrysin E.D., Skamnaki V.T., Bischoff H., Goldmann S. Watson K.A., Johnson L.N. The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyldihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor // *Structure*. – 1997. – T. 5, №. 11. – C. 1413-1425.

## **6. Значение рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом, в лечении сахарного диабета 2 типа**

*В. А. Косолапов, А. А. Снасгов*

С момента открытия в начале 90-х годов ядерных рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR) стало ясно, что они являются важными факторами транскрипции, регулирующими метаболизм млекопитающих, клеточную дифференцировку и онкогенез. Эндогенными лигандами PPAR являются жирные кислоты и эйкозаноиды. Семейство PPAR рецепторов состоит из трех высоко гомологичных подтипов (PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\delta$  [также известный как PPAR- $\beta$ ] и PPAR- $\gamma$ ), которые кодируются отдельными генами. Установлено, что PPAR в основном локализованы в ядре клеток, хотя негеномные эффекты, связанные с цитоплазматическими PPAR, также описаны [Lonard, 2012]. (Рис. 6.1.) Общая структура сходна для всех трех изоформ лиганд-связывающего домена (LBD) PPAR и напоминает LBD других ядерных рецепторов (ЯР), таких как ретиноидный X-рецептор (RXR) и рецептор ретиноевой кислоты (RAR) [Zoete, 2007] (Рис. 6.1А). Домен состоит из узла из 13 спиралей и небольшого  $\beta$ -листа из 4х цепочек.

На рис. 6.1 показаны структуры трех изоформ PPAR наряду с вторичными элементами структуры: спиральями H1 – H12 и бета-нитями S1 – S4. Номенклатура вторичных структурных элементов основывается на RXR LBD. В сравнении с другими LBD ядерных рецепторов LBD PPAR содержит дополнительную спираль, названную H2, между первой бета-цепью и H3. Также, спирали H10 и H11 в PPAR фактически являются одной сплошной спиралью. Спиральи H4, H5, H8, H9 и зажаты между спиральями H1, H3, H7 и H10/H11 [Zoete, 2007].

Сайт связывания лиганда представляет большую полость с общим объемом от 1300 до 1400  $\text{Å}^3$ , что значительно больше той, что найдена в других ЯР. Он окружен спиральями H2', H3, H4, H5, H7, H10 / H11, H12 и  $\beta$ -нитями S3 и S4. Полость имеет Y-образную форму и состоит из входа, распространяющегося от поверхности белка и затем отходящего к двум рукавам: рукав I простирается в направлении AF-2 спирали H12, и рукав II, расположенной между спиралью H3 и бета-листом (Рис. 6.2).

Каждый рукав приблизительно 12 Å в длину. Рукав I единственная, по существу, полярная полость PPAR. Рукав II и вход в основном гидрофобны, что не удивительно, учитывая гидрофобный характер эндогенных лигандов. Часть входа, доступная для растворителя, по существу состоит из полярных остатков, т.е. Pro227, Arg288, Glu295 и Glu343 для PPAR-γ (Рис. 6.2В). Петля между спиралями H2 'и H3, расположенная на входе сайта связывания, является очень гибкой во всех PPAR. Это предполагает, что вход в сайт связывания потенциально может адаптироваться, позволяя большим лигандам войти в связывающий рукав без существенного изменения общей структуры LBD [Zoete, 2007].

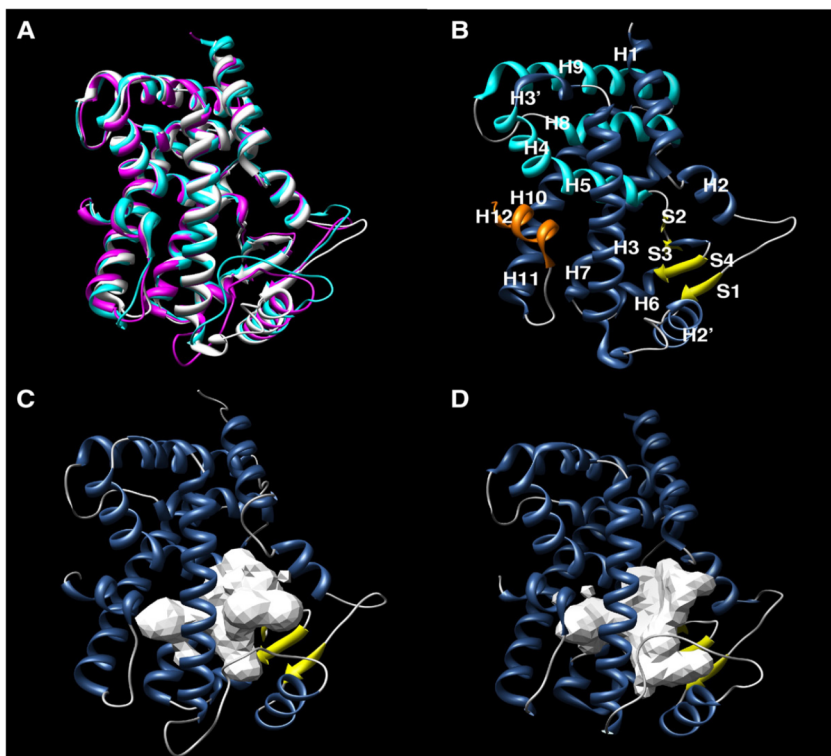
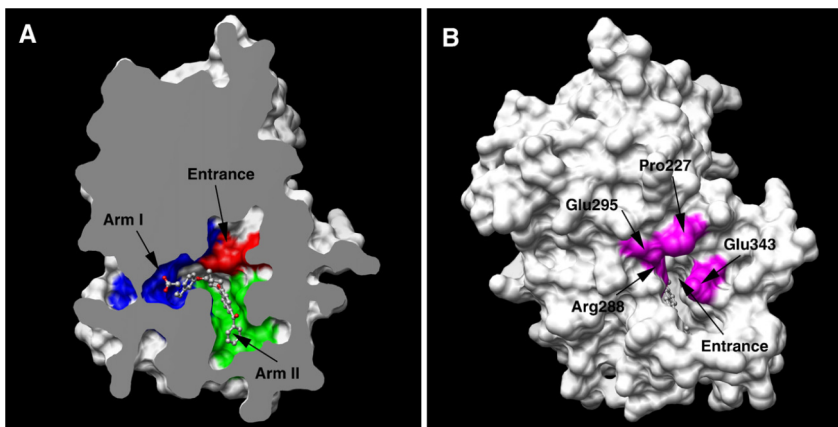


Рис. 6.1. 3D структура PPAR рецепторов:  
 (А) Общая структура PPAR; (В) 3D структура PPAR-α вместе со вторичными структурными элементами; (С) 3D структура PPAR-δ с сайтами связывания;  
 (D) 3D структура PPAR-γ с сайтом связывания



*Рис. 6.2. Сайт связывания лиганда PPAR:*

*(А) На срезе вход, рукава I и II; (В) Поверхность PPAR-γ со входом в домен связывания с наиболее важными аминокислотными остатками*

На примере PPAR-γ подробно изучен механизм активации PPAR. Активация PPAR включает в себя связывание лиганда с гидрофобным карманом, что приводит к конформационным изменениям в структуре PPAR. Это приводит к диссоциации кофакторных белков, таких как корепрессор ядерных рецепторов (NCoR) или коактиватор стероидного рецептора (SRC-1), которые ингибируют или усиливают транскрипцию генов, соответственно (Рис. 6.3А) [Lonard, 2012].

Высвобождение корепрессоров белков совпадает с гетеродимеризацией PPAR с ретиноидным X-рецептором (RXR). Гетеродимер PPAR-RXR затем выступает в качестве скаффолда для набора коактиваторных белков (например, PPAR-γ коактиватор-1 [PGC-1], p160/SRC-1 и белок-рецептор, чувствительный к витамину D3 [DRIP] или рецептор-ассоциированный белок гормонов щитовидной железы [TRAP]). Этот скаффолд, в свою очередь, рекрутирует гистон ацетил трансферазы и механизм генной транскрипции (комплекс РНК-полимеразы), который инициирует расслабление хроматина для запуска транскрипции целевых генов (рис. 6.2) [Lonard, 2012].

Первичный эффект активации PPAR-α, которые экспрессируются в скелетных мышцах, гладкой мускулатуре и эндотелии сосудов, печени, почках, сердце, моноцитах, макрофагах, жировой ткани [Chang,

2007], заключается в улучшении состава липопротеинов плазмы (снижении уровня триглицеридов липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), повышении уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и аполипопротеина А1, а также увеличении окисления свободных жирных кислот [Lalloyer, 2010]), снижением уровня С-реактивного белка и фибриногена в печени.

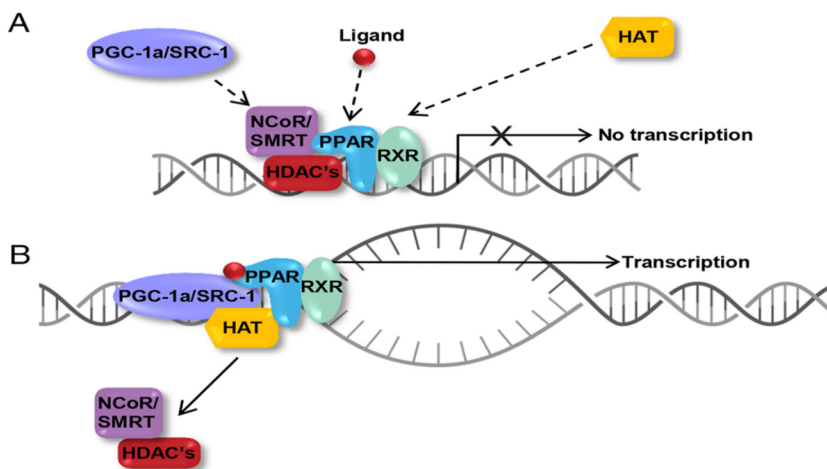


Рис 6.3. Механизмы активации PPAR:

*PGC-1* – PPAR- $\gamma$  коактиватор-1; *SRC-1* – коактиватор стероидного рецептора;

*NCoR* – корепрессор ядерных рецепторов; *RXR* – ретиноидный X-рецептор

PPAR- $\delta/\beta$  – наиболее широко экспрессируемый подтип PPAR, локализованный в коже, скелетных мышцах, мозге, легких, адипоцитах, макрофагах. Активация PPAR- $\delta/\beta$  вызывает антигипергликемическое, антидислипидемическое, противовоспалительное действие [Chang, 2007].

Существуют три основных изоформы PPAR- $\gamma$ . PPAR- $\gamma$ 1 экспрессируется в сердечной и скелетной мускулатуре, почках, панкреатических  $\beta$ -клетках, селезенке, тонкой кишке, гладкой мускулатуре сосудов, экспрессия PPAR- $\gamma$ 2 ограничена преимущественно жировой тканью, PPAR- $\gamma$ 3 экспрессируется в макрофагах, толстой кишке, адипоцитах [Kota, 2005; Chang, 2007]. Активации PPAR- $\gamma$  улучшает чувствительность рецепторов к инсулину и контроль уровня глюкозы и снижает уровень циркулирующих жирных кислот и провоспалительных маркеров сердеч-

но-сосудистых заболеваний и атеросклероза [Lalloyer, 2010]. PPAR- $\gamma$  играет ключевую роль в адипогенезе, индуцируя гены, вовлеченные в липогенез и адипогенез, такие как ССААТ/энхансер-связывающиеся белки  $\alpha$  (С/ЕВР $\alpha$ ), которые являются факторами транскрипции PPAR- $\gamma$ , участвуя т.о. в механизме обратной регуляции. Открытие доминантных отрицательных мутаций в PPAR- $\gamma$ , связанных с липодистрофической инсулинорезистентностью (ИР), свидетельствует о важной роли PPAR- $\gamma$  в развитии и функционировании жировой ткани [Agostini, 2006].

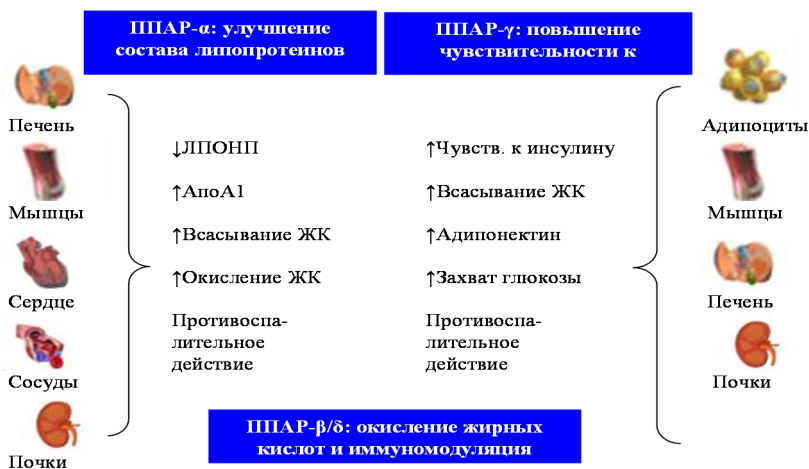


Рис. 6.4. Тканевые эффекты PPAR

Известно, что жировая ткань является местом продукции адипонектина – цитокина, секретируемого адипоцитами. У людей с ожирением и СД типа 2 концентрация адипонектина в плазме снижена. Низкий уровень адипонектина предшествует развитию ИР. Адипонектин стимулирует окисление жирных кислот, снижает уровень триглицеридов в плазме и улучшает метаболизм глюкозы за счет увеличения чувствительности к инсулину. Активация PPAR- $\gamma$  способствует экспрессии белка, транспортирующего жирные кислоты, увеличивает экспрессию гена адипонектина. Помимо адипонектина PPAR- $\gamma$  модулируют секрецию и других адипокинов, таких как резистин, фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО  $\alpha$ ), интерлейкин-6 (ИЛ-6) и моноцитарный хемоаттрактантный протеин (MCP-1) [Tontonoz, 2008]. PPAR- $\gamma$  также усиливает экспрессию гена транспортера

глюкозы ГЛЮТ-4 и субстратов инсулиновых рецептов СИР-1 и -2, участвует в регуляции белков, разобщающих окислительное фосфорилирование. Все это сопровождается снижением инсулинорезистентности и улучшением секреции инсулина  $\beta$ -клетками [Клебанова и др., 2005; Аметов, 2014].

Открытие противодиабетических препаратов из класса тиазолидиндионов как высокоселективных агонистов PPAR- $\gamma$ , было крупным прорывом в фармакологии PPAR [Lehmann, 1995]. Тиазолидиндионы (ТЗД) (глитазоны) являются мощными инсулин-сенситайзерами, которые эффективно и устойчиво улучшают гликемический контроль у пациентов с СД2 [Kahn, 2006]. Инсулинорезистентность (ИР) рассматривается в настоящее время как основополагающее патофизиологическое нарушение, ведущее к развитию СД 2 типа, и, соответственно, коррекция ИР приобретает главную роль в терапии СД 2 типа. Основной терапевтический эффект ТЗД заключается в увеличении чувствительности периферических тканей к инсулину и, как следствие, улучшении утилизации глюкозы, а также целом ряде других эффектов, опосредованных активацией PPAR- $\gamma$  (табл.6.1).

Таблица 6.1

**Механизмы действия тиазолидиндионов [Аметов, 2014]**

Механизм	Эффект
↑ Активность ГЛЮТ-1, ГЛЮТ-4 в мышечной и жировой ткани	↓ Инсулинорезистентность ↑ Захват глюкозы периферическими тканями
↑ Дифференцировка адипоцитов	↑ Чувствительность к инсулину ↓ Секреторная активность
↑ Лептин ↓ Адипонектин	↓ Масса висцеральной жировой ткани ↑ Окисление СЖК ↓ Триглицериды ↓ Инсулинорезистентность
↓ ФНО- $\alpha$ ↓ СЖК	↓ Инсулинорезистентность ↑ Секреция $\beta$ -клеток
↓ Активность фосфоенолпируваткарбоксикиназы	↓ Глюконеогенез ↓ Гипергликемия
↑ Активность фосфодиэстеразы 3В липопротеинлипазы	↓ Инсулинорезистентность ↓ Липолиз ↓ СЖК
↑ Пролиферация $\beta$ -клеток ↓ Гибель $\beta$ -клеток	↑ Секреция $\beta$ -клеток

Препараты из группы ТЗД применяются с 1997 г. Они были испытаны во многих клинических исследованиях, подтвердивших их эффективность для лечения и профилактики СД 2 типа. Была показана эффективность монотерапии СД 2 такими препаратами, как росиглитазон и пиоглитазон. При этом использование ТЗД в клинической практике ограничено целым рядом побочных эффектов, которые включают увеличение массы тела, задержку жидкости, что может спровоцировать сердечную недостаточность и костные переломы. Так первый внедренный ТЗД – троглитазон – был выведен из медицинской практики из-за большого числа случаев идиосинкратической гепатотоксичности [Shibuya, 1998].

Было установлено, что росиглитазон повышает риск осложнений сердечно-сосудистых заболеваний [Nissen, 2007], что послужило причиной остановки его применения в ЕС и ограничений применения в США.

В последнее время было пересмотрено соотношение выгоды-риска при применении пиоглитазона в связи с предполагаемым повышенным риском развития рака мочевого пузыря [Lewis, 2011].

Поиск новых безопасных агонистов PPAR активно продолжается (Таб. 2). Это привело к созданию селективных частичных агонистов PPAR- $\gamma$ , таких как соединение INT131.

В экспериментах на животных моделях диабета соединение INT131 вызывало меньшее увеличение веса по сравнению с пиоглитазоном или розиглитазоном, сохраняя при этом эффективность в снижении глюкозы в плазме крови [Motani, 2009]. Однако, в клиническом исследовании II фазы соединения INT131 было отмечено увеличение числа случаев отеков, увеличение массы тела и снижение гематокрита на 10 мг дозы по сравнению с плацебо, что лишний раз подчеркивает трудности в экстраполяции экспериментальных данных на клиническую практику [Dunn, 2011].

Одним из перспективных направлений является создание агонистов, активирующих несколько подтипов PPAR. Значительное структурное сходство PPAR- $\alpha$ , - $\delta$  и - $\gamma$ , в частности, в их лиганд-связывающих доменах, позволило идентифицировать нескольких синтетических двойных PPAR- $\alpha/\gamma$  агонистов (Табл. 6.1).



Таблица 6.2

**Активность различных агонистов PPAR и статус разработки  
[Wright, 2014]**

Соединение	Класс	EC <sub>50</sub> PPAR- $\alpha$ , нМ	EC <sub>50</sub> PPAR- $\gamma$ , нМ	EC <sub>50</sub> PPAR- $\delta$ , нМ	Настоящий статус
Фенофибрат	ППАР- $\alpha$ агонист	22400	1470	1060	Применение в медицинской практике
Троглитазон	ППАР- $\gamma$ агонист				Применение прекращено из-за гепатотоксичности
Росиглитазон	ППАР- $\gamma$ агонист	15000	245	8630	Применение прекращено в ЕС, ограничено применение в США из-за риска сердечно-сосудистых поражений
Пиоглитазон	ППАР- $\gamma$ агонист	11600	1160	9210	Применение в медицинской практике
Фарглитазар	Двойной PPAR- $\alpha/\gamma$ агонист	250	0.2	-	Проведена Фаза III, исследования прекращены
Тезаглитазар	Двойной PPAR- $\alpha/\gamma$ агонист	478С	342С	51000	Проведена Фаза IIb, исследования прекращены из-за риска поражения почек
Мураглитазар	Двойной PPAR- $\alpha/\gamma$ агонист	5680	243	16400	Проведена Фаза III, исследования прекращены из-за риска развития сердечно-сосудистых поражений
INT-131	Избирательный частичный PPAR- $\gamma$ агонист	-	4	-	Фаза II клинических испытаний
МК-0533	Частичный PPAR- $\gamma$ агонист	-	2	-	Фаза II, исследования прекращены
Алеглитазар	Двойной PPAR- $\alpha/\gamma$ агонист	5	9	376	Фаза III, исследования прекращены из-за отсутствия эффективности
GFT505	Двойной PPAR- $\alpha/d$ агонист	10-20	-	100 - 150	Фаза III, при неалкогольном стеатогепатозе и неалкогольной жировой болезни печени
Сароглитазар	Двойной PPAR- $\alpha/\gamma$ агонист	0,00065	3	-	Применение в Индии
Хиглитазар	Двойной PPAR- $\alpha/\gamma$ агонист	1200	80	-	Фаза II клинических испытаний

«-» – не активен

Была разработана гипотеза о наилучшем соотношении между эффективностью и побочными эффектами соединения, равноактивно стимулирующего PPAR- $\alpha$  и - $\gamma$ , такого как алеглитазар, по сравнению с моноагонистом PPAR- $\gamma$  или полиагонистами с различной активностью в отношении разных подтипов PPAR, таких как тезаглитазар и мураглитазар. 52-недельное исследование фазы IIb «AleNephro» подтвердило, что алеглитазар в суточной дозе 150 мг значительно улучшал гликемический и липидный профиль сравнимо с пиоглитазоном 45 мг, но демонстрировал более низкий уровень отеков (12,1% против 19,7%) [Ruilope, 2012].

Было инициировано исследование фазы III «AleCardio», которое было прервано из-за отсутствия эффективности в отношении сердечно-сосудистых исходов у пациентов с СД 2 и наличия стандартных для класса PPAR-агонистов побочных эффектов [Lincoff, 2014].

После открытия PPAR- $\alpha$  и - $\gamma$  в качестве мишеней для антигиперлипидемических и противодиабетических средств классов фибратов и глитазонов, роль PPAR в сосудистых и метаболических нарушениях была изучена более широко. В то время как PPAR- $\alpha$  агонисты (фенофибрат), как правило, хорошо переносятся, PPAR- $\gamma$  активация связана с увеличением массы тела, задержкой жидкости и переломами костей. Усилия по повышению эффективности и/или безопасности первого поколения активаторов PPAR- $\gamma$  (ТЗД) привели к пониманию сложности регулирования PPAR. Несмотря на более высокую доклиническую эффективность/безопасность новых веществ, не было получено клинических доказательств. Вероятно, будущие исследования фармакологии PPAR необходимо сосредоточить на оптимизации профиля взаимодействия с различными подтипами PPAR и снижении фосфорилирования PPAR.

## **Литература**

1. Аметов А.С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения: учеб. пос. - 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 1032с.
2. Клебанова Е.М., Балаболкин М.И., Креминская В.М. Инсулинорезистентность: ее роль в патогенезе сахарного диабета 2 типа и возможности коррекции // Лечащий врач. -2005. -№5.
3. Agostini M. et al. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPARgamma mutations cause lipodystrophic insulin resistance. (2006) Cell Metab. 4, 303–311.
4. Chang F., Jaber L.A., Berlie H.D., O'Connel M.B. Evolution of Peroxisome Proliferator-activated Receptor agonists // The annals of Pharmacotherapy. -2007. - Vol.41. - P.973-983.

5. Dunn FL, Higgins LS, Fredrickson J, DePaoli AM. Selective modulation of PPAR $\gamma$  activity can lower plasma glucose without typical thiazolidinedione side-effects in patients with Type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2011;25:151–158.
6. Kahn, S.E. et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformine, or glyburide monotherapy. *N. Engl. J. Med.* (2006) 355, 2427–2443.
7. Kota BP, Huang THW, Roufgalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*. 2005;51:85–94.
8. Lalloyer F, Staels B. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:894–899.
9. Lehmann, J.M. et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ). *J. Biol. Chem.* (1995) 270, 12953–12956.
10. Lewis, J.D. et al. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* (2011) 34, 916–922.
11. Lincoff AM, Tardif JC, Schwartz GG, Nicholls SJ, Ryden L, Neal B, Malmberg K, Wedel H, Buse JB, Henry RR, Weichert A, Cannata R, Svensson A, Volz D, Grobbee DE. Effect of Aleglitazar on Cardiovascular Outcomes After Acute Coronary Syndrome in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: The AleCardio Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2014;
12. Lonard DM, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nature Reviews – Endocrinology*. 2012;8:598–604.
13. Motani A, Wang Z, Weiszmann J, McGee LR, Lee G, Liu Q, Staunton J, Fang Z, Fuentes H, Lindstrom M, Liu J, Biermann DH, Jaen J, Walker NP, Learned RM, Chen JL, Li Y. INT131: a selective modulator of PPAR  $\gamma$ . *J Mol Biol*. 2009;386:1301–1311.
14. Nissen, S.E. and Wolski, K. Effects of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N. Engl. J. Med.* (2007) 356, 2457–2471.
15. Ruilope LM, Hanefeld M, Lincoff AM, Viberti G, Meyer-Reigner S, Volz D, Weiczorek Kirk D, Malmberg K, Herz M. Effects of aleglitazar on renal function in patients with stage 3 chronic kidney disease and type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:9B.
16. Shibuya, A. et al. An autopsy case of troglitazone-induced fulminant hepatitis. *Diabetes Care* (1998) 21, 2140–2143.
17. Tontonoz P., Spiegelman B.M. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR $\gamma$ . *Annu. Rev. Biochem.* 7 (2008) 7, 289–312.
18. Wright M.B., Bortolini M., Tadayyon M., Bopst B. Minireview: Challenges and opportunities in development of PPAR agonists // *Mol Endocrinol* 2014 doi: 10.1210/me.2013-1427.
19. Zoete V., Grosdidier A., Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators // *Biochimica et Biophysica Acta*. -2007. -Vol. 1771. -P.915–925.

## **7. Ингибиторы альфа-глюкозидазы в лечении сахарного диабета 2 типа**

*А. А. Спасов, В. А. Косолапов, О. Ю. Майка*

В процесс переваривания углеводов в пищеварительной системе человека вовлечены четыре альфа-глюкозидазы [Van Beers et al., 1995; Nichols et al., 2009]. Начальное переваривание осуществляется альфа-амилазами слюны и поджелудочной железы. Таким образом происходит превращение сложных углеводов в мальтозу, мальтотриозу, и другие  $\alpha$ -1,6 и  $\alpha$ -1,4 олигосахариды [Brayer et al., 2000]. Полученная смесь в конечном счете гидролизуется в глюкозу мальтаза-глюкоамилазой (MGAM; EC 3.2.1.20 and 3.2.1.3) и сахараза-изомальтазой (SI; EC 3.2.1.48 and 3.2.1.10). Обширные исследования были сосредоточены на этих альфа-глюкозидазах, и контроль их деятельности доказала свою эффективность в борьбе с постпрандиальным уровнем глюкозы в крови с целью снижения риска развития осложнений у больных сахарным диабетом [Jenkins, et al., 1981; Brayer, et al., 1995; Rabasa-Lhoret and Chiasson, 1998; Qin, et al., 2011].

Человеческая мальтаза-глюкоамилаза (MGAM) является одним из двух ферментов, ответственных за последний шаг в высвобождении глюкозы в углеводном пищеварении. MGAM находится в эпителиальных клетках тонкого кишечника и содержит две гомологичные гликозильные гидролазы семейства 31 (GH31) подгруппы 1, которая содержит характерную последовательность WiDMNE в их каталитических центрах: мембраносвязанную N-концевую субъединицу (NtMGAM) и C-концевую цитозольную субъединицу (CtMGAM). Структурный анализ комплекса NtMGAM-акарбоза показал, что акарбоза связывается с активным участком NtMGAM, главным образом через боковую цепь с ее белком акарвозином. Эти наблюдения, наряду с результатами кинетических исследований, позволяют предположить, что активный сайт NtMGAM содержит два первичных подсайта для связывания с сахарами, и что NtMGAM и CtMGAM различаются по субстратной специфичности, несмотря на их структурную взаимосвязь. Дополнительный анализ последовательности субъединицы CtMGAM предлагает несколько функций, которые могли бы объяснить более высокое сродство субблока CtMGAM для более длинных олигосахаридов мальтозы.

Активный участок NtMGAM – сайт, формирующийся в основном С-концевыми бета-цепями бочкообразной-структуры остатков ( $\beta/\alpha$ ) 8 (рис. 7.1). В нативной структуре этот сайт занимают две молекулы глицерина. Кроме того, петля N-концевого домена (остатки 200-217) и части каталитической вставки 1 и 2 находятся в непосредственной близости к ( $\beta/\alpha$ ) 8 бочка-структуре и вносят свой вклад в структуру сайта связывания.

Структурное сравнение комплекса NtMGAM- акарбоза и нативных структур NtMGAM не выявил каких-либо серьезных структурных изменений в структуре NtMGAM. Таким образом, можно сделать вывод, что ингибирование субъединицы NtMGAM не принесет эффективности в лечении сахарного диабета типа [Limei Ren, Xiaohong Qin et al., 2011].

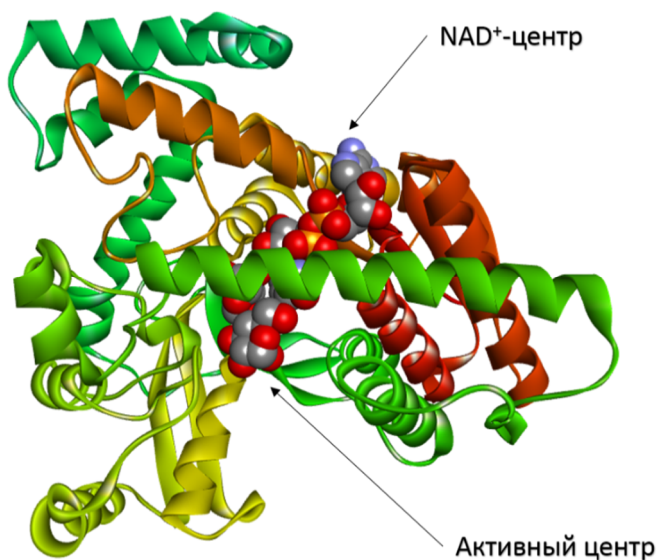


Рис. 7.1. Третичная структура  $\alpha$ -глюкозидазы

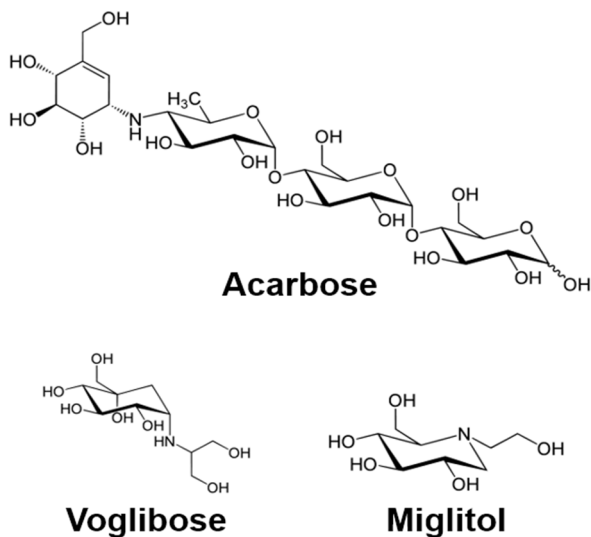
CtMGAM имеет молекулярную массу  $\sim 100$  кДа. CtMGAM имеет гораздо более высокую активность, чем NtMGAM; это субъединица с самой высокой активностью среди четырех «мальтаза» субъединиц [Quezada-Calvillo et al., 2008]. Следовательно, ингибирование активности CtMGAM доказало свою эффективность для лечения некоторых заболеваний, таких как сахарный диабет 2 типа или ожирение [Rossi и др.,

2006]. Акарбоза, пероральные антидиабетические лекарства, используемые в настоящее время, показывают более сильный уровень ингибирования CtMGAM, чем NtMGAM [Sim et al., 2010].

Акарбоза охватывает подсайты от -1 до + 3 CtMGAM, включая его негидролизуемый N-связывающий конец, занимая каталитический центр. Многочисленные водородные связи и гидрофобные взаимодействия участвуют во взаимодействии между CtMGAM и акарбозой. В районе подсайта -1 атомы NE2 из His1584 и OD2 из Asp1279 образуют водородные связи с химическими группами C3-OH и C4-OH ненасыщенной циклитольной единицы акарбозы. Дополнительная стабилизация первого углеводного кольца может привести к гидрофобным взаимодействиям с объемными боковыми цепями остатков Tyr1251, Trp1523 и Trp1418. На подсайте + 1, боковые цепи Asp1157 образуют две водородные связи с группами C2-OH и C3-OH-4,6-дидезокси-4-амино-D-глюкозы акарбозы. Кроме того, атом NH1 из Arg1510 образует водородную связь с группой C3-OH второго кольца. Остаточные Trp1355 и Phe1559 связываются с первым и вторым кольцом акарбозы, что приводит к стабилизации последней. Самое главное, что остаток Asp1526 образует одну водородную связь с атомом N4B акарбозы, который является кандидатом кислоты / основания каталитического остатка. В подсайте + 2, боковая цепь остатка Trp1369 связывается с третьим кольцом акарбозы. На подсайте + 3, два остатка Phe1560 и Pro1159 стабилизируют четвертое кольцо посредством гидрофобных взаимодействий. [Limei, Xiaohong, et al., 2011]

Ингибиторы альфа-глюкозидазы представлены акарбозой, миглитолом, воглибозой, однако в клинической практике в России широко применяется только один препарат, акарбоза (рис. 7.2). Это псевдосахариды которые конкурентно блокируют активные центры ферментов кишечных ворсинок, отвечающих за расщипление олиго- и дисахаридов до моносахаридов [Kamiyama и et al., 2010].

Следствием такой конкуренции являются замедление темпов расщепления сахаридов и, соответственно, их всасывания в кровь, снижение уровня постпрандиальной гипергликемии. Сродство акарбозы с кишечными энзимами постепенно уменьшается в следующей последовательности: альфа-глюкозидаза > сукраза > мальтаза > декстраназа. Установлено, что акарбоза ингибирует также панкреатическую альфа-амилазу [Borges, Silveira, 2006].



*Рис. 7.2. Клинически одобренные ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы*

Акарбоза плохо всасывается в желудочно-кишечном тракте и выводится с калом, в основном в неизмененном виде, до 30% препарата ферментируется микрофлорой толстого кишечника. Аналогично акарбозе, voglibose медленно и плохо всасывается и быстро выводится из организма с калом, метаболиты для данного препарата не выявлены.

В отличие от представленных выше соединений, miglitol не полностью всасывается в кишечнике и выводится в неизменённом виде почками. Ингибиторы альфа-глюкозидазы безопасны для пациентов даже при очень длительном применении, так как действуют исключительно в желудочно-кишечном тракте, не оказывают системного токсического действия.

Побочным эффектом данной группы является метеоризм и вызываемый им дискомфорт в желудочно-кишечном тракте, что в ряде случаев приводит к отказу от его применения [Дедов, Шестакова, 2011; Derosa, 2012]. Следует отметить, что, акарбоза может применяться в комбинации с другими антидиабетическими средствами (инъекции инсулина, препараты сульфанилмочевины, бигуаниды).

## **Гликемический контроль при сахарном диабете типа 2**

Эффективность сахароснижающего действия акарбозы оценивалась в многочисленных клинических исследованиях. Кохрейновский систематический обзор и мета анализ подтвердили, что терапия акарбозой приводит к уменьшению уровня HbA<sub>1c</sub> на 0,8% по сравнению с группой плацебо (95% Д.И., 0,64-0,90), снижению постпрандиального уровня глюкозы на 2,3ммоль/л (95% Д.И., 1,92 -2,73) и уровня глюкозы натощак на 1,1 ммоль/л (95% ДИ 0.83-1.35). Сопоставимая эффективность, продемонстрирована при клинических испытаниях воглибозы и миглитола [Floris, 2008].

### **Ингибиторы альфа глюкозидазы и «преддиабет»**

Одними из факторов риска сахарного диабета типа 2 (СД 2 типа) являются нарушенная гликемия натощак (НГН) и нарушенная толерантность к глюкозе (НТГ), которые объединены общим понятием «преддиабет». Накоплены данные, убедительно свидетельствующие о важной роли изменения образа жизни (снижение массы тела, расширение физической активности, уменьшение потребления жиров) в предотвращении развития СД-2 у лиц с НТГ. Так, в Diabetes Prevention Program (DPP) и Diabetes Prevention Study (DPS) по истечению трех лет исследований удалось добиться снижения риска развития сахарного диабета типа 2 у лиц с НТГ на 58% изменением образа жизни. Однако для большинства людей кардинальное изменение образа жизни является трудновыполнимой задачей. Однако приверженность к немедикаментозным методам профилактики СД типа 2 крайне низка, что свидетельствует о необходимости поиска медикаментозных путей воздействия на данный контингент пациентов.

В DPP (Diabetes Prevention Program), DREAM (Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication), и STOP-NIDDM Trial были предприняты попытки предотвратить развитие СД типа 2 или отдалить сроки его манифестации с помощью различных групп лекарственных препаратов, таких как метформин, розиглитазон и ингибиторы альфа-глюкозидазы (в частности акарбоза) соответственно [Дедов, Шестакова, 2011]. В исследовании STOP-NIDDM Trial относительное снижение риска перехода НТГ в СД типа 2 при назначении акарбозы составило 25 % [Chiasson, Josse, Gomis, Hanefeld, Karasik, et al., 2003].



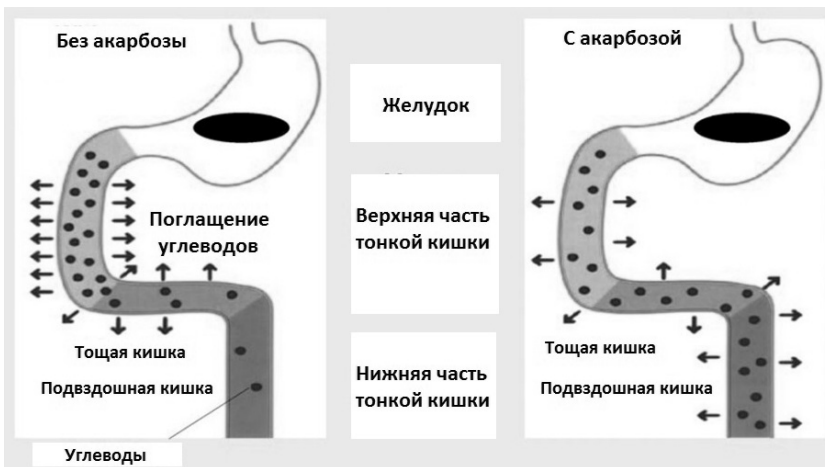


Рис. 7.3. Действие акарбозы, направленное на замедление всасывания углеводов

Помимо этого, в исследовании Kawamori, продемонстрировано, что voglibоза, снижает риска возникновения сахарного диабета у лиц с НТГ на 40% после 48 недель наблюдения. Однако отмечались побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта, что приводило к тому, что часть пациентов отказалась в дальнейшем участии в клинических испытаниях.

### **Роль ингибиторов альфа глюкозидазы в снижении кардиоваскулярного риска**

Помимо этого в исследовании STOP-NIDDM назначение акарбозы не только предупреждало развитие СД 2 типа, но и обеспечивало профилактику кардиоваскулярных заболеваний [Chiasson, 2003]. Было установлено, что снижение постпрандиальной гипергликемии после назначения акарбозы влияло на частоту сердечно-сосудистых осложнений. Следует отметить, что инфаркт миокарда значительно чаще встречался у пациентов, получавших плацебо, чем акарбозу.

Помимо этого, в исследовании STOP-NIDDM при ретроспективном анализе обнаружено, что в группе пациентов, получавших терапию акарбозой, отмечалось снижение систолического и диастолического артериального давления, а также относительный риск развития артериальной гипертензии был ниже на 34%, чем в группе плацебо. При артериальной

гипертензии (АГ) в сосудах происходит утолщение средней оболочки, уменьшение просвета и увеличение внеклеточного матрикса. Увеличение массы гладкомышечных клеток повышает степень вазоконстрикции вследствие влияния нейrogормонов, приводит к росту общего периферического сопротивления, что способствует стабилизации и усугублению АГ. Так в исследовании STOP-NIDDM при оценке структурных изменений средней оболочки сонной артерии выявлено, что снижалось увеличение толщины комплекса интима–медиа сонных артерий.

В соответствии с выводами еще одного ретроспективного мета-анализа семи рандомизированных испытаний (MeRia Study) акарбозы у 2180 пациентов с сахарным диабетом 2 типа длительностью год и более, было продемонстрировано значительное уменьшение инфаркта миокарда (9 против 19,  $p = 0,012$ ) и кардиоваскулярного риска (76 против 88,  $p = 0,006$ ). Помимо этого, в MeRia исследовании получены данные подобные STOP-NIDDM исследованию по влиянию на артериальное давление. Окончательная оценка снижения кардиоваскулярного риска при лечении акарбозой проведена в Acarbose Cardiovascular Evaluation (ACE) Trial [Chiasson, Josse, Gomis, et al., 2003].

Таким образом, ингибиторы альфа-глюкозидазы являются одним из эффективных средств медикаментозной профилактики СД типа 2 и кардиоваскулярной патологии, а поиск новых соединений с данным видом активности перспективным и актуальным.

### **Эффекты ингибиторов альфа глюкозидазы на секрецию ГПП-1 и микрофлору кишечника**

В настоящее время получены убедительные доказательства того, что ингибиторы альфа-глюкозидазы, в том числе акарбоза, увеличивает циркуляцию активного ГПП-1 и таким образом синергитически действует с ингибиторами ДПП-4 и уменьшает уровень глюкозо-инсулинотропного полипептида (ГИП).

Эффект повышения уровня ГПП-1 особенно заметен у больных сахарным диабетом 2 типа в стандартизированных пероральных тестах, когда после назначения ИГ значительно снижается уровень глюкозы инсулина и ГИП, а концентрация ГПП-1 выше до 50%. Полученные данные были подтверждены в исследовании 24-недельном исследовании у пациентов с сахарным диабетом типа 2. Так уровень ГПП-1 был выше как

натошак, так и после приема пищи на 10 % и 20 % соответственно во время терапии акарбозой [Seifarth и др., 1998].

При сочетанном назначении ИГ и ингибиторов ДПП4 выявлено более высокое увеличение площади под кривой уровня ГПП-1, чем при монотерапии ингибиторами ДПП-4. Таким образом, ИГ могут усиливать эффекты ГПП-1 [Moritoh, Takeuchi, Nazama, 2010].

Помимо своих эффектов на инкретины, акарбоза после приема пищи увеличивает уровень холецистокинина и пептид YY (РYY) снижает уровень грелина, таким образом, подавляя аппетит. Таким образом, ИГ могут оказывать комплексные эффекты на секрецию энтеро-эндокринных медиаторов и регулировать чувство насыщения и массу тела.

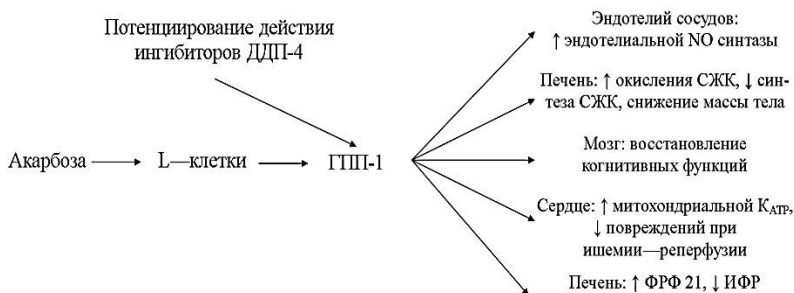


Рис. 7.4. Инкретиноподобные эффекты акарбозы

Продолжительное лечение акарбозой сопровождается увеличением микрофлоры массы в толстой кишке. В этом отношении особенно выделяются лактобактерии. Данный процесс сопровождается микробной ферментацией углеводов со снижением рН фекальных масс. В определенной степени это напоминает эффект, достигаемый с помощью лактулозы, уменьшающей при гепатозэнцефалическом синдроме явления энцефалопатии. Поэтому акарбоза может быть использована при лечении цирроза печени у больных сахарным диабетом.

Кроме того, под влиянием акарбозы происходит снижение уровня альфа-гидроксибутирата, предотвращение гипераммонемии и снижение рН в кишечнике. Как известно, при СД риск развития рака толстой кишки на 30 % выше, чем в популяции. Биохимические изменения в кишечнике,

развивающиеся под влиянием акарбозы, способствуют значительному снижению риска развития этой злокачественной опухоли.

В последние годы активно ведется поиск эффективных ингибиторов  $\alpha$ -глюкозидазы из природных источников для дальнейшей разработки функционального питания или средств для комплексной терапии сахарного диабета типа 2. Следует отметить, что у многих фитокомпонентов, таких как флавоноиды, алкалоиды, терпеноиды, антоцианы, гликозиды, фенольные соединения, были обнаружены альфа-глюкозидаза ингибирующие свойства.

## Литература

1. Borges de Melo E., da Silveira Gomes A., Carvalho I.  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity // *Tetrahedron*. 2006. Vol. 62, № 44. P. 10277–10302.
2. Brayer, G.D., Sidhu, G., Maurus, R., Rydberg, E.H., Braun, C., Wang, Y., Nguyen, N.T., Overall, C.M., and Withers, S.G. (2000). Subsite mapping of the human pancreatic alpha-amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques. *Biochemistry* 39, 4778–4791.
3. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A L.M. STOP-NIDDM Trial Research Group Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial // *JAMA*. 2003. Vol. 290.
4. Derosa G. M.P.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice // *Arch Med Sci*. 2012. P. 899–906.
5. Floris Alexander van de Laar. Alfa-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes // *Vasc. Heal. Risk Manag*. 2008. P. 1189–1195.
6. Jenkins, D.J., Taylor, R.H., Goff, D.V., Fielden, H., Misiewicz, J.J., Sarson, D.L., Bloom, S.R., and Alberti, K.G. (1981). Scope and specificity of acarbose in slowing carbohydrate absorption in man. *Diabetes* 30, 951–954.
7. Kamiyama O. et al. In vitro inhibition of alpha-glucosidases and glycogen phosphorylase by catechin gallates in green tea // *Food Chem*. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 122, № 4. P. 1061–1066.
8. Limei Ren, Xiaohong Qin, Xiaofang Cao, Lele Wang, Fang Bai, Gang Bai, Yuequan Shen et al. Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase, *Protein Cell* 2011, 2(10): 827–836
9. Moritoh Y., Takeuchi K., Hazama M. Combination treatment with alogliptin and voglibose increases active GLP-1 circulation, prevents the development of diabetes and preserves pancreatic  $\beta$ -cells in prediabetic db/db mice // *Diabetes, Obes. Metab*. 2010. Vol. 12, № 3. P. 224–233.

10. Nichols, B.L., Quezada-Calvillo, R., Robayo-Torres, C.C., Ao, Z., Hamaker, B.R., Butte, N.F., Marini, J., Jahoor, F., and Sterchi, E.E. (2009). Mucosal maltase-glucoamylase plays a crucial role in starch digestion and prandial glucose homeostasis of mice. *J Nutr* 139, 684–690.
11. Qin, X., Ren, L., Yang, X., Bai, F., Wang, L., Geng, P., Bai, G., and Shen, Y. (2011). Structures of human pancreatic  $\alpha$ -amylase in complex with acarviosatins: Implications for drug design against type II diabetes. *J Struct Biol* 174, 196–202.
12. Quezada-Calvillo, R., Sim, L., Ao, Z., Hamaker, B.R., Quaroni, A., Brayer, G.D., Sterchi, E.E., Robayo-Torres, C.C., Rose, D.R., and Nichols, B.L. (2008). Luminal starch substrate «brake» on maltaseglucoamylase activity is located within the glucoamylase subunit. *J Nutr* 138, 685–692.
13. Rabasa-Lhoret, R., and Chiasson, J.L. (1998). Potential of alphaglucoamidase inhibitors in elderly patients with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Drugs Aging* 13, 131–143.
14. Seifarth C. et al. Prolonged and enhanced secretion of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) after oral sucrose due to alfa-glucoamidase inhibition (acarbose) in type 2 diabetes patients // *Diabet. Med.* 1998. Vol. 15, № 6. P. 485–491.
15. Sim, L., Quezada-Calvillo, R., Sterchi, E.E., Nichols, B.L., and Rose, D.R. (2008). Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *J Mol Biol* 375, 782–792.
16. Van Beers, E.H., Büller, H.A., Grand, R.J., Einerhand, A.W., and Dekker, J. (1995). Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 197–262.
17. Дедов И.И., Шестакова М.В.. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика. Москва: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»», 2011. 808с.

## **8. Мультитаргетное действие противодиабетических средств**

*А. А. Спасов, В. А. Косолапов, П. М. Васильев*

В последнее время большое внимание при создании новых лекарственных веществ уделяется поиску соединений с полимодальным действием. Полимодальная фармакология предполагает, что более эффективные лекарства могут быть созданы путем специфической модуляции нескольких мишеней одной молекулой. Полимодальную фармакологию следует отличать от комбинированной терапии. В существующей литературе используется множество синонимов для определения таких средств, включая двойной механизм, двойной лиганд, полимодальность, панагонист, гибридные лекарства и др. Наиболее часто используются термины «мультитаргетные (мультицелевые) соединения» (multi-target compounds (MTCs)), «полифункциональные вещества» (multifunctional compounds (MFCs)). В 2004г. Мерфи [Morphy et al., 2004] использовал термин «спроектированные множественные лиганды» (designed multiple ligands (DMLs)), который является наиболее универсальным, и подразумевает соединения, которые изначально разработаны, чтобы оказывать 2 и более фармакологических эффектов.

Создание таких препаратов связано, прежде всего, с тем, что многие заболевания чрезвычайно вариабельны и гетерогенны, с вовлечением в патологический процесс различных органов и систем и наличием разнообразных мишеней воздействия, в том числе потенциальных, открываемых после расшифровки человеческого генома. К таким многофакторным заболеваниям относятся атеросклероз, болезнь Альцгеймера/Паркинсона, метаболический синдром, бронхиальная астма, рак, сахарный диабет и его осложнения и др. Такие заболевания, как правило, лечатся несколькими препаратами из разных фармакологических групп (табл. 8.1). За прошедшее время различные стратегии были разработаны для эффективного и безопасного лечения многофакторных заболеваний, включая использование комплексной терапии с использованием отдельных препаратов или фиксированных комбинаций двух и более лекарственных средств в одной лекарственной форме [Keith, 2005].

Таблица 8.1

**Некоторые мультифакторные заболевания, патофизиологические факторы и подходы к их лечению**

Мультифакторное заболевание	Патофизиологические факторы	Современные методы терапии (один препарат / сочетание)	Ссылки
Атеросклероз	Дислипидемия Хроническое системное воспаление Окислительный стресс Агрегация тромбоцитов Гиперкоагуляция	Антигиперлипидемические НПВС Антиоксиданты Антиагреганты Антикоагулянты Ингибиторы АПФ	Weber, 2011
Болезнь Альцгеймера / Паркинсона	Нейродегенерация Хроническое системное воспаление Окислительный стресс	Антихолинэстеразные МАО-В ингибиторы Антиоксиданты Хелаторы железа Антирадикальные	Van der Schyf, 2011
Метаболический синдром	Атерогенная дислипидемия Повышенное давление Повышение глюкозы в плазме Хроническое системное воспаление Увеличение МТ	Антигиперлипидемические Антигипертензивные Антидиабетические Антиоксиданты Противовоспалительные	Cirillo, 2009
Бронхиальная астма	Бронхоконстрикция Воспаление Гиперреактивность Аллергия	Бета-2-агонисты Стероиды Стабилизаторы тучных клеток Антигистаминные	Ozier, 2011
Злокачественные новообразования	Опухолевый рост Иммуномодуляция Боль	Противоопухолевые Иммуностимуляторы Опиаты, неопиоидные, местные анестетики	Targeted Cancer Therapies
Сахарный диабет 2го типа	Гипергликемия Инсулинорезистентность Атерогенная дислипидемия Окислительный стресс Эндотелиальная дисфункция Агрегация тромбоцитов Гипертензия	Противодиабетические Антигиперлипидемические Антиоксиданты Антиагреганты Антигипертензивные	Аметов, 2014

Однако использование комплекса лекарств часто связано с плохой комплаентностью пациентов и возможными лекарственными взаимодействиями, ведущими к серьезным нежелательным эффектам, а применение фиксированных комбинаций с учетом метаболической вариабельности пациентов также может приводить к комплексным фармакокинетическим и фармакодинамическим взаимодействиям.

Все это привело к сдвигу парадигмы в сторону создания мульти-таргетных лекарств, которые могут обладать целым рядом преимуществ по сравнению с комбинированными схемами терапии или фиксированными комбинациями. К ним можно отнести более предсказуемый фармакокинетический профиль, отсутствие взаимодействий, снижение риска токсических проявлений, риска развития толерантности или резистентности, достижение необходимых концентраций в тканях-мишенях, а также упрощенный режим дозирования и повышение комплаентности [Anighoro, 2014; Bansal, 2014].

## **8.1. Полифункциональные вещества в медицинской практике**

Полифункциональные вещества используются в медицине чаще, чем мы думаем. В большинстве случаев у используемых в клинической практике полифункциональных препаратов мультифакторное действие выявлено ретроспективно. Несколько высоко-эффективных препаратов, таких как НПВС (ацетилсалициловая кислота), опиоидные анальгетики, мемантин, силденафил, амиодарон, иматиниб (Гливек), гликлазид, метформин, воздействуют на несколько мишеней одновременно.

Существуют также направленно разработанные средства с мульти-таргетным действием, такие как омапатрилат – ингибитор АПФ и нейтральной эндопептидазы, нетоглитазон – агонист PPAR $\gamma$ , $\alpha$ , $\delta$ . Одним из ярких примеров мультитаргетных средств является антиаритмик III класса амиодарон, который сочетает в себе свойства блокатора K<sup>+</sup> каналов с блокированием Ca<sup>2+</sup> и Na<sup>+</sup> каналов, а также  $\beta$ - и  $\alpha$ -адрено-блокаторов, чем принципиально отличается от селективного блокатора K<sup>+</sup> каналов ибутилида и селективных блокаторов Na<sup>+</sup> каналов, что было отражено еще в 1990 г. в докладе «Сицилианский гамбит» [Сицилия, 1990].



Еще один термин, применяемый в литературе – разнородность действия веществ (compound promiscuity) [Anighoro, 2014], также может быть применим к полифункциональным средствам, однако подходит для веществ, влияющих на одну мишень. В этом случае можно выделить прямое действие на мишень, которая в свою очередь вызывает множественность различных эффектов. К таким мишеням можно отнести, например, натрий-водородный обменник (NHE-1), цикло-аденозин-монофосфат-протеинкиназы (АМФК) и др. Также возможно не прямое влияние на мишень, например активация ГАМК-А рецептора ГАМК, вызванная бензодиазепиновыми транквилизаторами, активирующими соответствующий сайт ГАМК-А рецепторного комплекса.

В литературе для описания полифункциональности лекарств также используется термин «плейотропное действие» [Моргунов, 2014]. Изначально плейотропия (плейотропизм) (от. греч. pléion – более многочисленный и trópos – поворот, направление) применяется для описания множественного действия гена, кодирующего развитие нескольких признаков, например генов, контролирующих синтез ферментов, участвующих в нескольких биохимических процессах. Под плейотропным действием лекарственного препарата, видимо, подразумеваются его разнонаправленные эффекты, отличные от основного.

## 8.2. Дизайн полифункциональных веществ

Современный взгляд на создание полифункциональных веществ меняется от точки зрения, что мультитаргетные средства выявляются случайно, к направленному конструированию множественных лигандов. В литературе описаны десятки сочетаний мишеней, в отношении которых конструируются лиганды и проводятся исследования их активности (табл. 8.2) [Morphy, 2004].

ACE, angiotensin-converting enzyme; AChE, acetylcholinesterase; AT, angiotensin receptor; АТIII, antithrombin III; COX, cyclooxygenase; E, E-opioid receptor; D, dopamine receptor; DAT, dopamine transporter; ECE, endothelin-converting enzyme; ETA, endothelin-A receptor; H, histamine receptor; 5-HT, 5-hydroxytryptamine receptor; 5-LOX, 5-lipoxygenase; LTD4, leukotriene D4 receptor; MAO, monoamine oxidase; NEP, neutral endopeptidase; NET, nore-

pinephrine transporter; NK, neurokinin receptor; NOS, nitric oxide synthase; PAF, platelet-activating factor receptor; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SERT, serotonin transporter; TxR, thromboxane-A2 receptor; TxS, thromboxane-A2 synthase

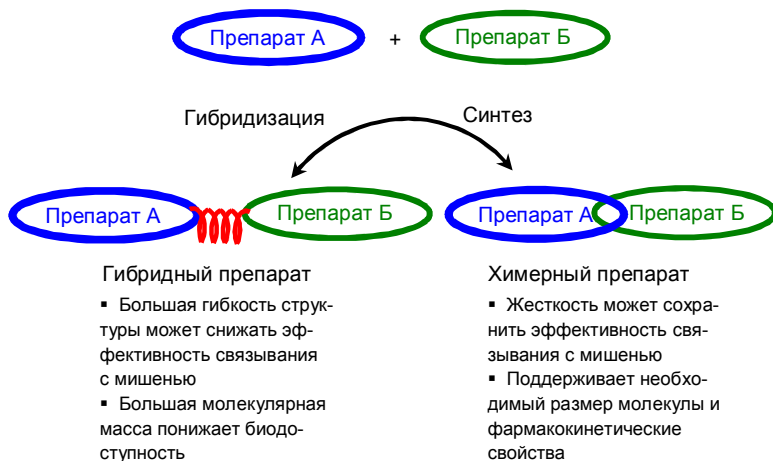
Таблица 8.2

**Мишени для дизайна мультитаргетных лекарств [Morphy, 2004]**

№	Первичная мишень	Другие мишени
	ACE	NEP; TxS; ECE-NEP
	AChE	MAO
	AT1	AT2 and ETA
	COX-2	5-LOX
	D2	D4; 5-HT3; 5-HT2A; and 5-HT1A
	H1	H3; NK1; and PAF
	H2	Gastrin
	5-HT3	5-HT1A and nAChR
	$\mu$	$\delta$ - $\kappa$ ; $\delta$ ; and $\kappa$
	PPAR $\alpha$	PPAR $\gamma$ and PPAR $\gamma$ -PPAR $\delta$
	SERT	NK1; 5-HT1D/B; 5-HT1A; $\alpha$ 2; AChE;
	DAT	NET; and NET-DAT
	IIa	VIIa
	TxR	LTD4
	TxS	PAF; TxR; aromatase; and 5-LOX
	NOS	Antioxidant

При создании полифункциональных веществ отдельная молекула может влиять на различные мишени либо обладать способностью проявлять два и более фармакологических эффектов при лечении многофакторных заболеваний.

При конструировании полифункциональных веществ существует две основных стратегии: создание гибридных или химерных средств из двух и более фармакофоров/лекарств со специфической активностью (рис. 8.1) [Bansal, 2014]. Гибридные лекарства создаются с помощью гибридизации, когда две и более молекул с различной активностью соединяются стабильной связью, тогда как химерные средства разрабатываются синтезом фармакофоров двух различных веществ в одну молекулу с использованием подходящего ядра.



*Рис. 8.1. Стратегии дизайна полифункциональных веществ*

### 8.3. Сетевой подход к созданию мультитаргетных средств

Наиболее распространенным способом представления системы взаимодействующих биомолекулярных объектов являются различные типы биологических сетей (Analysis of Biological Networks). В поиске *in silico* новых лекарственных веществ для лечения мультифакторных заболеваний сетевой подход является весьма привлекательным, поскольку позволяет определять для химических структур так называемые «профили действия» (с учетом взаимного влияния биомишеней) и выбирать наиболее оптимальные соединения.

Например, в работе [Ou et al., 2015] описывается поиск *in silico* веществ с антиатеросклеротическим действием с использованием сигнальной сети АМФ-киназы.

В исследовании [Guneu et al., 2016] для 78 заболеваний выполнено построение интерактомной сети «биомишеней, ближайших к генам болезни» (141150 взаимодействий между 13329 белками) и проведен детальный анализ мультитаргетного действия 238 известных лекарственных препаратов. Выработаны рекомендации по их новому клиническому использованию (репозиционированию) для лечения ряда заболеваний, в том числе: сердечно-сосудистых, Паркинсона, Альцгеймера, астмы, рака и диабета типа 2.

Определены также «ложные» препараты, основное терапевтическое назначение которых плохо соответствует интерактомной сети.

Сиавелис и соавт. [Siavelis et al., 2015] с использованием web-приложения NetworkAnalyst построили интерактомную сеть первого порядка для 154 генов, имеющих значение при болезни Альцгеймера (857 взаимодействий между 357 белками). Найдены ключевые для сети биомишени (top nodes) – JUN, YAP1, EGFR, существенные при поиске средств для лечения болезни Альцгеймера. Среди известных лекарственных средств найдено 27 препаратов, отличающихся по совокупности механизмов действия от используемых в клинической практике «стандартных» ингибиторов ацетилхолинэстеразы и NMDA-рецепторов – это, в частности, противодиабетический препарат троглитазон, другие препараты с иным основным видом фармакологического действия.

В случае астмы [Randhawa, 2012] для 293 генов был сформирован специальный интерактом (API, Asthma Protein Interactome) и построена интерактомная сеть общим объемом 2212 белков и 12941 взаимодействий. По результатам анализа этой сети найдены 11 ключевых биомишеней, потенциально существенных для лечения астмы. Для самой валидной биомишени SRC тирозин киназы выполнен виртуальный скрининг ингибиторов по базе данных ZINC (более 35 млн. структур) с использованием фармакофорного метода и последующего многоэтапного докинга. Найдено 55 соединений с высокой расчетной аффинностью.

Наибольшее число работ по сетевой фармакологии посвящено поиску мультитаргетных противоопухолевых веществ. Это связано с несистемным характером и разнообразием онкологических заболеваний и, как следствие, с огромным числом механизмов их реализации. Системная биология рака включает только основных семь типов сетей: генные, сигнальные, транскрипционные, трансляционные, регуляторные, метаболические, биохимические. С учетом различных алгоритмов их построения, число простых «несмешанных» типов сетей получается еще больше. При рассмотрении смешанных сетей число их типов существенно возрастает. Например, в обзоре [Edelman, 2010] приводится краткое описание примерно 50 различных типов биологических онкосетей.

В отличие от рака и болезней Паркинсона и Альцгеймера, исследований по сетевому моделированию диабета типа 2 существенно меньше. Как и болезнь Альцгеймера, диабет типа 2 характерен, прежде всего, для

пожилых людей. На этом основании Ахмед и соавт. [Ahmed et al., 2014] выявили гены и их регуляторные пути, общие для двух указанных заболеваний. Построена интерактивная сеть, которая может быть использована для поиска новых бифункциональных лекарственных веществ – как для лечения диабета типа 2, так и для лечения болезни Альцгеймера. В работе [Huiying, 2014] описано успешное использование сетевого подхода для определения наиболее значимых активных компонентов средства традиционной китайской медицины «Ge-Gen-Qin-Lian» и изучения механизмов их действия. Прогнозирование «профилей действия» изучаемых соединений выполнено на основе регрессионной сетевой модели, найдено наиболее активное вещество с мультитаргетным антидиабетическим действием.

#### **8.4. Мультитаргетное действие противодиабетических средств**

К мультифакторным заболеваниям относится сахарный диабет 2-го типа (СД2). Многие известные препараты для лечения сахарного диабета обладают полифункциональным действием. Все эффекты противодиабетических средств можно разделить на центральные (секретогенные), периферические, влияние на развитие осложнений и плейотропные (рис. 8.2).

Препарат из группы производных сульфанилмочевины Гликлазид является одним из средств базовой терапии СД 2. Эффекты гликлазида связаны, прежде всего, с его центральным действием, проявляющимся в усиление секреции и высвобождения инсулина из  $\beta$ -клеток, в механизме которого лежит селективное ингибирование АТФ-зависимых калиевых каналов  $\beta$ -клеток поджелудочной железы (ПЖЖ) (комплекс SUR1 (рецептор 1 к сульфанилмочевине) / KIR6.2 (ректифицирующая субъединица)) [Балаболкин, 2005]. К его внепанкреатическим эффектам относится активирование транслокации и дефосфорилирования ГЛЮТ-4, ведущая к стимуляции липогенеза и гликогенеза, угнетению липолиза и увеличению утилизации глюкозы в печени и мышцах путем снижения глюконеогенеза, а также улучшение инсулин-рецепторного взаимодействия за счет ингибирования транскламиназы и снижения кластеризации рецепторов, оккупированных инсулином, возрастание концентрации инсулиновых мембранных рецепторов и влияния на пострецепторные механизмы.

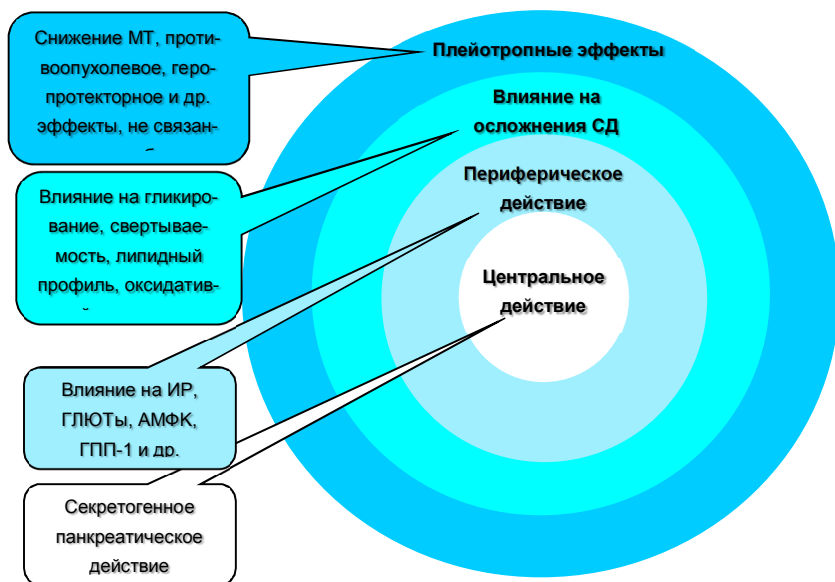


Рис. 8.2. Эффекты противодиабетических средств:

*МТ – масса тела, ИР – инсулиновый рецептор, ГЛЮТ – транспортеры глюкозы, АМФК – аденозинмоно-фосфаткиназа, ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид*

Влияние гликлазида на микрососудистые осложнения СД связано с его действием на систему гемостаза и микроциркуляции, а именно антиагрегантной активностью на фоне снижения уровня тромбоксана В2 и соотношения тромбоксан/простаглицлин, фибринолитическими свойствами, а именно повышением активности тканевого активатора плазминогена-1, и увеличением антикоагулянтной активности. Кроме того, гликлазид влияет на липидный профиль, снижая ЛПНП и повышая ЛПВП, активирует антиоксидантную систему (АОС), повышая активность глутатионпероксидазы (ГП) и проявляя антирадикальные свойства [Спасов, 2011], уменьшает уровень конечных продуктов гликирования белков (КПГ) [Аметов, 2014; Балаболкин, 2005].

Метформин, производное бигуанидов, в настоящее время является «золотым стандартом» в лечении СД2 и его осложнений [Аметов, 2014; Балаболкин, 2005]. Периферическое действие метформина проявляется в ингибировании скорости образования глюкозы печенью и увеличении

утилизации глюкозы в мышцах, что связывают с его активирующим действием на АМФК, фосфотирозинфосфатазу и ГЛЮТ-1, 3 и 4, повышении превращения глюкозы в лактат в желудочно-кишечном тракте, нормализующим влиянии на инсулинорезистентность, повышении транспорта глюкозы в эндотелии, гладких мышцах сосудов и в миокарде, увеличении уровня ГПП-1 и экспрессии гена рецептора к инкретинам. Метформин препятствует развитию микро- и макрососудистых осложнений СД, действуя на систему гемостаза и микроциркуляции аналогично гликлазиду, влияя на уровень атерогенных липопротеинов, снижая уровень ХС, ЛПНП, ЛПОНП и повышая ЛПВП. Метформин активирует АОС и снижает внутриклеточную продукцию активных форм кислорода (АФК) в аортальных эндотелиоцитах путем ингибирования NAD(P)H-оксидазы и комплекса I митохондриальной дыхательной цепи и снижает и уровень гликированного гемоглобина HbA1c. Описаны плеiotропные эффекты метформина [Моргунов, 2014], такие как снижение массы тела (МТ), коррекция синдрома липодистрофии у пациентов с ВИЧ, улучшение фертильности женщин с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), торможение процессов старения, воздействие на злокачественные опухоли и гематологические заболевания.

Начиная с 2001 г., когда появилась работа Жоу и соавт. [Zhou et al., 2001], все более популярной становится точка зрения о том, что метформин относится к числу активаторов цикло-аденозин-монофосфат-протеинкиназы (АМФК), играющей основную роль в энергетическом балансе клетки и регулирующей функции различных мишеней [АМПК: Master Metabolic Regulator, 2016], что лежит в основе множественности его эффектов, в частности в реализации нормализующего влияния метформина на инсулинорезистентность [Shackelford, Shaw, 2009], увеличения эндотелийзависимой вазодилатации и антиатерогенного действия, воздействия на злокачественные опухоли и гематологические заболевания.

Другим примером противодиабетических препаратов с плеiotропным действием могут служить ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ДПП4), у которых выявлены противовоспалительное, антиагрегантное, кардиопротекторное, гепатопротекторное, иммунотропное, транквилизирующее эффекты [Аметов, 2014; Zhao, 2014].

Новый пероральный противодиабетический препарат диабенол (лиглидол) [Спасов и др., 2008] также оказывает целый ряд эффектов,

включая антитромбогенное действие, связанное с его влиянием на агрегацию тромбоцитов [Кучерявенко и др., 2015], геморереологические [Спасов и др., 2009], антиоксидантные [Спасов и др., 2011], геропротекторные и противоопухолевые свойства [Popovich et al., 2005].

### Дизайн полифункциональных противодиабетических средств

В настоящее время исследуется несколько новых направлений и мишеней в лечении СД2, таких как внедрение инсулина деглудека и ингаляционных форм инсулинов, ингибирование натрий-зависимого транспортера глюкозы (канаглифлозин, дапаглифлозин, эмпаглифлозин), создание ГПП-1 миметиков длительного действия, ингибиторов гликогенсинтазы киназы  $3\beta$ , ингибиторов протеин тирозин фосфатазы 1B [Abuhammad, 2016; El-Kaissi, 2011].

Наряду с этим проводятся активные поиски мультитаргетных средств сочетанных лигандов рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами (PPAR), активаторов глюкокиназы (GK) и PPAR $\gamma$ , ингибиторов  $\alpha$ -глюкозидазы и ДПП4, а также сочетанных ингибиторов  $\alpha$ -глюкозидазы или альдозоредуктазы с антиоксидантными и антигликирующими свойствами (табл. 8.3).

Таблица 8.3

### Мишени для дизайна противодиабетических мульти-таргетных лекарств

№	Первичная мишень	Другие мишени	Ссылки
	PPAR $\gamma$	PPAR $\alpha$ and PPAR $\delta$	Ma, 2012
	GK	PPAR $\gamma$	Lu, 2014
	DPP-IV	$\alpha$ -glucosidase	Lin, 2015
	$\alpha$ -glucosidase	Гликирование и АО	Jeon, 2013
	ALR2	АО	Stefek, 2011
	DPP-IV	Гликирование	Yamagishi, 2015

*ALR2 альдозоредуктаза; АО антиоксидант; DPP динептидилнептидаза; GK глюкокиназа; PPAR рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами*

Ядерные рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (PPAR), представлены тремя изоформами, PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  и PPAR $\delta$ .



PPAR $\gamma$  экспрессируется в жировой ткани, относится к важным регуляторам уровня глюкозы и липидного метаболизма и является мишенью действия противодиабетических средств из класса тиазолидиндионов росиглитазона, пиоглитазона и др. [Dumasia, 2005]. PPAR $\alpha$  регулируют транспорт и деградацию свободных жирных кислот. Специфическая активация PPAR $\alpha$  показана у фенофибрата [Isserman, 1993]. Были разработаны сочетанные агонисты PPAR $\alpha$ , $\gamma$  глитазары мураглитазар, тезаглитазар, а также панагонист PPAR $\gamma$ , $\alpha$ , $\delta$  нетоглитазон [Chang, 2007]. Продолжаются поиски сочетанных активаторов PPAR с использованием современных подходов *in silico* молекулярного докинга методом «Core Hopping», молекулярной динамики и прогноза ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) [Ma, 2012].

Известно, что глюкокиназа катализирует фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата на первом этапе гликолиза, что играет существенную роль в нормализации уровня глюкозы, в клетках ПЖЖ GK катализирует глюкозо-индуцированную секрецию инсулина, а в печени необходима для метаболизма глюкозы и синтеза гликогена. В работе Лю и соавт. [Lu et al., 2014] выполнен синтез и изучена активность ряда сочетанных активаторов GK и PPAR $\gamma$  (рис. 8.3). Показано, что вещества активировали GK в концентрации 10 мкМ сравнимо с веществом GKA22 (AstraZeneca) и транскрипцию PPAR $\gamma$  на уровне росиглитазона.

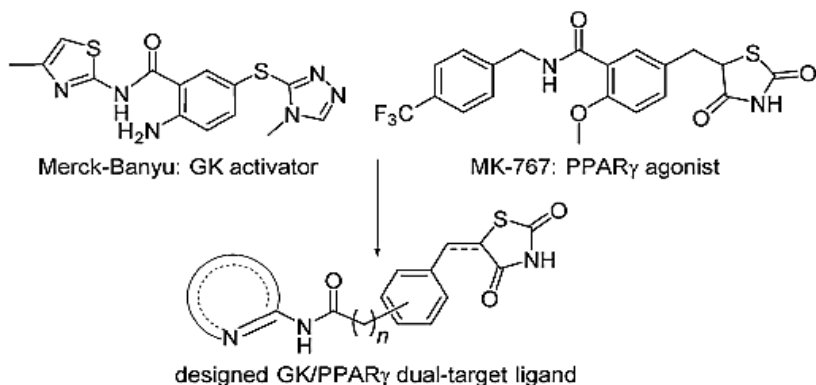


Рис. 8.3. Дизайн GK/PPAR $\gamma$  сочетанного лиганда на основе активатора GK и агониста PPAR $\gamma$

Фермент  $\alpha$ -глюкозидаза осуществляет гидролиз терминальной альфа(1-4)гликозидной связи крахмала с высвобождением молекулы глюкозы. Ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы, такие как акарбоза, замедляют всасывание глюкозы в желудке и переваривание крахмала и сахарозы, снижая постпрандиальный уровень глюкозы в крови [Kalra, 2014].

Дипептидилпептидаза-4 – фермент, инактивирующий инкретины – глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1) и глюкозозависимый инсулиноподобный пептид (ГИП) – гормоны желудочно-кишечного тракта, вырабатываемые в ответ на прием пищи и стимулирующие секрецию инсулина. Ингибиторы ДПП4, такие как вилдаглиптин, ситаглиптин, саксаглиптин, обеспечивают поддержание нормального уровня инкретинов крови [Спасов, 2015].

В работе Лин и соавт. [Lin et al., 2015] изучалось влияние экстрактов и очищенных субстанций, полученных из листьев винограда *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana*. Было показано, что вещества ингибировали  $\alpha$ -глюкозидазу *in vitro* в сравнении с акарбозой и ингибирование ДПП4 *in vitro* в сравнении с ситаглиптином. Также активность проверялась на модели ожирения у крыс, вызванного высокожировой диетой в течение 35 дней, введение веществ с 36 по 68 сутки, и тест глюкозотолерантности.

Недавно появились работы о взаимосвязи ДПП4-инкретиновой системы и повышения образования конечных продуктов гликирования и КПП-рецепторов при развитии диабетических сосудистых осложнений. В частности, в работе [Yamagishi et al., 2015] было описано, что КПП могут нарушать эффекты инкретинов, индуцируя активность ДПП4, усиливая дальнейшее образование и накопления КПП. Это объясняет сравнительно низкую активность вилдаглиптина у пациентов с длительным анамнезом СД.

В работе Жеон и соавт. [Jeon, 2013] изучалось влияние полимеров катехина на ингибирование  $\alpha$ -глюкозидазы *in vitro*, антигликирующая активность *in vitro* методами BSA-glucose и BSA-MGO в сравнении с аминокванидином, СОД-миметическая активность, в тесте нагрузки мальтозой 1 г/кг у мышей C57Bl/6 с определением уровня глюкозы.

Альдозо-редуктаза – первый фермент полиольного пути, один из этиологических факторов диабетических осложнений [Srivastava, 2005]. Другой причиной диабетических осложнений является активация окислительных процессов, вызывающая повреждение клеточных мембран и усиление процессов гликозилирования. В работе [Stefek, 2011] предпри-

нята попытка создания веществ с сочетанной альдозоредуктаза ингибирующей и антиоксидантной активностью (рис. 8.4).

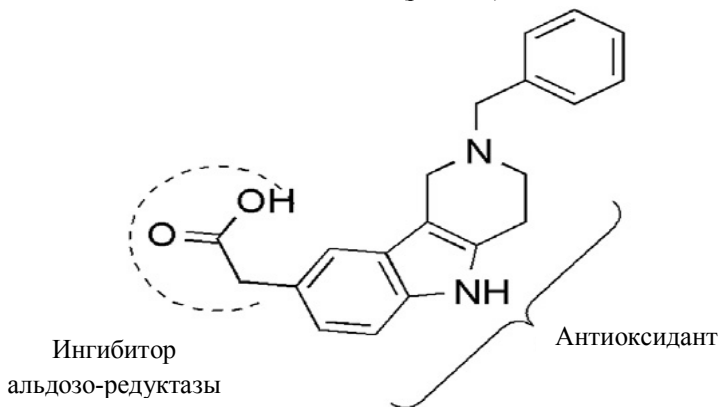


Рис. 8.4. Дизайн сочетанного ингибитора альдозоредуктазы и антиоксидантного средства

Проведено изучение влияния веществ на гемолиз эритроцитов, вызванный ААРН и t-BuOOH (ГПТБ) в сравнении с антиоксидантным эталоном тролоксом.

Кроме того, у крыс с экспериментальным СД, вызванным трехкратным внутривнутрибрюшинным введением 30 мг/кг стрептозотоцина в течение 3х последовательных дней, получавших новое вещество, в эритроцитах измерялся уровень сорбитола, как показатель активности внутриклеточной альдозоредуктазы. Было показано, что новое вещество оказывает сочетанное антиоксидантное и альдозо-редуктаза ингибирующее действие.

Таким образом, полифармакология является новой парадигмой в разработке потенциальных лекарств. Апробированные в медицинской практике средства, у которых выявлен полифармакологический профиль, были выявлены ретроспективно, что делает оправданной концепцию создания мультитаргетных средств.

В полной степени это относится к противодиабетическим средствам, учитывая мультифакторность самого заболевания и выявление целого ряда перспективных мишеней для лечения СД и его осложнений.

## Литература

1. Аметов А.С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения: учеб. пос. - 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 1032с.
2. Аметов А.С., Камынина Л.Л. Негликемические эффекты ингибиторов дипептидилпептидазы-4 // Тер. Архив. 2013. Т.1. С.98-102.
3. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений: учеб. пос. М.: ОАО «Издательство Медицина», 2005. – 512с.
4. Кучерявенко А.Ф., Смирнов А.В., Спасов А.А. Антитромботическая активность нового гипогликемического соединения лимиглидола на модели клеточного тромбоза у мышей // Бюлл. Эксп. Биол. мед. 2015. №1. С.49-52.
5. Моргунов Л.Ю. Плейотропные эффекты метформина // Исследования и практика в медицине. 2014. Т.1, №1. С.62-68.
6. Спасов А.А., Косолапов В.А., Чепляева Н.И. Сравнительная характеристика антиоксидантных свойств гипогликемических препаратов диабенола и гликлазида // Эксп. и клин. фарм. 2011. Т74, №11. С.14-16.
7. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Салазникова О.А. Влияние гипогликемических средств на гемореологические параметры кров // Эксп. Клин. Фарм. 2009. Т.72, №5. С31-34.
8. Спасов А.А., Петров В.И., Анисимова В.А. и др. Новое отечественное гипогликемическое средство с гемореологическими свойствами диабенол // Материалы 4го Всероссийского диабетологического конгресса. Москва. – 2008. – С.336.
9. Спасов А.А., Чепляева Н.И. Потенциал фармакологической модуляции уровня и активности инкретинов при сахарном диабете типа 2 // Биомедицинская химия. 2015. Т.61, №4. С.488-496.8
10. Abuhammad A., Taha M.O. QSAR studies in the discovery of novel type-II diabetic therapies. // Expert Opin Drug Discov. 2016. Vol.11(2). P.197-214. doi: 10.1517/17460441.2016.1118046.
11. Ahmed F., Ansari J.A., Ansari Z.E. et al. A molecular bridge: connecting type 2 diabetes and Alzheimer's disease // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. – 2014. – V. 13. – № 2. – p. 312-321.
12. AMPK: Master Metabolic Regulator. <http://themedicalbiochemistrypage.org/ampk.php> (дата обращения 13.02.16)
13. Analysis of Biological Networks / Eds. B.H.Junker, F. Schreiber F. – Hoboken (New Jersey, USA): Wiley-Interscience, 2008. 368p.
14. Anighoro A., Bajorath J., Rastelli G. Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery // J. Med. Chem. 2014. Vol.57(19). P.7874-7887.
15. Bansal Y., Silakari O. Multifunctional compounds: smart molecules for multifactorial diseases // Europ. J. Med. Chem. 2014. Vol.76. P.31-42.

16. Chang F., Jaber L.A., Berlie H.D., O'Connell M.B. Evolution of peroxisome proliferator-activated receptor agonists // *Ann. Pharmacother.* 2007. Vol.41(6). P.973-983.
17. Cirillo P., Sautin Y.Y., Kanellis J. et al. Systemic inflammation, metabolic syndrome and progressive renal disease // *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009. Vol. 24. –P.1384-1387.
18. Dumasia R., Eagle K.A., Kline-Rogers E. et al. Role of PPAR- gamma agonist thiazolidinediones in treatment of pre-diabetic and diabetic individuals: a cardiovascular perspective. // *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 2005. Vol.5(5). P.377-386.
19. Edelman L.B., Eddy J.A., Price N.D. In silico models of cancer // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2010. Vol.2. № 4. P.438-459.
20. El-Kaissi S., Sherbeeni S. Pharmacological Management of Type 2 Diabetes Mellitus: An Update // *Current Diabetes Reviews.* 2011. Vol.7. P.392-405.
21. Guney E., Menche J., Vidal M. et al. Network-based in silico drug efficacy screening // *Nat. Commun.* 2016. №7. 10331. doi: 10.1038/ncomms10331.
22. Huiying Li et al. A Network Pharmacology Approach to Determine Active Compounds and Action Mechanisms of Ge-Gen-Qin-Lian Decoction for Treatment of Type 2 Diabetes // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2014. 12pp. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/495840> (дата обращения 17.10.2015).
23. Issemann I., Prince R.A., Tugwood J.D., Green S. The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs // *J. Mol. Endocrinol.* 1993. Vol.11. P.37-47.
24. Jeon S.Y., Oh S., Kim E., Imm J.Y.  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition and Anti-glycation Activity of Laccase-catalyzed Catechin Polymers // *J. Agric. Food Chem.* 2013. Vol.61, 19. P.4577-4584.
25. Kalra S.J. Alpha glucosidase inhibitors // *J. Pak. Med. Assoc.* 2014. Vol.64(4). P.474-476.
26. Keith C.T., Borisy A.A., Stockwell B.R. Multicomponent therapeutics for networked systems // *Nature Reviews Drug Discovery.* – 2005. – Vol.4. – P.71-78.
27. Lin Y.S. Anti- $\alpha$ -glucosidase and Anti-dipeptidyl Peptidase-IV Activities of Extracts and Purified Compounds from *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* // *J. Agric. Food Chem.* 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02069.
28. Lu J., Lei L., Huan Y. et al. Design, Synthesis, and Activity Evaluation of GK/PPAR $\gamma$  Dual-Target-Directed Ligands as Hypoglycemic Agents // *Chem. Med. Chem.* 2014. Vol.9. P.922-927.
29. Ma Y., Wang S.Q., Xu W.R. et al. Design Novel Dual Agonists for Treating Type-2 Diabetes by Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptors with Core Hopping Approach // *PLoS ONE.* 2012. Vol.7, Issue 6. e38546. doi:10.1371.

30. Morphy R., Kay C., Rancovic Z. From magic bullets to designed multiple ligands // *Drug Discovery Today*. 2004. Vol.9. P.641-651.
31. Ou T., Hou X., Guan S. et al. Targeting AMPK signalling pathway with natural medicines for atherosclerosis therapy: an integration of in silico screening and in vitro assay // *Nat. Prod. Res.* 2015. Jul 13. P.1-8.
32. Ozier A., Bara I., Girodet P.O. et al. Pathophysiology of asthma // *Revue du Praticien*. 2011. Vol.61. P.339-345.
33. Popovich I.G., Zabezhinski M.A., Egormin P.A. et al. Insulin in aging and cancer: antidiabetic drug diabenol as geroprotector and anticarcinogen // *Int. J. biochem. Cell boil.* 2005. V.37. P.1117-1129.
34. Randhawa V., Bagler G. Identification of SRC as a potent drug target for asthma, using an integrative approach of protein interactome analysis and in silico drug discovery // *OMICS*. 2012. Vol.16, №10. P.513-526.
35. Shackelford D.B., Shaw R.J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression // *Nat. Rev. Cancer*. 2009. Vol. 9, № 8. P. 563-575.
36. Siavelis J.C., Bourdakou M.M., Athanasiadis E.I. et al. Bioinformatics methods in drug repurposing for Alzheimer's disease // *Brief. Bioinform.* 2015. Jul 21. pii: bbv048.
37. Srivastava S.K., Ramana K.V., Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options // *Endocr. Rev.* 2005. Vol.26(3). P.380-392.
38. Stefek M. Tsantili-Kakoulidou A., Milackova I. et al. (2-Benzyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indol-8-yl)-acetic acid: An aldose reductase inhibitor and antioxidant of zwitterionic nature *Bioorganic & Medicinal chemistry*. 2011. Vol.19. P.7181-7185. doi:10.1016/j.bmc.2011.09.053.
39. Targeted Cancer Therapies. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted>
40. Van der Schyf C.J., Geldenhuys W.J. Multimodal drugs and their future for Alzheimer's and Parkinson's disease // *International Review of Neurobiology*. 2011. Vol.100. P.107-125.
41. Weber C., Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options // *Natural Medicines*. 2011. Vol.17. P.1410-1422.
42. Yamagishi S., Fukami K., Matsui T. Crosstalk between advanced glycation end products (AGEs)-receptor RAGE axis and dipeptidyl peptidase-4-incretin system in diabetic vascular complications // *Cardiovasc. Diabetol.* 2015. Jan 13. P.14:22.
43. Zhao Y., Yang L., Zhou Z. ДПП4 inhibitors: Multi-target drugs, not only anti-diabetes drugs // *J. Diabetes*. 2014. Vol.6(1). P.21-29.
44. Zhou G.I., Myers R., Li Y., et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol.108, № 8. – P.1167-1174.

## 9. Консенсусный подход к поиску *in silico* противодиабетических соединений

*П. М. Васильев, А. А. Спасов,  
А. Н. Кочетков, В. В. Ворфоломеева, Л. Р. Яналиева*

В настоящее время применение методов *in silico* для поиска новых лекарственных веществ является распространенной практикой [Drug Design, 2010; Recent Advances in QSAR, 2010]. При этом интенсивно развиваются консенсусные подходы к прогнозу [Izenman, 2008], основанные на обобщении результатов, полученных с помощью нескольких QSAR-зависимостей. При консенсусном прогнозе ошибки различных методов в значительной степени компенсируют друг друга, что существенно увеличивает эффективность прогнозирования. В частности, консенсус QSAR-моделей успешно использован в виртуальном скрининге методом докинга лигандов аминергических рецепторов [Kelemen, 2016], в направленном поиске новых антималярийных веществ методами инженерии знаний [Viira, 2016], при прогнозе токсических свойств соединений с помощью шести различных компьютерных систем [Marzo, 2016], в расчете показателей ADME лекарственных веществ методами машинного обучения [Тао, 2015]. В настоящем исследовании использовалась информационная технология (ИТ) «Микрокосм», в основе которой лежит комплексная методология прогноза фармакологической активности химических соединений с применением многоуровневого консенсуса [Vassiliev, 2014].

Компьютерные методы широко используются при поиске соединений, обладающих противодиабетической активностью [Murcia-Soler, 2001; Al-Masri, 2008; Saqib, 2009; Bhatt, 2011; Taha, 2011; Agrawal, 2012].

В данной работе был выполнен виртуальный скрининг почти 5 тыс. соединений различной химической структуры на следующие виды активности:

- ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ДПП4);
- агонисты рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом, подтип гамма (PPAR- $\gamma$ );
- ингибиторы гликогенфосфорилазы (ГФ);
- ингибиторы альфа-глюкозидазы (АГ).

Оценка перспективности 4083 соединений фокусированной библиотеки на возможное наличие у них прогнозируемой активности проводилась с помощью консенсусных метрик разного вида и уровня, основанных на обобщении результатов прогноза, полученных с помощью трех различных компьютерных технологий.

### 9.1. Общая схема прогноза

Для консенсусного виртуального скрининга были использованы следующие компьютерные системы: ИТ «Микрокосм» [Васильев, 2011; Vassiliev, 2014], PASS [Филимонов, Поройков, 2006а, 2006б], AutoDock Vina [Trott, 2010].

Для каждого вида активности были определены индивидуальные схемы прогноза и последующего расчета консенсуса прогнозных оценок наличия активности.

1. Ингибиторы ДПП4 – четыре прогнозных оценки, пять видов консенсуса.

1.1. ИТ «Микрокосм» – расчет структурного сходства к референсным препаратам и веществам, ингибиторам ДПП4.

1.2. PASS – расчет наличия ингибирующей активности к ДПП4.

1.3. PASS – расчет наличия ингибирующей активности ко всем типам DPP.

1.4. AutoDock Vina – расчет энергии докинга в ДПП4.

1.5. Консенсус прогнозных оценок.

1.5.1. FC3 – полный консенсус третьего уровня; все четыре прогнозных оценки положительные.

1.5.2. РКС2 – частичный ключевой консенсус второго уровня; три положительных оценки (кроме оценки в PASS ко всем типам DPP).

1.5.3. РКС1 – частичный ключевой консенсус первого уровня; две положительных оценки, из которых одна обязательно по докингу (оценка в PASS ко всем типам DPP в этом случае не учитывается).

1.5.4. РС1 – частичный простой консенсус первого уровня; две положительных оценки: в ИТ «Микрокосм» по сходству к эталонам и в PASS по отношению к ДПП4.



- 1.5.5. SE – одна положительная оценка (оценка в PASS ко всем типам DPP в этом случае не учитывается).
2. Агонисты PPAR-γ – четыре прогнозных оценки, пять видов консенсуса.
  - 2.1. ИТ «Микрокосм» – расчет структурного сходства к референсным препаратам и веществам, агонистам PPAR-γ.
  - 2.2. PASS – расчет наличия агонистической активности к PPAR-γ.
  - 2.3. PASS – расчет наличия агонистической активности ко всем подтипам PPAR.
  - 2.4. AutoDock Vina – расчет энергии докинга в PPAR-γ.
  - 2.5. Консенсус прогнозных оценок.
    - 2.5.1. FC3 – полный консенсус третьего уровня; все четыре прогнозных оценки положительные.
    - 2.5.2. РКC2 – частичный ключевой консенсус второго уровня; три положительных оценки (кроме оценки в PASS ко всем типам PPAR).
    - 2.5.3. РКC1 – частичный ключевой консенсус первого уровня; две положительных оценки, из которых одна обязательно по докингу (оценка в PASS ко всем типам PPAR в этом случае не учитывается).
    - 2.5.4. PC1 – частичный простой консенсус первого уровня; две положительных оценки: в ИТ «Микрокосм» по сходству к эталонам и в PASS по отношению к PPAR-γ.
    - 2.5.5. SE – одна положительная оценка (оценка в PASS ко всем типам PPAR в этом случае не учитывается).
3. Ингибиторы ГФ – десять прогнозных оценок, четыре вида консенсуса.
  - 3.1. ИТ «Микрокосм» – расчет структурного сходства к референсным ингибиторам АМР-связывающего сайта ГФ (AMP-Site).
  - 3.2. ИТ «Микрокосм» – расчет структурного сходства к референсным ингибиторам каталитического сайта ГФ (CatSite).
  - 3.3. ИТ «Микрокосм» – расчет структурного сходства к референсным ингибиторам кофеин-связывающего сайта ГФ (CofSite).
  - 3.4. ИТ «Микрокосм» – расчет структурного сходства к референсным ингибиторам индолкарбоксамидного сайта ГФ (IndSite).
  - 3.5. PASS – расчет наличия ингибирующей активности к ГФ.
  - 3.6. PASS – расчет наличия ингибирующей активности к PYGM (мышечная форма гликогенфосфорилазы).

- 3.7. AutoDock Vina – расчет энергии докинга в AMPSite.
- 3.8. AutoDock Vina – расчет энергии докинга в CatSite.
- 3.9. AutoDock Vina – расчет энергии докинга в CofSite.
- 3.10. AutoDock Vina – расчет энергии докинга в IndSite.
- 3.11. Консенсус альтернативных прогнозных оценок.
  - 3.11.1. FC2 – полный консенсус второго уровня; три положительных альтернативных оценки:
    - ИТ «Микрокосм» (AMPSite / CatSite / CofSite / IndSite);
    - & PASS (ГФ / PYGM);
    - & AutoDock Vina (AMPSite / CatSite / CofSite / IndSite).
  - 3.11.2. PC1 – частичный ключевой консенсус первого уровня; две положительных альтернативных оценки, одна обязательно по докингу, вторая в ИТ «Микрокосм» по сходству к эталонам или в PASS:
    - AutoDock Vina (AMPSite / CatSite / CofSite / IndSite);
    - & ИТ «Микрокосм» (AMPSite / CatSite / CofSite / IndSite);
    - / PASS (ГФ / PYGM).
  - 3.11.3. PC1 – частичный простой консенсус первого уровня: две положительных альтернативных оценки, в ИТ «Микрокосм» по сходству к эталонам и в PASS:
    - ИТ «Микрокосм» (AMPSite / CatSite / CofSite / IndSite);
    - & PASS (ГФ / PYGM).
  - 3.11.4. SE – одна положительная альтернативная оценка:
    - ИТ «Микрокосм» (AMPSite / CatSite / CofSite / IndSite);
    - / PASS (ГФ / PYGM);
    - / AutoDock Vina (AMPSite / CatSite / CofSite / IndSite).
4. Ингибиторы АГ – пять прогнозных оценок, четыре вида консенсуса.
  - 4.1. ИТ «Микрокосм» – расчет структурного сходства к референсным ингибиторам АГ.
  - 4.2. PASS – расчет наличия ингибирующей активности в отношении альфа-глюкозидазного (мальтазного) домена АГ (aGlu).
  - 4.3. PASS – расчет наличия ингибирующей активности в отношении глюкоамилазного домена АГ (GIaM).
  - 4.4. AutoDock Vina – расчет энергии докинга в сайт aGlu.
  - 4.5. AutoDock Vina – расчет энергии докинга в сайт GIaM.
  - 4.6. Консенсус альтернативных прогнозных оценок.

- 4.6.1. FC2 – полный консенсус второго уровня; три положительных альтернативных оценки:
  - ИТ «Микрокосм»;
  - & PASS (aGlu / GIAm);
  - & AutoDock Vina (aGlu / GIAm).
- 4.6.2. PKC1 – частичный ключевой консенсус первого уровня; две положительные альтернативных оценки, одна обязательно по докингу, вторая в ИТ «Микрокосм» по сходству к эталонам или в PASS:
  - AutoDock Vina (aGlu / GIAm);
  - & ИТ «Микрокосм»;
  - / PASS (aGlu / GIAm).
- 4.6.3. PC1 – частичный простой консенсус первого уровня: две положительные альтернативных оценки, в PASS и в ИТ «Микрокосм» по сходству к эталонам:
  - & ИТ «Микрокосм»;
  - PASS (aGlu / GIAm).
- 4.6.4. SE – одна положительная альтернативная оценка:
  - ИТ «Микрокосм»;
  - / PASS (aGlu / GIAm);
  - / AutoDock Vina (aGlu / GIAm).

Для всех четырех активностей ключевой вид консенсуса предусматривает обязательное наличие положительной оценки по докингу. Уровень консенсуса равен числу совпадающих оценок (простых или альтернативных) минус единица.

По каждому виду активности прогноз выполнялся в следующей последовательности.

1. Поиск в Интернет и научной литературе данных по структуре и активности известных референсных препаратов и веществ.
2. Создание базы данных по структуре и активности известных референсных препаратов и веществ.
3. Расчет в ИТ «Микрокосм» наборов данных для оценки структурного сходства прогнозируемых веществ к референсным соединениям.
4. Поиск в Интернет экспериментальных 3D-моделей биомишеней.
5. Построение и оптимизация 3D-моделей известных референсных препаратов и веществ.

6. Валидация 3D-моделей биомисней, выбор наиболее валидных 3D-моделей.
7. Прогноз в ИТ «Микрокосм» по сходству с эталонами наличия активностей для новых соединений.
8. Прогноз в системе PASS наличия активностей для новых соединений.
9. Построение и оптимизация 3D-моделей новых соединений.
10. Докинг 3D-моделей новых соединений в сайты связывания соответствующих биомисней, расчет энергий взаимодействия.
11. Обобщение результатов прогноза, полученных с помощью трех компьютерных систем.

Общая технологическая схема прогноза приведена на рис. 9.1.

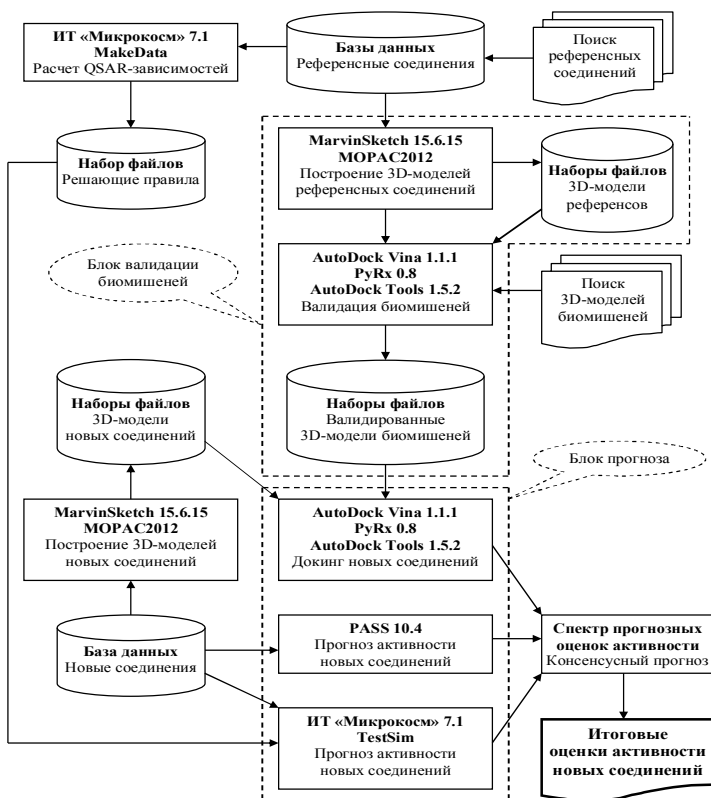


Рис. 9.1. Технологическая схема прогноза активности соединений

## 9.2. Базы данных по структуре известных референсных препаратов и веществ

Для расчета зависимостей при прогнозе по сходству в ИТ «Микрокосм» необходима обучающая выборка – база данных, содержащая информацию о химической структуре известных лекарственных препаратов и веществ (эталонов), которые были исследованы мировым научным сообществом в различных экспериментальных и клинических тестах на наличие соответствующей активности.

Информация о химической структуре известных ингибиторов ДПП4, была получена из информационной системы Thomson Reuters Integrity [Integrity, 2012].

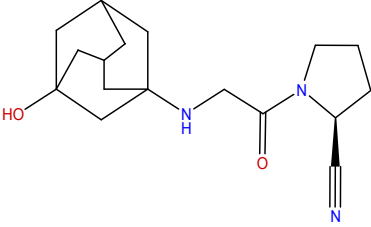
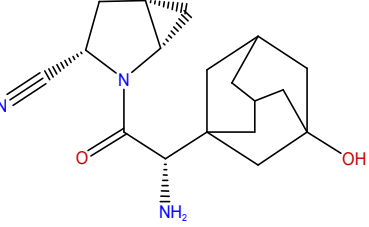
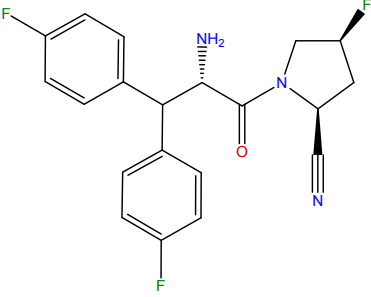
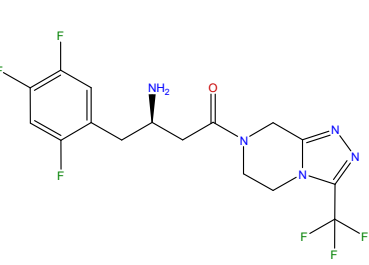
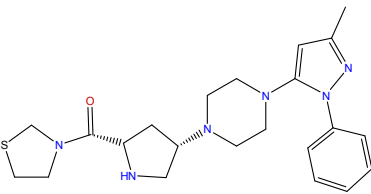
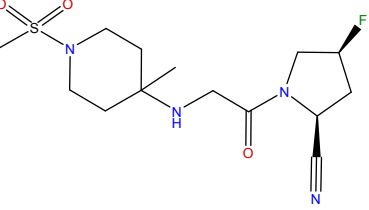
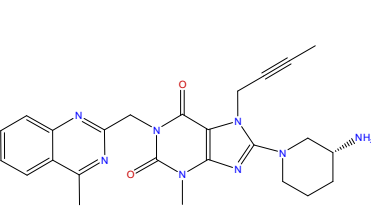
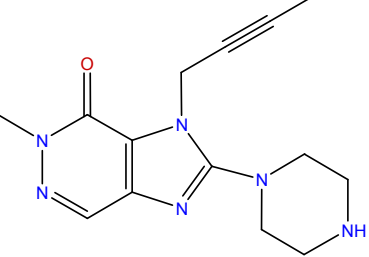
Были выбраны соединения, прошедшие как минимум клинические испытания, для которых были доступны структурные формулы, достоверно установлена ДПП4 ингибирующая активность как основной механизм противодиабетического действия, структурно как можно более разнообразные. Всего было отобрано 19 референсных ингибиторов ДПП4, формулы которых приведены в табл. 9.1.

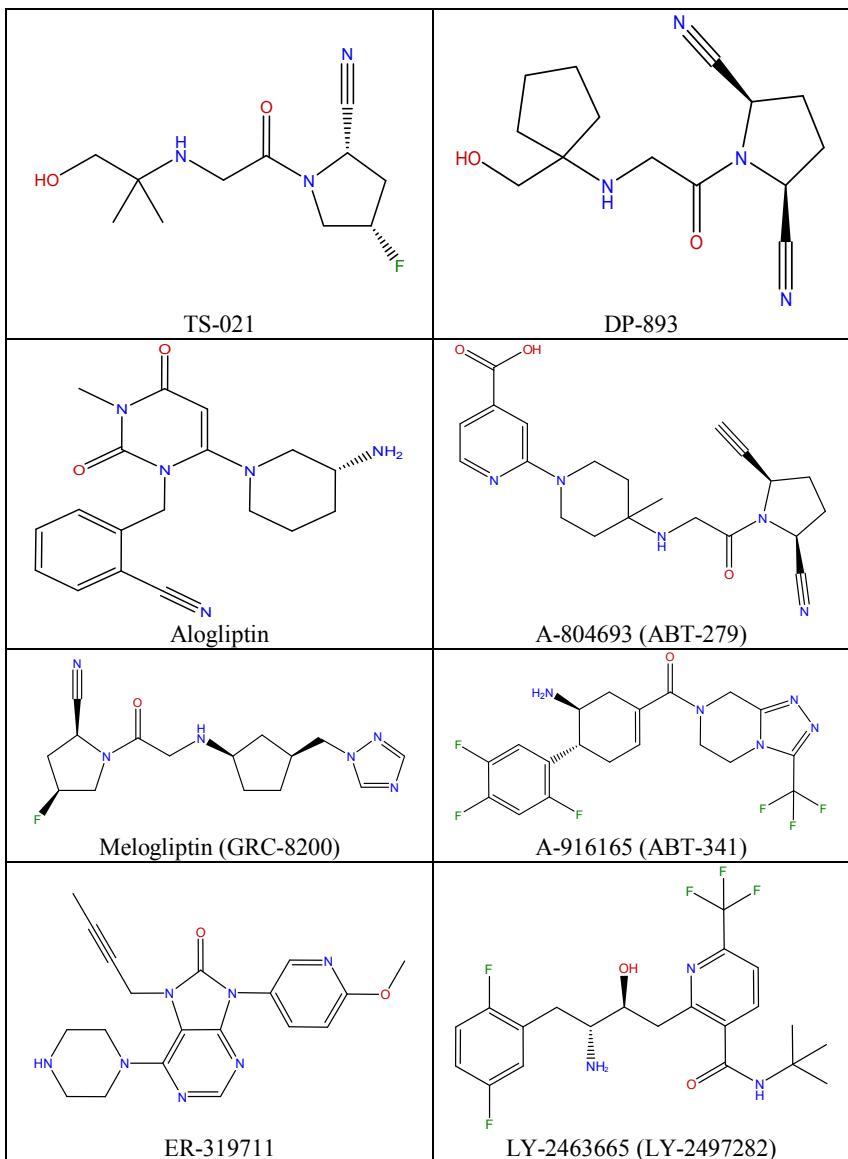
Информация о химической структуре известных агонистов PPAR- $\gamma$ , ингибиторов ГФ и АГ была получена из международных поисковых систем по биологически активным соединениям [ChEMBL, PubChem, BindingDB, DrugBank, IUPHAR, 2014].

Кроме того, был проведен поиск в библиографической системе PubMed [PubMed, 2014]. Отобраны соединения, для которых были доступны структурные формулы и достоверно установлен высокий уровень соответствующей активности как основной, структурно как можно более разнообразные.

Были выбраны 14 референсных агонистов PPAR- $\gamma$  (табл. 9.2); 27 референсных ингибиторов ГФ, с детализацией в отношении четырех сайтов связывания (табл. 9.3); 8 ингибиторов АГ (табл. 9.4).

## Референсные ингибиторы ДПП4

 <p>Vildagliptin</p>	 <p>Saxagliptin</p>
 <p>Denagliptin</p>	 <p>Sitagliptin</p>
 <p>Teneligliptin</p>	 <p>ASP-8497</p>
 <p>Linagliptin</p>	 <p>ASP-8497-394594 (E-3024)</p>



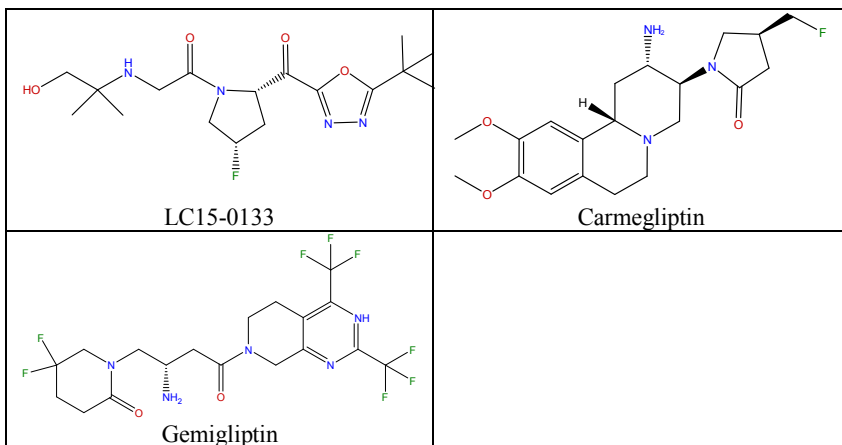
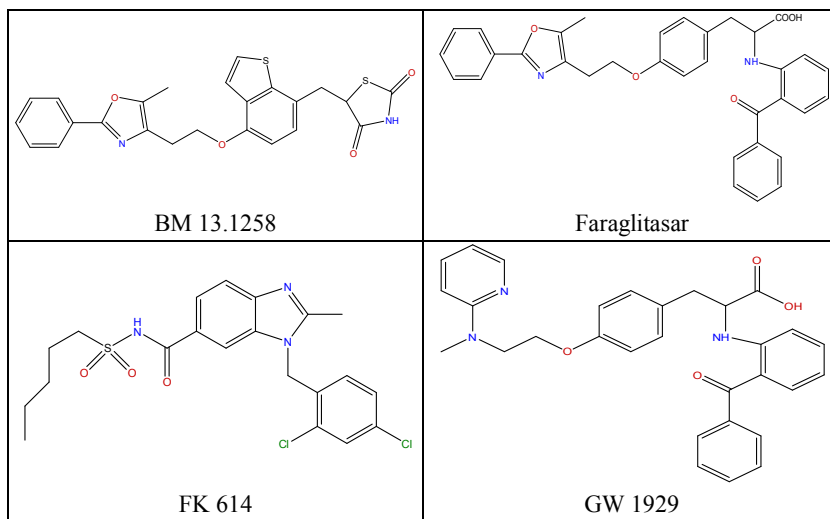
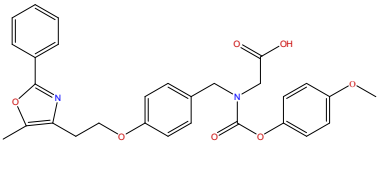
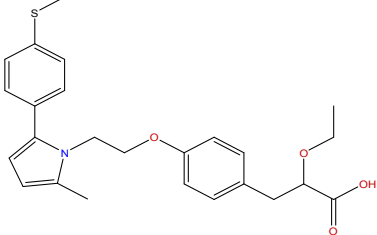
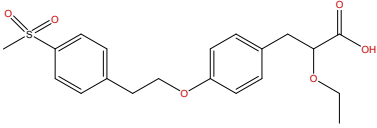
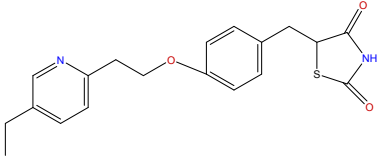
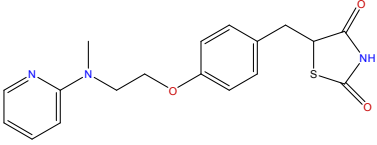
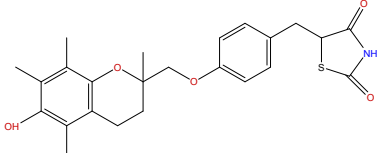
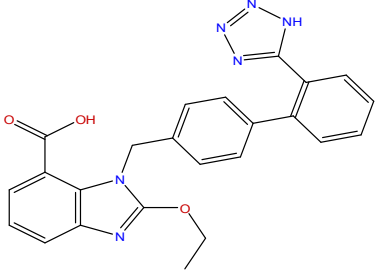
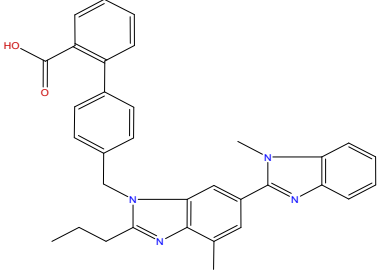
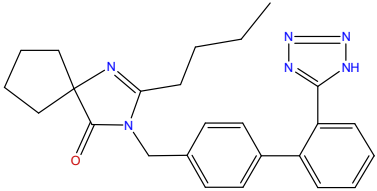
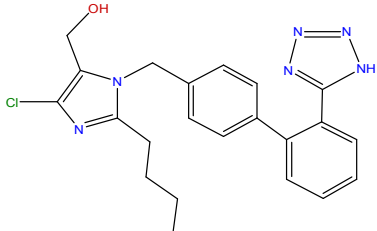


Таблица 9.2

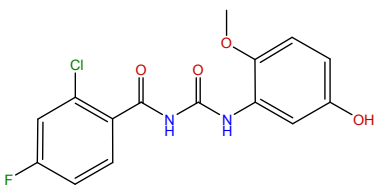
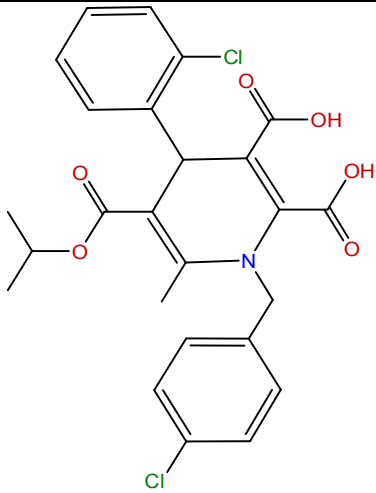
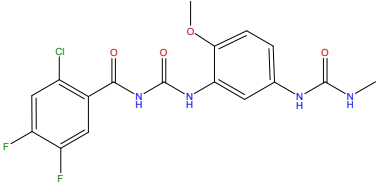
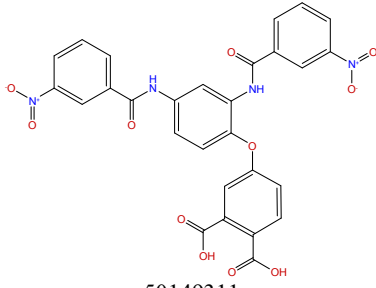
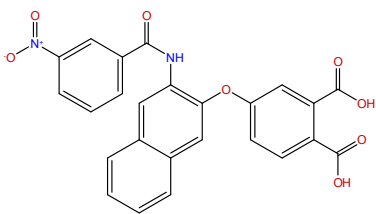
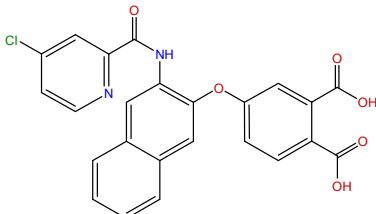
Референсные агонисты PPAR-γ

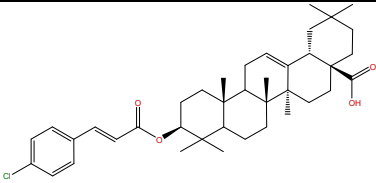
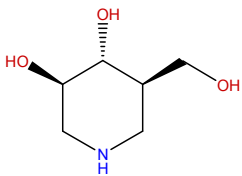
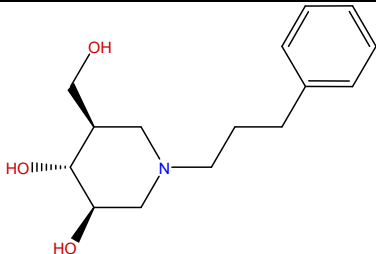
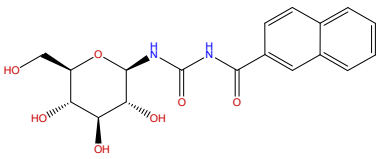
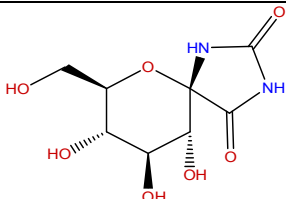
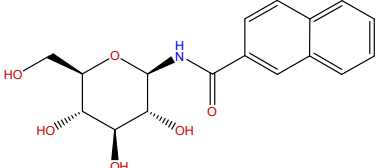
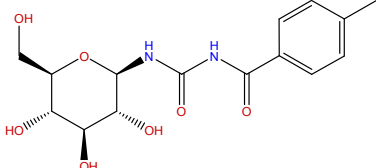
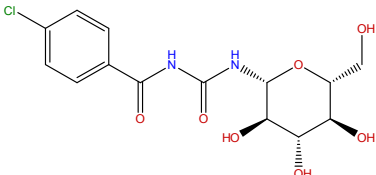
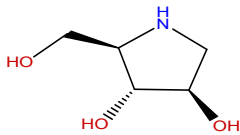


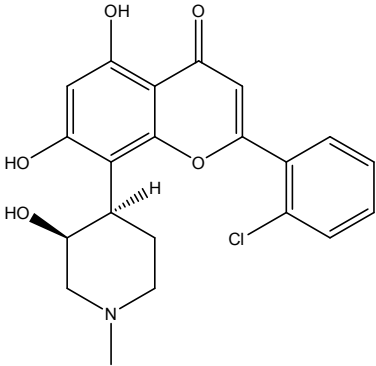
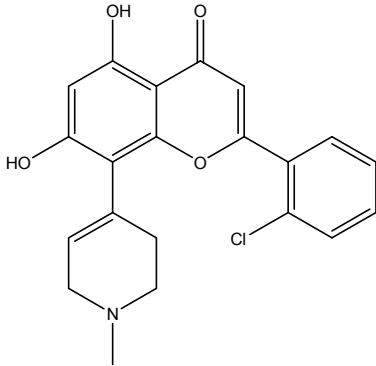
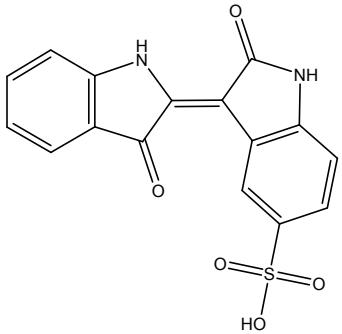
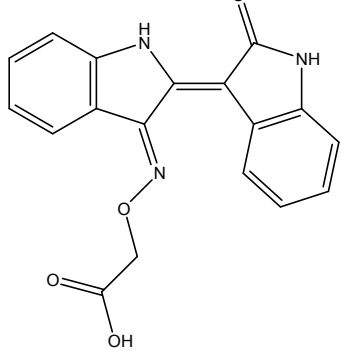
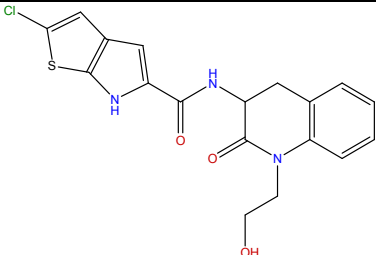
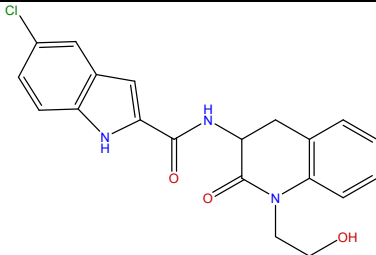


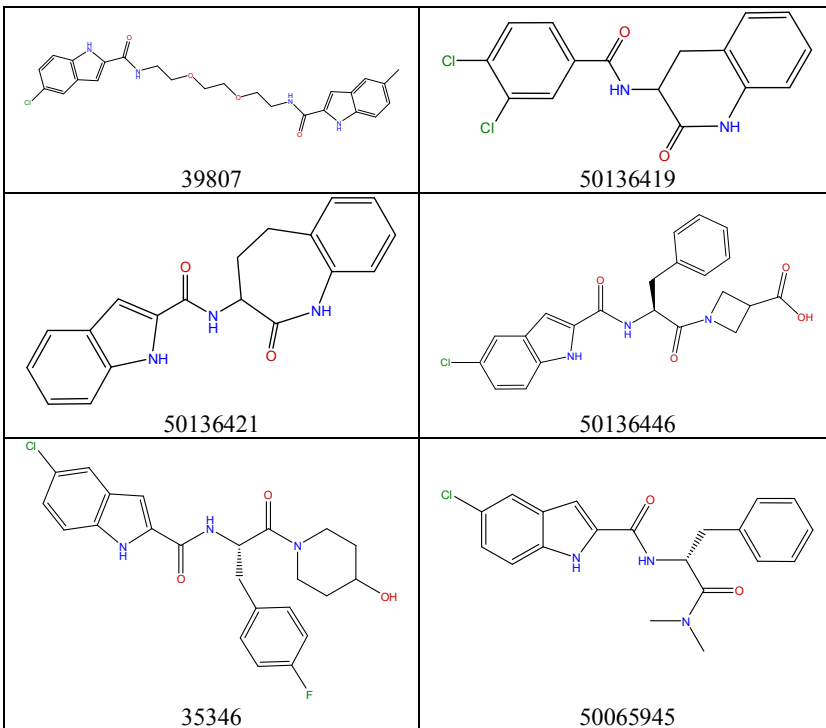
 <p>Muraglitazar</p>	 <p>Saroglitazar</p>
 <p>Tesaglitazar</p>	 <p>Pioglitazon</p>
 <p>Rosiglitazon</p>	 <p>Troglitazon</p>
 <p>Candesartan</p>	 <p>Telmisartan</p>
 <p>Irbesartan</p>	 <p>Losartan</p>

## Референсные ингибиторы ГФ

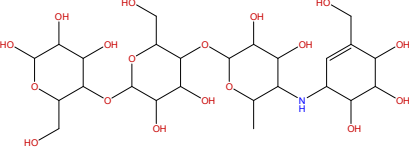
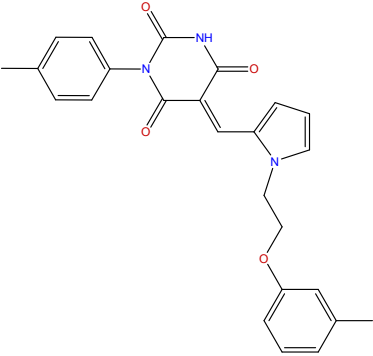
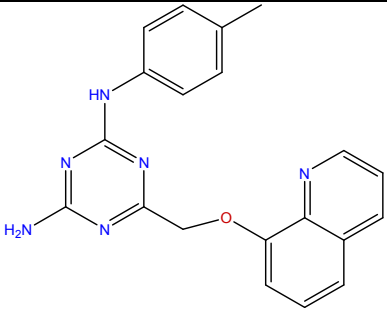
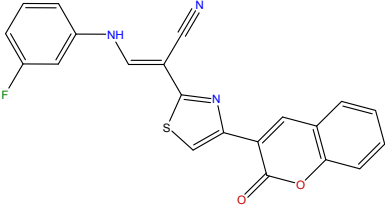
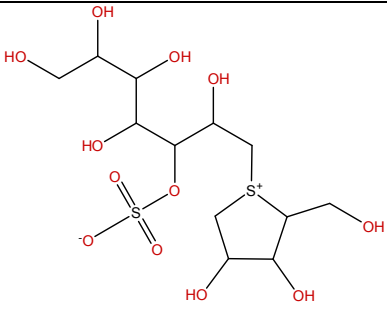
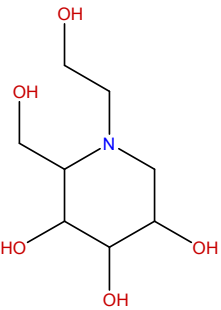
АМФ-связывающий аллостерический сайт	
 <p>50174389</p>	 <p>50133440</p>
 <p>50174379</p>	 <p>50149311</p>
 <p>50135568</p>	 <p>50135553</p>

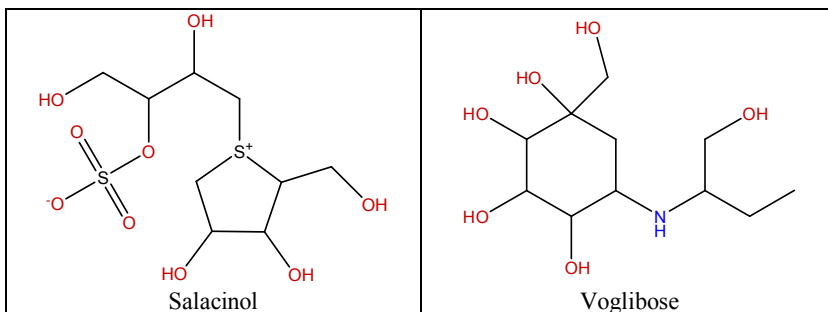
 <p>50184615</p>	
Каталитический сайт	
 <p>50182801</p>	 <p>50194702</p>
 <p>50263773</p>	 <p>50263768</p>
 <p>50263723</p>	 <p>50295843</p>
 <p>50363877</p>	 <p>50031485</p>

Кофеин-связывающий сайт	
 <p>Flavopiridol</p>	 <p>Deoxiflavopiridol</p>
 <p>Indirubin-5-sulphonate</p>	 <p>Indirubin-3'-aminooxyacetate</p>
Индолкарбоксамидный сайт	
 <p>24386</p>	 <p>24387</p>



## Референсные ингибиторы АГ

 <p>Acarbose</p>	 <p>BMCL-2008-18-13-3711-2</p>
 <p>BMCL-2008-18-13-3711-3</p>	 <p>BMCL-2008-18-13-3711-4</p>
 <p>Kotalanol</p>	 <p>Miglitol</p>



Базы данных по структуре референсных препаратов и веществ были сформированы с помощью программы ведения баз данных ИТ «Микрокосм» [Васильев, 2011] в стандартном коммуникативном формате \*.sdf. Пример записи приведен на рис. 9.2.

Просмотр набора структурных данных

О программе

Набор структур: DPP4

Запись	Шифр	Брутто-формула	Индекс по CAS	Комментарий
249	Sitagliptin	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> F <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> P	654671-78-0	Sitagliptin phosphate DPP-4 inhibitor Level = high

Структура

Файловые номера

DPP4-0249

Рис. 9.2. Пример записи базы данных по структуре референсных ингибиторов ДПП4

В процессе работы по выбору референсов были также сформированы общие базы данных активных и неактивных соединений, экспериментально изученных мировым научным сообществом на ДПП4 ингибирующую, PPAR- $\gamma$  агонистическую и ГФ ингибирующую активности.

База данных по ингибиторам ДПП4 содержит 1315 записей, база данных по агонистам PPAR- $\gamma$  включает 1949 записей, база данных по ингибиторам ГФ состоит из 519 записей. На эти базы данных получены свидетельства о государственной регистрации [Свидетельство, 2014, 2015, 2016].

### **9.3. Фокусированная библиотека новых химических структур**

Для последующего виртуального скрининга была сформирована фокусированная библиотека из 4083 новых химических структур, в создании которой принимали участие ученые из семи учебных и научных организаций – медицинские химики и фармакологи. Соединения были любезно предоставлены проф. А.А.Озеровым (ВолгГМУ), академиком РАН В.И. Минкиным, проф. А.С. Морковником, к.х.н. В.А. Анисимовой, к.х.н. О.Н. Жуковской, к.х.н. Л.Н. Диваевой, к.х.н. Т.А. Кузьменко (НИИ ФОХ ЮФУ), проф. Ф.А. Халиуллиным (БГМУ), проф. Ю.Н. Климовичиным (СамГТУ), проф. Ю.В. Поповым и проф. Г.М. Бутовым (ВолгГТУ), академиком РАН О.Н. Чупахиным и член-корреспондентом РАН В.Л. Русиновым (УрФУ), академиком РАН В.Н. Чарушиным и проф. Г.Л. Русиновым (ИОС УрО РАН).

Экспертное конструирование новых соединений выполняли с учетом их структурного сходства с ранее отобранными референсными препаратами и веществами, а также с учетом возможностей синтеза этих структур вышеперечисленными научными группами.

Итоговая фокусированная библиотека по структуре новых соединений было сформированы с помощью программы ведения баз данных ИТ «Микрокосм» [Васильев, 2011] в стандартном коммуникативном формате \*.sdf. Пример записи приведен на рис. 9.3.



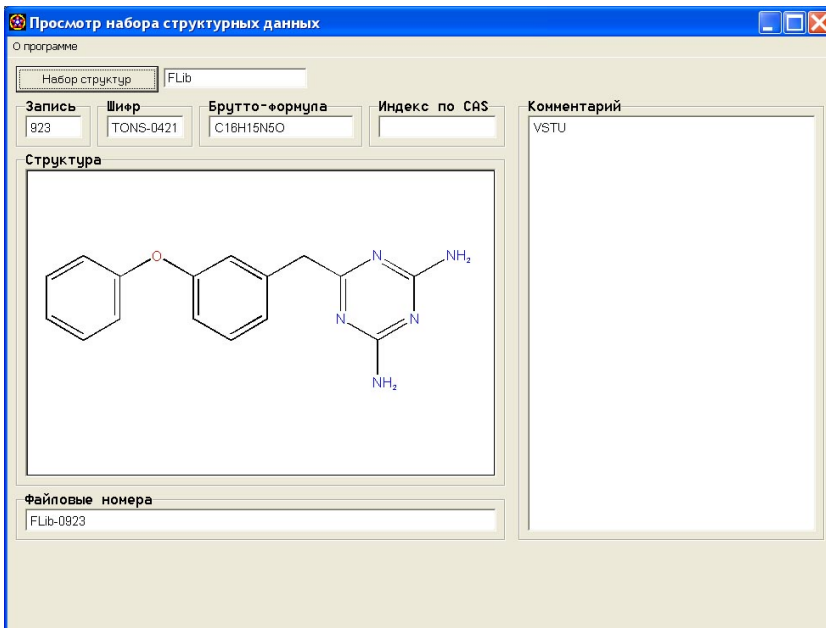


Рис. 9.3. Пример записи фокусированной библиотеки новых химических структур

## 9.4. Метод сходства к эталонам ИТ «Микрокосм»

Метод сходства к эталонам основан на расчете для прогнозируемого соединения средней величины модифицированного коэффициента сходства Танимото по 11 типам QL-дескрипторов модели обобщенного образа класса референсных соединений с заданной активностью.

### 9.4.1. Представление химической структуры

Для рабочего описания структуры соединений в ИТ «Микрокосм» используется язык QL (Quantitative Structure-Activity Relationships Language) [Vassiliev, 1990], расширенная версия которого подробно описана в работах [Васильев, 2006; Vassiliev, 2014] – иерархический язык дескрипторного типа с фрагментарной подструктурной нотацией.

Всего в QL определены 11 типов дескрипторов 1 – 4 рангов.

Алфавит QL (список дескрипторов первого ранга) постулирован и задается тремя типами элементарных дескрипторов.

Структурный дескриптор (СД) – фрагмент структуры соединения с лабильной электронной системой (обладающий достаточно выраженными электронно-донорными или электронно-акцепторными свойствами) и представляющий собой неводородный атом или группу атомов с учетом ближайшего окружения. Подалфавит СД QL постулирован и содержит более 10 тыс. видов дескрипторов для всех элементов периодической таблицы, в том числе 302 вида гетероатомсодержащих СД (например,  $-\text{NH}_2$ ,  $=\text{O}$ ,  $-\text{S}^+<$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $>\text{AsH}$ ,  $\text{Li}$ ,  $\text{Cr}^{+n}$  и т.п.), 14 видов углеродсодержащих СД ( $-\text{C}^+<$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $=\text{CH}_2$ ,  $\#\text{CH}$ ,  $-\text{CH}=\text{}$ ,  $-\text{C}\#$ ,  $>\text{C}=\text{}$ ,  $=\text{C}=\text{}$ ,  $>\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}<$ ,  $>\text{C}<$ ,  $>\text{CH}(\text{Ar})$ ,  $-\text{C}(\text{Ar})<$ ), 3 типа циклических СД ( $\text{Cycnn}$  – простой цикл размером  $nn$ ;  $\text{Cycnnkk}$  – сопряженный цикл размером  $nn$  с  $kk$   $\pi$ -электронами;  $\text{CycAnnn}$  – ароматический цикл размером  $nn$ ), 3 вида интегральных СД ( $\text{Rad}$  – любой углеродсодержащий заместитель;  $\text{Het}$  – любой гетероатом;  $\text{Met}$  – любой металл) и 6 видов СД инертных газов ( $\text{He}$ ,  $\text{Ne}$ ,  $\text{Ar}$ ,  $\text{Kr}$ ,  $\text{Xe}$ ,  $\text{Rn}$ ). При наличии у СД хиральности к его обозначению добавляется метка  $\text{R}$  или  $\text{S}$ , в соответствии с правилом Кана-Ингольда-Прелога [Спасов, 2011].

Дескриптор длины (ДД) – длина в связях кратчайшего пути по углеродной цепочке между двумя СД (принимает значения от 1 до 99) или число общих атомов при непосредственном наложении СД друг на друга (индекс вхождения, принимает отрицательные значения).

Дескриптор связи (ДС) – типы связей, их количество и наличие сопряжения на ДД. Подалфавит ДС постулирован и состоит из 22 видов дескрипторов, каждый из которых формируется сочетанием 4 бинарных индексов: наличия одной или нескольких кратных ( $p$ ,  $P$ ), ароматических ( $a$ ,  $A$ ) и нековалентных ( $n$ ,  $N$ ) связей и индекса сопряжения ( $0$ ,  $1$ ).

Комбинации из двух, трех или четырех элементарных дескрипторов называются простыми составными дескрипторами соответствующего ранга. Дескрипторов второго ранга насчитывается четыре типа, дескрипторов третьего ранга – три типа, дескрипторов четвертого ранга (базовый дескриптор) – один тип.

Структура соединения описывается совокупностью входящих в нее QL-дескрипторов до четвертого ранга включительно – всего 11 типами дескрипторов разного ранга. Дескрипторы более высокого рангов не используются ввиду избыточности такого описания. Структура органического соединения средней сложности описывается обычно 50 – 1000 видами QL-дескрипторов.

Матрицы дескрипторов, представляющие собой модели обобщенных образов классов соединений с заданной активностью, рассчитываются по обучающим выборкам и содержат полные QL-описания химических структур.

#### 9.4.2. Алгоритм прогноза

Величина среднего структурного сходства нового соединения к референсным веществам может служить метрикой наличия прогнозируемой активности. Фактически такой подход можно рассматривать как одноклассную классификацию методом ближайшего соседа [Vassiliev, 2014], в котором метрикой расстояния является коэффициент сходства Танимото [Kubinyi, 1998].

Общая формула коэффициента сходства Танимото

$$T = \frac{N_1 \cap N_2}{N_1 \cup N_2}, \quad (4.1)$$

где  $N_1$  – число дескрипторов, присутствующих в соединении 1;

$N_2$  – число дескрипторов, присутствующих в соединении 2;

$N_1 \cap N_2$  – число дескрипторов, одновременно присутствующих как в соединении 1, так и в соединении 2;

$N_1 \cup N_2$  – число дескрипторов, присутствующих или в соединении 1, или в соединении 2.

В ИТ «Микрокосм» структура соединений описывается набором дескрипторов 11 типов специализированного иерархического многоуровневого языка QL.

Прогноз методом сходства к эталонам основан на расчете для прогнозируемого соединения  $C$  среднего коэффициента сходства Танимото  $T_C$  по 11 типам QL-дескрипторов к структурам нескольких референсных соединений с заданной активностью (эталон)

$$T_C = \frac{1}{R} \sum_{r=1}^R T_{Cr}, \quad (4.2)$$

где  $T_{Cr}$  – средний по 11 типам QL-дескрипторов модифицированный коэффициент сходства Танимото соединения  $C$  к эталону  $r$ ;

$R$  – число эталонов.

$$T_{Cr} = \frac{1}{11} \sum_{i=1}^{11} T_{Cri}, \quad r=1, \dots, R, \quad (4.3)$$

где  $T_{Cri}$  – средний по QL-дескриптору типа  $i$  модифицированный коэффициент сходства Танимото соединения  $C$  к эталону  $r$ .

$$T_{Cri} = \frac{1}{d_i} \sum_{j=1}^{d_i} T_{Crij}, \quad r=1, \dots, R, \quad i=1 \dots 11, \quad (4.4)$$

где  $T_{Crij}$  – средний по QL-дескриптору вида  $j$  типа  $i$  модифицированный коэффициент сходства Танимото соединения  $C$  к эталону  $r$ .

$$T_{Crij} = \frac{\min(K_{Cij}, K_{rij})}{\max(K_{Cij}, K_{rij})}, \quad r=1, \dots, R, \quad i=1, \dots, 11, \quad j=1, \dots, d_i, \quad (4.5)$$

где  $K_{Cij}$  – число QL-дескрипторов вида  $j$  типа  $i$  в соединении  $C$ ;

$K_{rij}$  – число QL-дескрипторов вида  $j$  типа  $i$  в эталоне  $r$ .

Для оценки пороговых величин наличия активности определяли минимальное среднее  $T_{min}$ , общее среднее  $T_{aver}$  и максимальное среднее  $T_{max}$  значения в ряду показателей среднего сходства каждого из эталонов  $r$  к остальным эталонам (кроме себя самого):

$$T_{min} = \min_{i=1}^R \frac{1}{R-1} \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq r}}^R T_{ir}, \quad (4.6)$$

$$T_{aver} = \frac{1}{R} \sum_{i=1}^R \frac{1}{R-1} \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq r}}^R T_{ir}, \quad (4.7)$$

$$T_{max} = \max_{i=1}^R \frac{1}{R-1} \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq r}}^R T_{ir}. \quad (4.8)$$

С целью последующего обобщения для соединения  $C$  прогнозных оценок, полученных в трех системах прогноза, значение  $T_C$  переводили в индекс перспективности:

$$Ind_{1,C} = 3 \text{ if } T_C \geq T_{max}, \quad (4.9)$$

$$Ind_{1,C} = 2 \text{ if } T_{max} > T_C \geq T_{aver}, \quad (4.10)$$

$$Ind_{I,C} = 1 \text{ if } T_{aver} > T_C \geq T_{min} , \quad (4.11)$$

$$Ind_{I,C} = 0 \text{ if } T_C < T_{min} . \quad (4.12)$$

### 9.4.3. Пороговые величины сходства

Для каждой группы референсных соединений (табл. 9.1–9.4), с учетом сайтов взаимодействия, были рассчитаны показатели  $T_{max}$ ,  $T_{aver}$  и  $T_{min}$ . Результаты приведены в табл. 9.5.

Таблица 9.5

**Пороговые величины взаимного сходства референсных препаратов и веществ**

Мишень	Сайт	$T_{max}$	$T_{aver}$	$T_{min}$
ДПП4	–	0.3181	0.2475	0.1560
PPAR- $\gamma$	–	0.3902	0.3267	0.2357
ГФ	АМФ-связывающий	0.3680	0.2811	0.1398
	Каталитический	0.3715	0.3033	0.2133
	Кофеиновый	0.3518	0.3367	0.3226
	Индолкарбоксамидный	0.6139	0.4984	0.3665
АГ	–	0.2066	0.1508	0.1061

Все расчеты были выполнены с помощью модуля TestSim программного комплекса ИТ «Микрокосм» версии 7.1 [Васильев, 2011; Vassiliev, 2014]. Интерфейс программы TestSim приведен на рис. 9.4.

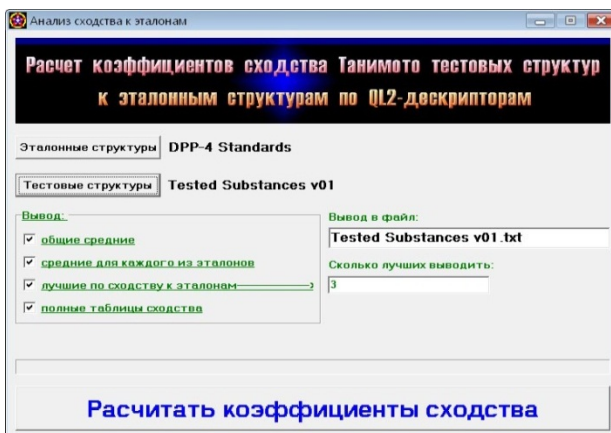


Рис. 9.4. Интерфейс программы TestSim 7.1 программного комплекса ИТ «Микрокосм»

## 9.5. Система PASS

Прогноз в системе PASS основан на расчете для прогнозируемого соединения вероятностей наличия и отсутствия активности по двум типам MNA-дескрипторов.

### 9.5.1. Представление химической структуры

Для рабочего описания структуры соединений в PASS используется MNA-дескрипторы [Филимонов, Поройков, 2006а]. Они основаны на топологическом представлении структуры химического соединения, при котором явно указываются все атомы водорода и не учитываются типы связей.

MNA-дескрипторы для каждого атома молекулы строятся рекурсивно следующим образом:

$A$  – MNA-дескриптор нулевого уровня, представляющий собой метку самого атома;

$A(D_1 D_2 \dots D_i \dots)$  – MNA-дескриптор любого следующего уровня, представляющий собой условное обозначение структурного фрагмента, в котором  $D_i$  является MNA-дескриптором предыдущего уровня для непосредственного соседа  $i$  атома с меткой  $A$ .

При прогнозе в PASS используются MNA-дескрипторы только 1-го и 2-го уровней.

### 9.5.2. Алгоритм прогноза

Метод прогноза основан на оценке условной вероятности по формуле Байеса с использованием арксинусного преобразования Фишера [Филимонов, Поройкой, 2006а]. Рассчитываются вероятности наличия  $P_{a,C}$  и отсутствия  $P_{i,C}$  у прогнозируемого соединения  $C$  заданной активности. Вещество считается активным, если  $P_{a,C} > P_{i,C}$ .

Условные обозначения:

$n$  – общее число соединений в обучающей выборке (базе данных);

$n_k$  – число соединений, содержащих дескриптор  $k$  ;

$n_l$  – число соединений, проявляющих активность  $l$  ;

$n_{kl}$  – число соединений с активностью  $l$  , содержащих дескриптор  $k$  ;

$p_l = n_l / n$  – оценка априорной вероятности активности  $l$ ;

$p_{kl} = n_{kl} / n_k$  – оценка условной вероятности активности  $l$  для дескриптора  $k$ ;

$m$  – общее число дескрипторов в прогнозируемом соединении  $C$ ;

$r_k = n_k / (n_k + 0.5 / m)$  – регулирующий фактор;

$Pr_l$  – начальная оценка вероятности наличия активности  $l$  у соединения  $C$ .

Для прогнозируемого соединения  $C$  порождается MNA-описание.

По этому описанию для каждого вида активности  $l$  рассчитываются следующие значения:

$$u_l = \sum_k \arcsin [r_k \cdot (2p_{kl} - 1)], \quad (5.1)$$

$$u_{0l} = \sum_k \arcsin [r_k \cdot (2p_l - 1)], \quad (5.2)$$

$$s_l = \sin(u_l / m), \quad (5.3)$$

$$s_{0l} = \sin(u_{0l} / m), \quad (5.4)$$

$$Pr_l = [1 + (s_l - s_{0l}) / (1 - s_l \cdot s_{0l})] / 2. \quad (5.5)$$

По результатам предварительного тестирования на обучающей выборке методом скользящего контроля по одному для каждого вида активности  $l$  рассчитываются следующие функции:

$EF_l(CP)$  – зависимость, описывающая вероятность ошибки первого рода (отнесение активного соединения к не активным);

$ES_l(CP)$  – зависимость, описывающая вероятность ошибки второго рода (отнесение не активного соединения к активным);

где  $CP$  – пороговое значение для  $Pr_l$ , пробегающее при тестировании значения от 0 до 1.

В случае ошибки первого рода для активного соединения  $Pr_l < CP$ ;  
в случае ошибки второго рода для не активного соединения  $Pr_l > CP$ .

При прогнозе для соединения  $C$  вычисляются:

$$P_{al,C} = EF_l(Pr_{l,C}) - \text{вероятность наличия активности } l; \quad (5.6)$$

$$P_{il,C} = ES_l(Pr_{l,C}) - \text{вероятность отсутствия активности } l. \quad (5.7)$$

С целью последующего обобщения для соединения  $C$  прогнозных оценок, полученных в трех системах прогноза, рассчитывали отношение правдоподобия  $L_C = P_{a,C} / P_{i,C}$ , которое затем переводили в индекс перспективности:

$$Ind_{2C} = 3 \text{ if } L_C \geq 100, \quad (5.8)$$

$$Ind_{2C} = 2 \text{ if } 100 > L_C \geq 10, \quad (5.9)$$

$$Ind_{2C} = 1 \text{ if } 10 > L_C > 1, \quad (5.10)$$

$$Ind_{1,C} = 0 \text{ if } L_C \leq 1. \quad (5.11)$$

Все расчеты были выполнены с помощью программы PASS 10.4 Professional Extended [Филимонов, Поройков, 2006б]. Интерфейс программы приведен на рис. 9.5.

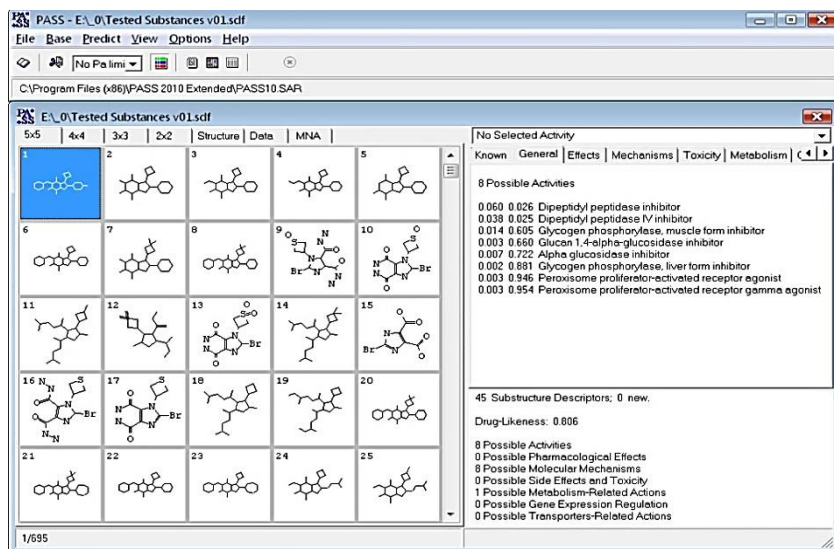


Рис. 9.5. Интерфейс программы PASS

## 9.6. Построение и оптимизация 3D-моделей низкомолекулярных лигандов

Необходимые для последующего докинга 3D-молекулярные модели, как референсных препаратов и веществ, так и новых химических соединений, были построены по структурным формулам и затем оптимизированы – последовательно, методами молекулярной механики и квантовой химии. Сна-



чала с помощью программы MarvinSketch 15.6.15 [ChemAxon, 2014] с использованием силового поля Draiding для каждого соединения проводили построение 10 энергетически наиболее выгодных конформеров. Затем выполняли оптимизацию этих 10 конформеров полуперирическим квантово-химическим методом PM7 с помощью программы MOPAC2012 [MOPAC, 2015] и отбирали конформер с минимальной общей энергией. Обработка данных осуществлялась в операционных системах Windows 7 и CentOS Linux 5 в потоковом режиме, с применением специально для этого написанных скриптов и программ-утилит Sdf2mol 1.0 и BestConf 1.0. Конвертация из одного стандартного формата записи химических структур в другой осуществлялась с помощью программы OpenBabel 2.3.2 [OpenBabel, 2015].

Технологическая схема построения оптимизированных 3D-моделей низкомолекулярных лигандов приведена на рис. 9.6.

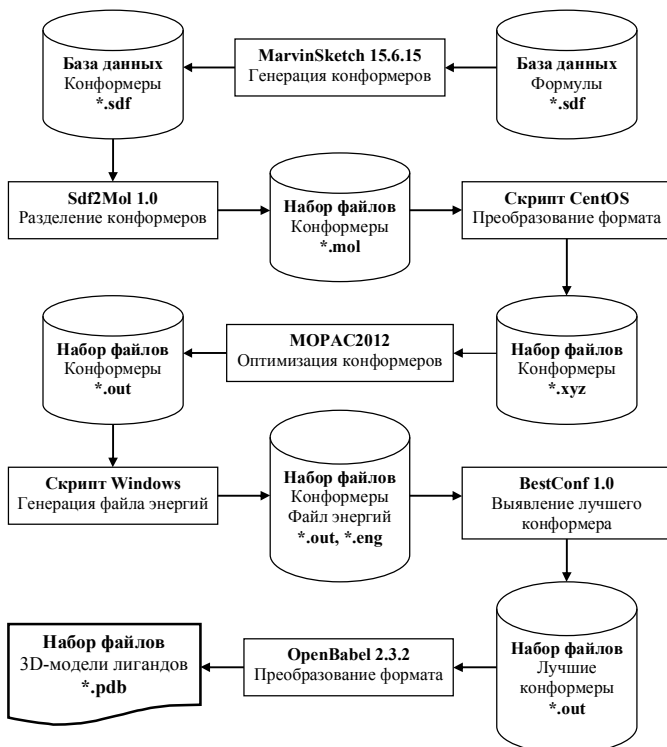


Рис. 9.6. Технологическая схема построения и оптимизации 3D-моделей химических соединений

Пример 3D-модели соединения с лабораторным шифром RU-0017 приведен на рис. 9.7.

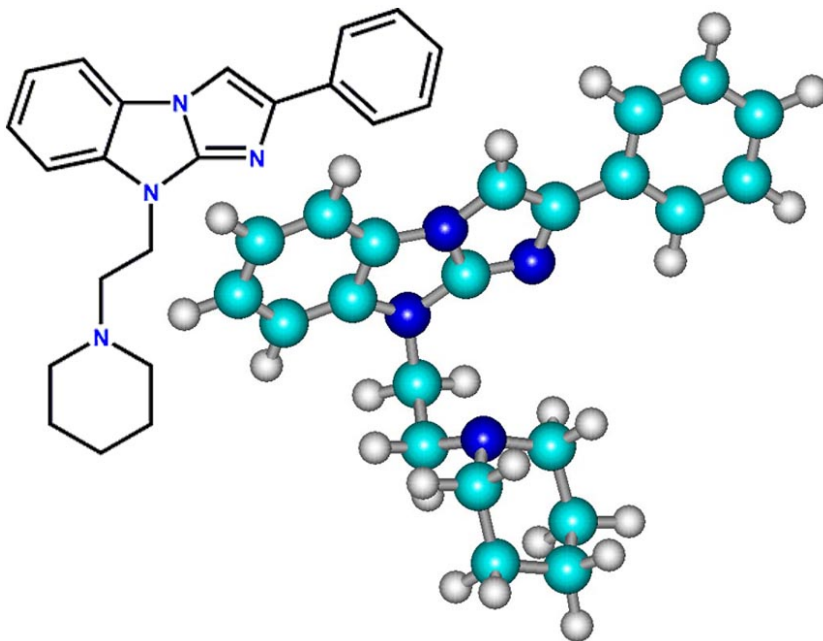


Рис. 9.7. 3D-модель соединения RU-0017

## 9.7. Молекулярный докинг

Докинг соединений в сайты связывания биомишеней осуществлялся с помощью программы AutoDock Vina 1.1.1 [Trott, 2010]. Эта программа выполняет гибкий докинг низкомолекулярного лиганда в гибкий сайт связывания белка-биомишени.

Позиционирование лиганда и расчет энергии его взаимодействия с сайтом связывания производится методом молекулярной механики с использованием специально разработанного силового поля Vina, основанного на силовом поле Amber и параметризованного по базе экспериментальных данных о трехмерном строении около 2 тыс. лиганд-белковых комплексов.

### 9.7.1. Алгоритм прогноза

Основанная на принципе линейности свободной энергии, функция для расчета свободной энергии Гиббса образования комплекса «лиганд-белок» имеет общий вид

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{desolv} + \Delta G_{tors}, \quad (7.1)$$

где  $\Delta G_{vdW}$  – энергия ван-дер-Ваальсовских взаимодействий;

$\Delta G_{elec}$  – энергия электростатических взаимодействий;

$\Delta G_{hbond}$  – энергия образования водородных связей;

$\Delta G_{desolv}$  – энергия десольватации;

$\Delta G_{tors}$  – торсионная энергия.

В AutoDock Vina для аппроксимации  $\Delta G_{binding}$  используется полуэмпирическое силовое поле Vina, в котором вклады различных видов взаимодействий вычисляются следующим образом [Huey, 2006].

Энергия ван-дер-Ваальсовских взаимодействий рассчитывается с использованием потенциала 12–6 Леннарда-Джонса

$$\Delta G_{vdW} = W_{vdW} \cdot \sum_{ij} \left( \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right), \quad (7.2)$$

где  $W_{vdW}$  – эмпирический весовой коэффициент;

$R_{ij}$  – расстояние между центрами атомов  $i, j$ ;

$A_{ij}, B_{ij}$  – эмпирические параметры, которые рассчитываются для каждой пары взаимодействующих атомов  $i, j$  разного типа по экспериментальным данным (соответствуют параметрам силового поля Amber [Weiner, 1984]).

Энергия электростатических взаимодействий рассчитывается по формуле

$$\Delta G_{elec} = W_{elec} \cdot \sum_{ij} \left[ \frac{q_i \cdot q_j}{\varepsilon(R_{ij}) \cdot R_{ij}} \right], \quad (7.3)$$

где  $W_{elec}$  – эмпирический весовой коэффициент;

$q_i, q_j$  – заряды на атомах  $i, j$ ;

$R_{ij}$  – расстояние между центрами атомов  $i, j$ ;

$\varepsilon(R_{ij})$  – диэлектрическая проницаемость, задается зависящей от расстояния  $R_{ij}$  сигмоидальной функцией Солмайера [Mehler, 1991]

$$\varepsilon(R) = a + \frac{b}{1 + k \cdot e^{-\lambda \cdot b \cdot R}} \quad (7.4)$$

где  $a, b, k, \lambda$  – эмпирические параметры:

$$a = -8.5525, \quad b = 86.9525, \quad k = 7.7839, \quad \lambda = 0.003627.$$

Энергия образования водородных связей рассчитывается с использованием расширенного потенциала 12–10 Леннарда-Джонса с направленным компонентом

$$\Delta G_{hbond} = W_{hbond} \cdot \sum_{ij} \left[ E(\theta) \cdot \left( \frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right) \right], \quad (7.5)$$

где  $W_{hbond}$  – эмпирический весовой коэффициент;

$R_{ij}$  – расстояние между центрами атомов  $i, j$ ;

$C_{ij}, D_{ij}$  – эмпирические параметры, которые рассчитываются для каждой пары взаимодействующих атомов  $i, j$  разного типа (один из которых водород) по экспериментальным данным.

$E(\theta)$  – эмпирический угловой весовой фактор [Boobbyer, 1989], который задается несколькими степенными косинусными функциями от углов  $\theta_1$  и  $\theta_2$ , образующих водородную связь (X...H–Y), вид этих функций зависит от типов атомов X и Y.

Энергия десольватации рассчитывается по формуле

$$\Delta G_{desolv} = W_{desolv} \cdot \sum_{ij} \left[ (S_i \cdot V_j + S_j \cdot V_i) \cdot e^{\left( \frac{-R_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)} \right], \quad (7.6)$$

где  $W_{desolv}$  – эмпирический весовой коэффициент;

$V_i$  – объем атомов, окружающих атом  $i$ ;

$S_i$  – сольватационный параметр Стаутена [Stouten, 1993] для атома  $i$ , определяется формулой

$$S_i = ASP_i + QASP \cdot |q_i|, \quad (7.7)$$

где  $ASP_i$  – эмпирический сольватационный параметр для атома  $i$  :

$$ASP_C = -0.00143, \quad ASP_{CAr} = -0.00052,$$

$$ASP_N = -0.00162, \quad ASP_O = -0.00251,$$

$$ASP_H = -0.00051, \quad ASP_S = -0.00214;$$

$QASP$  – эмпирическая сольватационная постоянная, равна 0.01097;

$q_i$  – заряд на атоме  $i$  ;

$R_{ij}$  – расстояние между центрами атомов  $i, j$  ;

$\sigma$  – эмпирический весовой фактор расстояния, равен 3.5 Å.

Торсионная энергия  $\Delta G_{tors}$  представляет собой разность между энергией свободного лиганда и энергией лиганда в комплексе с белком. Она возникает при изменении конформации лиганда за счет наличия в нем вращаемых связей. Для выявления конформации, соответствующей оптимальному связыванию лиганда с сайтом биомишени (минимуму энергии связывания), необходимо построить все возможные конформации этого лиганда, порождаемые вращением по всем его конформационно подвижным связям, и рассчитать для этих конформаций энергию их взаимодействия с белком.

Для практических расчетов число возможных конформаций задается формулой

$$K = T^{360/inc}, \quad (7.8)$$

где  $T$  – число вращаемых связей;

$inc$  – инкремент вращения в градусах.

При наличии в структуре соединения 10 конформационно подвижных связей и шаге в  $10^\circ$  число конформаций, для которых надо вычислить энергию лиганда в комплексе с белком, составит  $10^{36}$ . На практике, даже используя суперкомпьютерные вычислительные комплексы, выполнять полные конформационные расчеты по всем торсионным степеням свободы практически невозможно.

Для сокращения объема вычислений, связанных с анализом конформаций, в AutoDock Vina используется решеточный подход в сочетании с генетическим алгоритмом [Trott, 2010].

Формируется трехмерная решетка (grid), покрывающая лиганд и сайт взаимодействия (по умолчанию с шагом 1 Å). В режиме определения локализации сайта связывания такая решетка покрывает всю биомишень.

Для последующего использования в процедуре докинга производится grid-картирование биомишени путем расчета значений энергии взаимодействия помещенных в узлы решетки единичных «пробных» атомов лиганда с фрагментами белка, которые находятся в ячейках решетки. Полученная grid-карта используется в дальнейшем для расчета энергии взаимодействия лиганда и биомишени.

Выбор энергетически наиболее выгодных конформаций комплекса лиганда с сайтом биомишени выполняется с помощью генетического алгоритма [Morriss, 2009].

### 9.7.2. Технологическая схема докинга

Докинг с помощью AutoDock Vina выполняется в несколько этапов.

1. Подготовка данных по 3D-структурам белков и лигандов.
2. Формирование пространства специфического сайта связывания.
3. Собственно докинг соединений в специфический сайт связывания.
4. Обработка результатов докинга и запись файла минимальных энергий связывания.

Все расчеты по докингу были выполнены с использованием программного пакета AutoDock Vina 1.1.1 [AutoDock Vina, 2011] в комплекте с дополнительными инструментами AutoDockTools 1.5.2 [MGLTools, 2011], PyRx 0.8 [PyRx, 2011], VMD 1.9.2 [VMD, 2011] и PyMOL 1.4.2 [PyMOL, 2011]. Обработка данных осуществлялась в операционных системах Windows 7 и CentOS Linux 5 в потоковом режиме, с применением специально для этого написанных скриптов.

**Подготовка 3D-структур белков и лигандов.** Экспериментальные рентгеноструктурные 3D-модели биомишеней были получены по спискам базы знаний UniProtKB [UniProtKB, 2011] из базы данных PDB [PDB, 2011] в стандартном формате \*.ent. Перед докингом с помощью программы PyMOL из всех найденных моделей были удалены низкомолекулярные лиганды и полученные структуры белков записаны в стандартном коммуникативном формате \*.pdb. В таком же формате представлены оптимизированные 3D-модели референсных соединений и новых химических структур.

Перед началом докинга эти данные с помощью пакета AutoDock Tools были преобразованы во внутренний формат \*.pdbqt программы AutoDock Vina.

Информацию о ключевых связывающих аминокислотах сайтов получали из литературных данных по рентгеноструктурному анализу и последующему молекулярному моделированию кристаллических комплексов белков с соответствующими лигандами. Пространство для докинга формировали с помощью программы PyRx с достаточно большим запасом, так, чтобы оно захватывало все ключевые связывающие аминокислоты. Геометрические координаты полученной области докинга записывали в скрипт. Пример формирования с использованием оболочки PyRx пространства для докинга в каталитический сайт ГФ приведен на рис. 9.8.

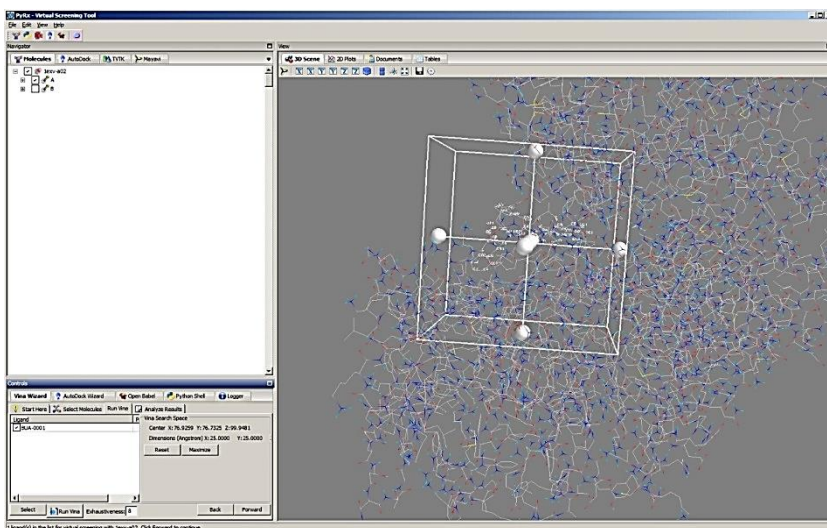


Рис. 9.8. Формирование в программе PyRx пространства сайта для докинга

Докинг соединений с помощью программы AutoDock Vina проводили в потоковом режиме с применением специального скрипта, содержащего координаты области докинга. Для каждого соединения выполнялось построение и запись в файлы девяти конформеров с наименьшими энергиями докинга, значения которых записывались в отдельный файл.

Итоговую обработку результатов производили с помощью специального скрипта, который для каждого соединения осуществлял выбор одного конформера с минимальной энергией докинга и записывал величину этой энергии в общий для всех соединений файл. С помощью пакета AutoDockTools 3D-структуры найденных оптимальных конформеров преобразовывались из внутреннего формата \*.pdbqt программы AutoDock Vina в стандартный коммуникативный формат \*.pdb.

Общая технологическая схема докинга приведена на рис. 9.9.

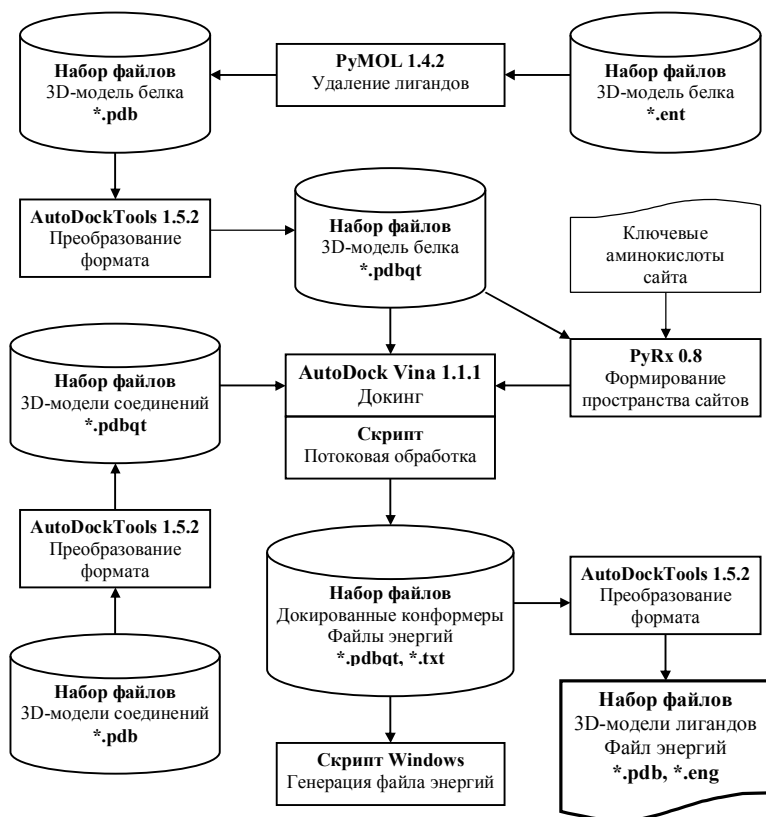


Рис. 9.9. Технологическая схема докинга



## 9.8. Валидация 3D-моделей биомишеней

Отбор лучших 3D-моделей биомишеней выполняли с помощью ансамблевого докинга референсных соединений в специфические сайты биомишеней, в соответствии с общей технологической схемой докинга (рис. 9.9).

Выполняли докинг каждого референсного соединения, соответствующего валидируемой биомишени, по три раза в каждый сайт связывания каждой из 3D-моделей заданной биомишени. Метриками валидности  $i$ -ой модели служили средняя  $\Delta E_{aver,i}$ , минимальная  $\Delta E_{min,i}$  и максимальная  $\Delta E_{max,i}$  энергии докинга всех соответствующих референсных веществ во все сайты данной модели. Для каждой биомишени были отобраны по три лучших 3D-модели с минимальными значениями  $\Delta E_{aver,i}$  и максимальными показателями вариационного размаха ( $\Delta E_{min,i} - \Delta E_{max,i}$ ).

Для оценки пороговых величин наличия данной активности определяли минимальное среднее  $\Delta E_{min}$ , общее среднее  $\Delta E_{aver}$  и максимальное среднее  $\Delta E_{max}$  значения энергии докинга всех референсных ингибиторов в три отобранных валидных 3D-модели соответствующей биомишени:

$$\Delta E_{min} = \min_{i=1}^R \frac{1}{3} \sum_{j=1}^3 \frac{1}{S_j} \sum_{k=1}^{S_j} \frac{1}{3} \sum_{l=1}^3 \Delta E_{ijkl}, \quad (8.1)$$

$$\Delta E_{aver} = \frac{1}{R} \sum_{i=1}^R \frac{1}{3} \sum_{j=1}^3 \frac{1}{S_j} \sum_{k=1}^{S_j} \frac{1}{3} \sum_{l=1}^3 \Delta E_{ijkl}, \quad (8.2)$$

$$\Delta E_{max} = \max_{i=1}^R \frac{1}{3} \sum_{j=1}^3 \frac{1}{S_j} \sum_{k=1}^{S_j} \frac{1}{3} \sum_{l=1}^3 \Delta E_{ijkl}, \quad (8.3)$$

где  $\Delta E_{ijkl}$  – энергия  $l$ -го докинга в  $k$ -й сайт  $j$ -й модели  $i$ -го референсного соединения;

$S_j$  – число сайтов в  $j$ -й модели;

$R$  – число референсов.

Общая технологическая схема валидации 3D-моделей биомишеней приведена на рис. 9.10.

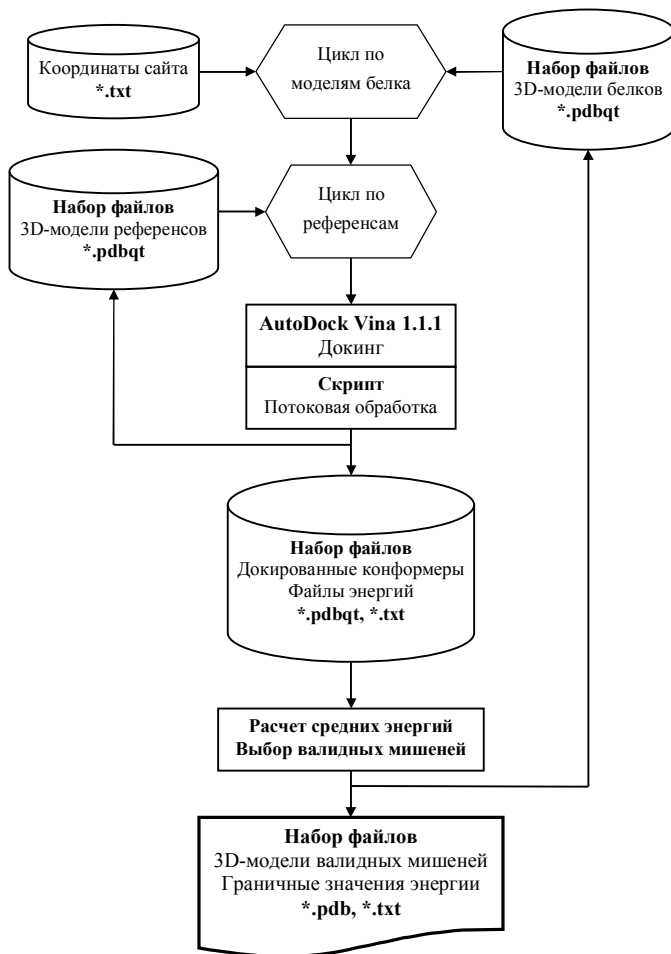
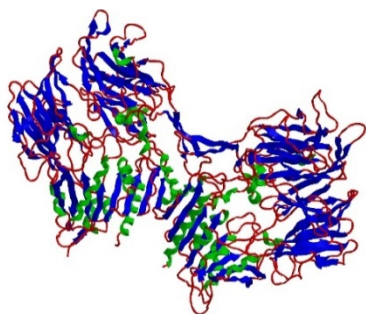


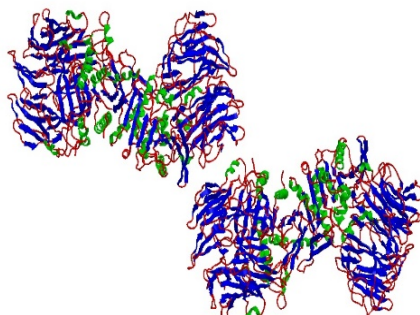
Рис. 9.10. Технологическая схема валидации 3D-моделей биомишеней

### 9.8.1. Валидация 3D-моделей дипептидилпептидазы-4

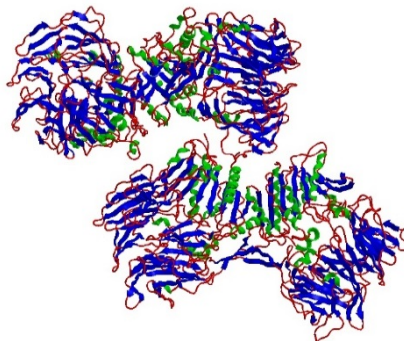
Всего для валидации из UniProtKB и PDBe отобрано 87 экспериментальных рентгеноструктурных 3D-моделей комплексов дипептидилпептидазы 4 (ДПП4) с различными ингибиторами: 1J2E, 1N1M, 1NU6, 1NU8, 1PFQ, 1R9M, 1R9N, 1RWQ, 1TK3, 1TKR, 1U8E, 1W1I, 1WCY, 1X70, 2AJL, 2BGN, 2BGR, 2BUB, 2FJP, 2G5P, 2G5T, 2G63, 2HHA, 2I03, 2I78, 2IIT, 2IIV, 2JID, 2OAG, 2OGZ, 2OLE, 2ONC, 2OPH, 2OQI, 2OQV, 2P8S, 2QJR, 2QKY, 2QOE, 2QT9, 2QTB, 2RGU, 2RIP, 3BJM, 3C43, 3C45, 3CCB, 3CCC, 3D4L, 3EIO, 3F8S, 3G0B, 3G0C, 3G0D, 3G0G, 3H0C, 3HAB, 3HAC, 3KWF, 3KWI, 3NOX, 3O95, 3O9V, 3OC0, 3OPM, 3Q0T, 3Q8W, 3QBJ, 3SWW, 3SX4, 3VJK, 3VJL, 3VJM, 3W2T, 4A5S, 4DSA, 4DSZ, 4DTC, 4G1F, 4J3J, 4JH0, 4KR0, 4L72, 4LKO, 4N8D, 4N8E, 4PNZ. Из всех моделей перед докингом были удалены низкомолекулярные лиганды.



2OGZ – димер, 2 сайта



3CCC – тетрамер, 4 сайта



3G0B – тетрамер, 4 сайта

*Рис. 9.11. Валидные модели ДПП4*

Пространство сайта ингибирования ДПП4 определяли по данным рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования [Nabe-no, 2013]. Была построена область докинга, включающая следующие ключевые аминокислоты: Glu-205, Glu-206, Tyr-547, Ser-630, Asp-708, His-740.

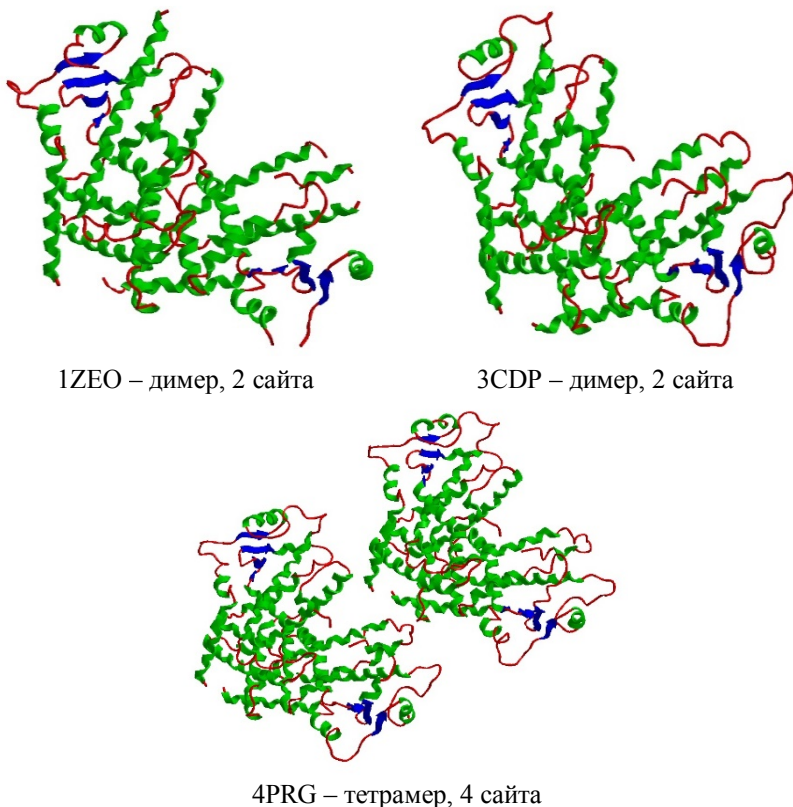
В результате ансамблевого докинга референсов отображены три лучшие модели ДПП4 – 2OGZ [Sheehan, 2007], 3CCC [Wallace, 2008] и 3G0B [Zhang, 2011], приведены на рис. 9.11.

### **9.8.2. Валидация 3D-моделей рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом, подтип гамма**

Всего для валидации из UniProtKB и PDBe отобрано 122 экспериментальных рентгеноструктурных 3D-моделей комплексов рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом, подтип гамма (PPAR- $\gamma$ ) с различными агонистами: 1FM6, 1FM9, 1I7I, 1K74, 1KNU, 1NYX, 1PRG, 1RDT, 1WM0, 1ZEO, 1ZGY, 2ATH, 2F4B, 2FVJ, 2G0G, 2G0H, 2GTK, 2HFP, 2HWQ, 2HWR, 2I4J, 2I4P, 2I4Z, 2OM9, 2P4Y, 2POB, 2PRG, 2Q59, 2Q5P, 2Q5S, 2Q61, 2Q6R, 2Q6S, 2Q8S, 2QMV, 2VSR, 2VST, 2VV0, 2VV1, 2VV2, 2VV3, 2VV4, 2XKW, 2YFE, 2ZK0, 2ZK1, 2ZK2, 2ZK3, 2ZK4, 2ZK5, 2ZK6, 2ZNO, 2ZVT, 3ADS, 3ADT, 3ADU, 3ADV, 3ADW, 3ADX, 3AN3, 3AN4, 3B0Q, 3B0R, 3B1M, 3B3K, 3BC5, 3CDP, 3CDS, 3CS8, 3CWD, 3D6D, 3DZU, 3DZY, 3E00, 3ET0, 3ET3, 3FEJ, 3FUR, 3G9E, 3GBK, 3H0A, 3H0O, 3HOD, 3IA6, 3K8S, 3KMG, 3LMP, 3NOA, 3OSI, 3OSW, 3PBA, 3PO9, 3PRG, 3QT0, 3R5N, 3R8A, 3R8I, 3S9S, 3SZ1, 3T03, 3TY0, 3U9Q, 3V9T, 3V9V, 3V9Y, 3VJH, 3VJI, 3VN2, 3VSO, 3VSP, 4A4V, 4A4W, 4E4K, 4E4Q, 4EM9, 4EMA, 4F9M, 4FGY, 4HEE, 4JAZ, 4JL4, 4PRG. Из всех моделей перед докингом были удалены низкомолекулярные лиганды.

Пространство сайта связывания PPAR- $\gamma$  определяли по данным рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования [Zoete, 2007]. Была построена область докинга, включающая следующие ключевые аминокислоты: Phe-282, Cys-285, Gln-286, Ser-289, His-323, Tyr-327, Ile-326, Phe-363, His-449, Leu-453, Leu-469, Tyr-473 (крыло 1 сайта); Ile-249, Leu-255, Glu-259, Phe-264, Ile-281, Gly-284, Val-339, Ile-341, Met-348, Phe-352, Leu-353, Met-364 (крыло 2 сайта); Pro-227, Leu-228, Arg-288, Glu-291, Ala-292, Glu-295, Leu-330, Leu-333, Ser-342, Glu-343 (вход в сайт).

В результате ансамблевого докинга отображены три лучшие модели PPAR- $\gamma$  – 1ZEO [Shi, 2005], 3CDP [Fracchiolla, 2012] и 4PRG [Oberfield, 1999], приведены на рис. 9.12.



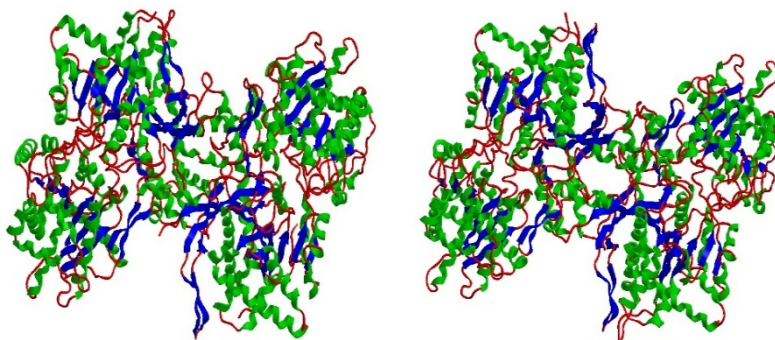
*Рис. 9.12. Валидные модели PPAR- $\gamma$ .*

### 9.8.3. Валидация 3D-моделей гликогенфосфорилазы

Всего для валидации из UniProtKB и PDBе отобрано 18 экспериментальных рентгеноструктурных 3D-моделей комплексов гликогенфосфорилазы, печеночная форма (ГФ) с различными ингибиторами: 1EM6, 1EXV, 1FA9, 1FC0, 1L5Q, 1L5R, 1L5S, 1L7X, 1XOI, 2ATI, 2QLL, 2ZB2, 3CEH, 3CEJ, 3CEM, 3DD1, 3DDS, 3DDW. Из всех моделей перед докингом были удалены низкомолекулярные лиганды.

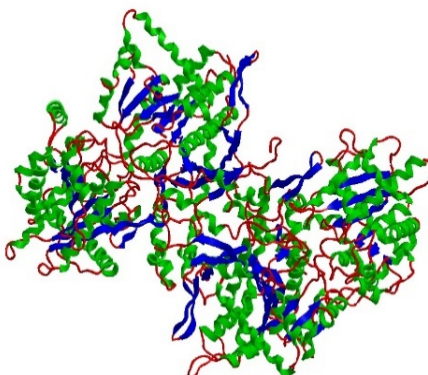
Пространство АМР-связывающего аллостерического сайта ГФ определяли по данным рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования [Rath, 2000b; Kristiansen, 2004; Tiraidis, 2007]. Была построена область докинга, включающая аминокислоты так называемой вилки V, с номерами AA51-AA82 и AA293-AA318. Ограничивающими аминокислотами пространства докинга были выбраны Cys-78, Pro-79, Arg-309, Arg-310.

В результате ансамблевого докинга отобраны три лучшие модели – 1L5S [Ekstrom, 2002], 3DD1 [Thomson, 2009] и 3DDW [Thomson, 2009], приведены на рис. 9.13.



1L5S – димер, 2 сайта

3DD1 – димер, 2 сайта

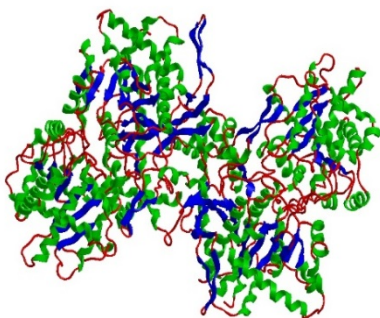


3DDW – димер, 2 сайта

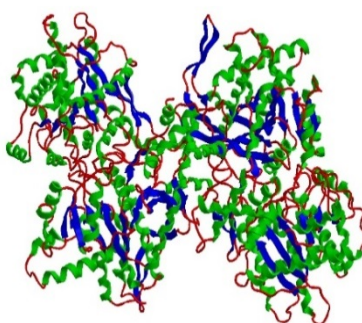
*Рис. 9.13. Валидные модели для АМР-связывающего аллостерического сайта ГФ*

Пространство каталитического сайта ГФ определяли по данным рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования [Rath, 2000b; Oikonomakos, 2006]. Была построена область докинга, включающая следующие аминокислоты так называемой петли 280S: Asn-282, Asn-283, Asn-284, Phe-285, Phe-286, Glu-287.

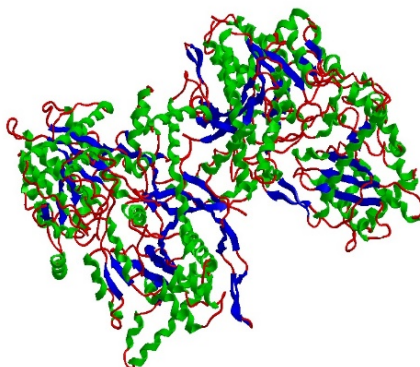
В результате ансамблевого докинга отобраны три лучшие модели – 1EXV [Rath, 2000a], 3СЕН [Anderka, 2008] и 3СЕJ [Anderka, 2008], приведены на рис. 9.14.



1EXV – димер, 2 сайта



3СЕН – димер, 2 сайта



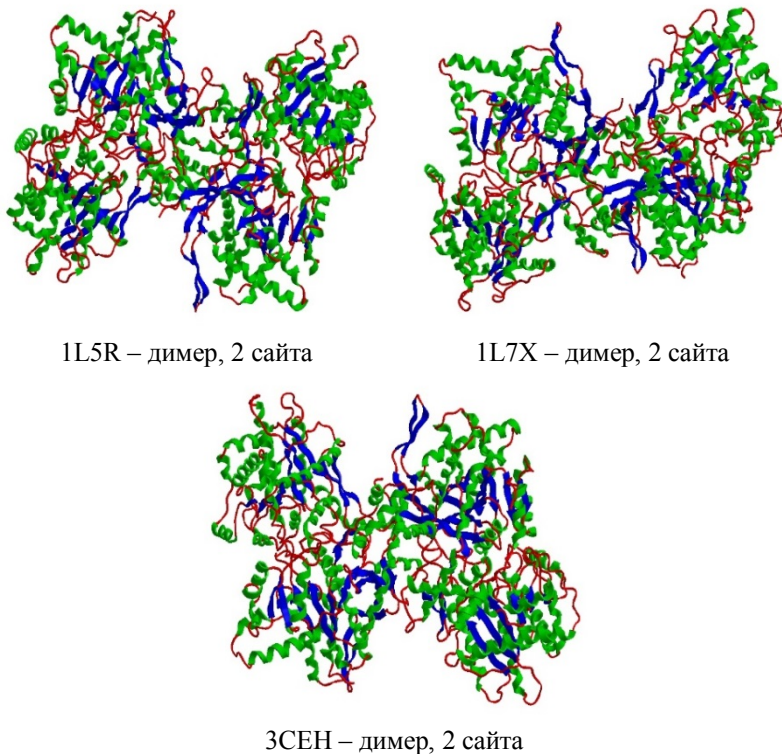
3СЕJ – димер, 2 сайта

*Рис. 9.14. Валидные модели для каталитического сайта ГФ*

Пространство кофеин-связывающего сайта ГФ определяли по данным рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования

[Ekstrom, 2002]. Была построена область докинга, включающая следующие ключевые аминокислоты Phe-285, Tyr-613:

В результате ансамблевого докинга отобраны три лучшие модели – 1L5R [Ekstrom, 2002], 1L7X [Ekstrom, 2002] и 3СЕН [Anderka, 2008], приведены на рис. 9.15.

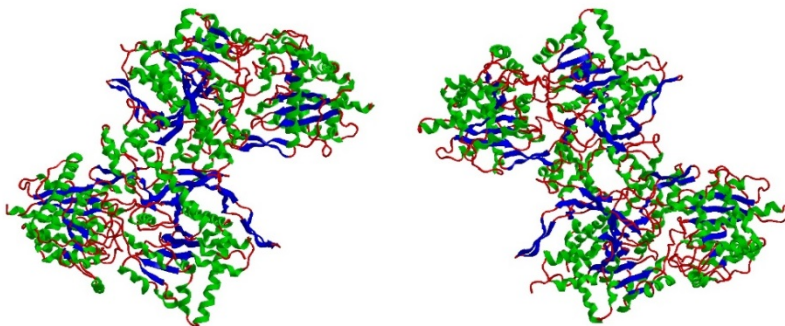


*Рис. 9.15. Валидные модели для кофеин-связывающего сайта ГФ*

Пространство индолкарбоксамидного сайта ГФ определяли по данным рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования [Rath, 2000a]. Была построена область докинга, включающая следующие аминокислоты: Arg-33, His-34, Arg -60, Asp-61.

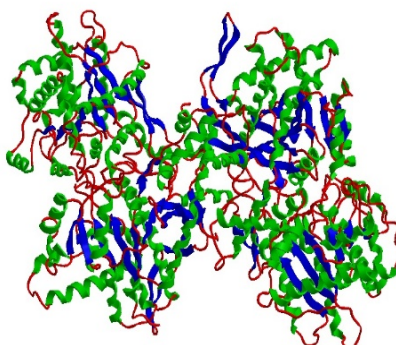
В результате ансамблевого докинга отобраны три лучшие модели – 1ЕМ6 [Rath, 2000a], 2ZB2 [Onda, 2008] и 3СЕН [Anderka, 2008], приведены на рис. 9.16.





1EM6 – димер, 2 сайта

2ZB2 – димер, 2 сайта



3SEN – димер, 2 сайта

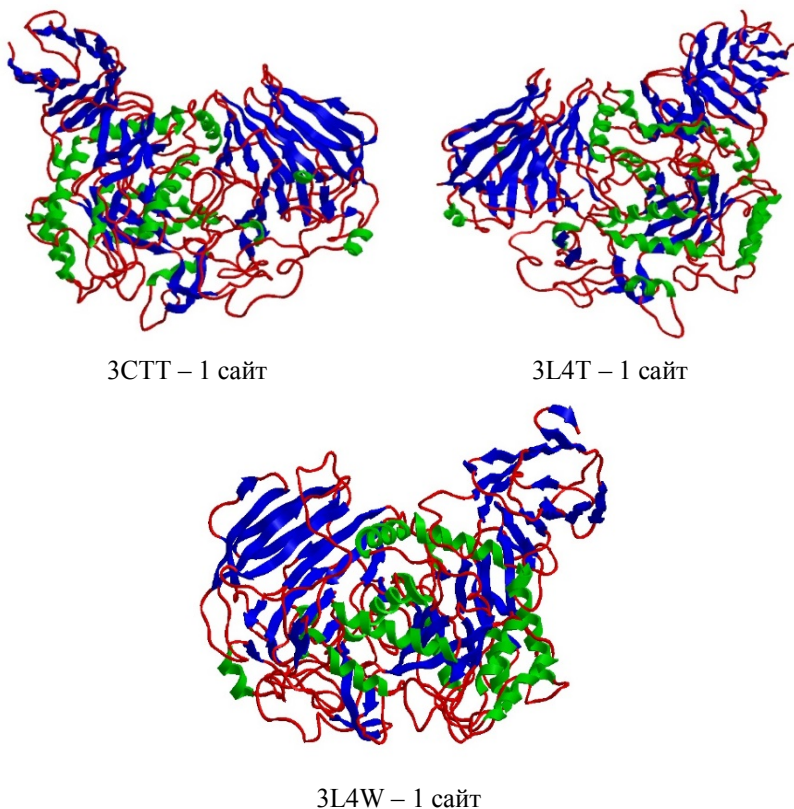
*Рис. 9.16. Валидные модели для индолкарбоксамидного сайта ГФ*

#### **9.8.4. Валидация 3D-моделей альфа-глюкозидазы**

Всего для валидации из UniProtKB и PDBе отобрано 12 экспериментальных рентгеноструктурных 3D-моделей комплексов альфа-глюкозидазы (АГ) с различными ингибиторами: 2QLY, 2QMJ, 3CTT, 3L4T, 3L4U, 3L4V, 3L4W, 3L4X, 3L4Y, 3L4Z, 3TON, 3TOP. Из всех моделей перед докингом были удалены низкомолекулярные лиганды.

Пространство сайта альфа-глюкозидазного домена АГ определяли по данным рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования [Sim, 2008]. Была построена область докинга, включающая следующие ключевые аминокислоты: Asp-203, Asp-327, Asp-443, Arg-526, Asp-542, His-600.

В результате ансамблевого докинга отобраны три лучшие модели – 3СТТ [Cardona, 2009], 3L4Т [Sim, 2010] и 3L4W [Sim, 2010], приведены на рис. 9.17.

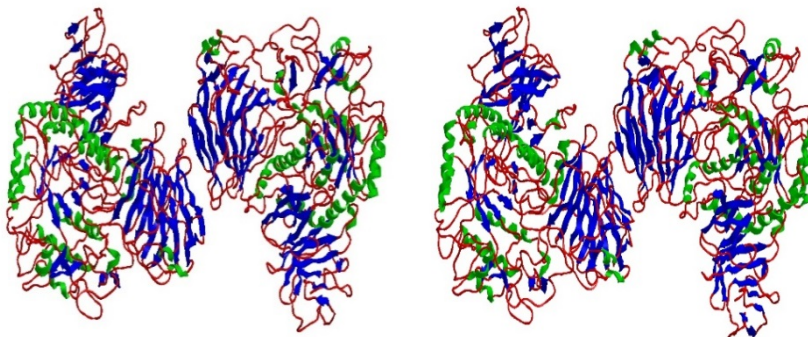


*Рис. 9.17. Валидные модели для сайта альфа-глюкозидазного домена АГ*

Пространство сайта глюкоамилазного домена АГ определяли по данным рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования [Ren, 2011].

Была построена область докинга, включающая следующие ключевые аминокислоты: Asp-1420, Glu-1423, Asp-1526.

В результате ансамблевого докинга отобраны только две лучшие модели – 3ТОН [Ren, 2011] и 3ТОР [Ren, 2011], приведены на рис. 9.18.



ЗТОН – димер, 2 сайта

ЗТОР – димер, 2 сайта

Рис. 9.18. Валидные модели для сайта глюкоамилазного домена АГ

### 9.8.5. Пороговые величины энергии докинга

Для каждого типа биомишени, с учетом сайтов взаимодействия, по формулам (8.1 – 8.3) были рассчитаны показатели,  $\Delta E_{max}$ ,  $\Delta E_{aver}$  и  $\Delta E_{min}$ . Результаты приведены в табл. 9.6.

Таблица 9.6

### Пороговые величины энергии докинга референсных соединений (Ккал/моль)

Мишень	Сайт	$\Delta E_{min}$	$\Delta E_{aver}$	$\Delta E_{max}$
ДПП4	–	-10.06	-8.33	-6.56
PPAR- $\gamma$	–	-12.09	-10.06	-8.51
ГФ	АМФ-связывающий	-11.59	-9.88	-8.82
	Каталитический	-10.13	-8.15	-5.46
	Кофеиновый	-9.76	-9.18	-7.93
	Индолкарбоксамидный	-9.84	-9.36	-8.49
АГ	Глюкозидазный	-9.14	-7.00	-5.32
	Глюкоамилазный	-10.10	-7.77	-5.59

### 9.8.6. Докинг новых химических соединений

Прогноз активности по аффинности новых химических соединений к заданной биомишени также выполняли с помощью ансамблевого докинга в сайты связывания валидных биомишеней, в соответствии с общей технологической схемой докинга (рис. 9.9).

Докинг каждого нового соединения выполняли по три раза в каждый сайт связывания каждой из 3D-моделей трех валидных биомишеней. Оценкой афинности прогнозируемого соединения  $C$  к данной биомишени являлась средняя энергия докинга

$$\Delta E_C = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \frac{1}{S_i} \sum_{j=1}^{S_i} \frac{1}{3} \sum_{k=1}^3 \Delta E_{ijk}, \quad (8.4)$$

где  $\Delta E_{ijk}$  – энергия  $k$ -го докинга в  $j$ -й сайт  $i$ -й модели;

$S_i$  – число сайтов в  $i$ -й модели.

С целью последующего обобщения для соединения  $C$  прогнозных оценок, полученных в трех системах прогноза, значение  $\Delta E_C$  переводили в индекс перспективности:

$$Ind_{3,C} = 3 \text{ if } \Delta E_C \leq \Delta E_{min}, \quad (8.5)$$

$$Ind_{3,C} = 2 \text{ if } \Delta E_{min} < \Delta E_C \leq \Delta E_{aver}, \quad (8.6)$$

$$Ind_{3,C} = 1 \text{ if } \Delta E_{aver} < \Delta E_C \leq \Delta E_{max}, \quad (8.7)$$

$$Ind_{3,C} = 0 \text{ if } \Delta E_C > \Delta E_{max}. \quad (8.8)$$

### 9.9. Консенсусный прогноз активности новых химических соединений

При консенсусном прогнозе обобщались прогнозные оценки активности, полученные в трех системах прогноза: ИТ «Микрокосм», PASS и AutoDock Vina.

По каждому виду активности для каждого прогнозируемого соединения  $C$  по формулам (4.9–4.12), (5.8–5.11) и (8.5–8.8) рассчитывали значения индексов перспективности наличия активности  $Ind_{1,C}$ ,  $Ind_{2,C}$ ,  $Ind_{3,C}$ . По результатам прогноза в системе  $i$  соединение  $C$  считалось активным, если  $Ind_{i,C} > 0$ .

В соответствии с правилами, изложенными выше в разделе 1, по каждому виду активности для каждого соединения  $C$  рассчитывались следующие прогнозные индексы.

1. Ингибиторы ДПП4:

$$Ind_{1,C,DPP-4}, Ind_{2,C,DPP-4}, Ind_{2,C,DPP}, Ind_{3,C,DPP-4}. \quad (9.1)$$

2. Агонисты PPAR- $\gamma$ :

$$Ind_{1,C,PPAR-\gamma}, Ind_{2,C,PPAR-\gamma}, Ind_{2,C,PPAR}, Ind_{3,C,PPAR-\gamma}. \quad (9.2)$$

3. Ингибиторы ГФ (с учетом четырех разных сайтов AMP, Cat, Cof и Ind):

$$\begin{aligned} &Ind_{1,C,PYGL-AMP}, Ind_{1,C,PYGL-Cat}, Ind_{1,C,PYGL-Cof}, Ind_{1,C,PYGL-Ind}, \\ &Ind_{2,C,PYGL}, Ind_{2,C,PYGM}, \\ &Ind_{3,C,PYGL-AMP}, Ind_{3,C,PYGL-Cat}, Ind_{3,C,PYGL-Cof}, Ind_{3,C,PYGL-Ind}. \end{aligned} \quad (9.3)$$

4. Ингибиторы АГ (с учетом двух разных сайтов aGlu и GlAm):

$$\begin{aligned} &Ind_{1,C,MGAM}, \\ &Ind_{2,C,MGAM-aGlu}, Ind_{2,C,MGAM-GlAm}, \\ &Ind_{3,C,MGAM-aGlu}, Ind_{3,C,MGAM-GlAm}. \end{aligned} \quad (9.4)$$

Определим для любого  $Ind_{i,C,Act}$  индикаторную логическую переменную

$$\begin{aligned} \delta_{i,C,Act} &= false \text{ if } Ind_{i,C,Act} = 0; \\ \delta_{i,C,Act} &= true \text{ if } Ind_{i,C,Act} > 0. \end{aligned} \quad (9.5)$$

Тогда, в соответствии с правилами, изложенными выше в разделе 1, по каждому виду активности для каждого соединения  $C$  определяется вид и уровень консенсуса прогнозных оценок – по равенству приведенных ниже логических выражений значению *true*.

1. Ингибиторы ДПП4:

$$\begin{aligned} FC3 &:= \delta_{1,C,DPP-4} \wedge \delta_{2,C,DPP-4} \wedge \delta_{2,C,DPP} \wedge \delta_{3,C,DPP-4}, \\ PKC2 &:= (\delta_{1,C,DPP-4} \wedge \delta_{2,C,DPP-4} \wedge \delta_{3,C,DPP-4}) \mid \neg FC3, \\ PKC1 &:= [(\delta_{1,C,DPP-4} \vee \delta_{2,C,DPP-4}) \wedge \delta_{3,C,DPP-4}] \mid (\neg FC3 \vee \neg PKC2), \\ PC1 &:= (\delta_{1,C,DPP-4} \wedge \delta_{2,C,DPP-4}) \mid (\neg FC3 \vee \neg PKC2 \vee \neg PKC1). \end{aligned} \quad (9.6)$$

2. Агонисты PPAR- $\gamma$ :

$$\begin{aligned} FC3 &:= \delta_{1,C,PPAR-\gamma} \wedge \delta_{2,C,PPAR-\gamma} \wedge \delta_{2,C,PPAR} \wedge \delta_{3,C,PPAR-\gamma}, \\ PKC2 &:= (\delta_{1,C,PPAR-\gamma} \wedge \delta_{2,C,PPAR-\gamma} \wedge \delta_{3,C,PPAR-\gamma}) \mid \neg FC3, \\ PKC1 &:= [(\delta_{1,C,PPAR-\gamma} \vee \delta_{2,C,PPAR-\gamma}) \wedge \delta_{3,C,PPAR-\gamma}] \mid (\neg FC3 \vee \neg PKC2), \\ PC1 &:= (\delta_{1,C,PPAR-\gamma} \wedge \delta_{2,C,PPAR-\gamma}) \mid (\neg FC3 \vee \neg PKC2 \vee \neg PKC1). \end{aligned} \quad (9.7)$$

### 3. Ингибиторы ГФ:

$$\begin{aligned}
 FC2 & := (\delta_{1,C,PYGL-AMP} \vee \delta_{1,C,PYGL-Cat} \vee \delta_{1,C,PYGL-Cof} \vee \delta_{1,C,PYGL-Ind}) \\
 & \quad \wedge (\delta_{2,C,PYGL} \vee \delta_{2,C,PYGM}) \wedge \\
 & \quad (\delta_{3,C,PYGL-AMP} \vee \delta_{3,C,PYGL-Cat} \vee \delta_{3,C,PYGL-Cof} \vee \delta_{3,C,PYGL-Ind}), \\
 PKC1 & := \{[(\delta_{1,C,PYGL-AMP} \vee \delta_{1,C,PYGL-Cat} \vee \delta_{1,C,PYGL-Cof} \vee \delta_{1,C,PYGL-Ind}) \\
 & \quad \vee (\delta_{2,C,PYGL} \vee \delta_{2,C,PYGM})] \wedge \\
 & \quad (\delta_{3,C,PYGL-AMP} \vee \delta_{3,C,PYGL-Cat} \vee \delta_{3,C,PYGL-Cof} \vee \delta_{3,C,PYGL-Ind})\} \\
 & \quad | \neg FC2, \\
 PCI & := [(\delta_{1,C,PYGL-AMP} \vee \delta_{1,C,PYGL-Cat} \vee \delta_{1,C,PYGL-Cof} \vee \delta_{1,C,PYGL-Ind}) \\
 & \quad \vee (\delta_{2,C,PYGL} \vee \delta_{2,C,PYGM})] | (\neg FC2 \vee \neg PKC1).
 \end{aligned} \tag{9.8}$$

### 4. Ингибиторы АГ:

$$\begin{aligned}
 FC2 & := \delta_{1,C,MGAM} \wedge (\delta_{2,C,MGAM-aGlu} \vee \delta_{2,C,MGAM-GLAm}) \\
 & \quad \wedge (\delta_{2,C,MGAM-aGlu} \vee \delta_{2,C,MGAM-GLAm}), \\
 PKC1 & := \{[\delta_{1,C,MGAM} \vee (\delta_{2,C,MGAM-aGlu} \vee \delta_{2,C,MGAM-GLAm})] \\
 & \quad \wedge (\delta_{2,C,MGAM-aGlu} \vee \delta_{2,C,MGAM-GLAm})\} | \neg FC2, \\
 PCI & := [\delta_{1,C,MGAM} \wedge (\delta_{2,C,MGAM-aGlu} \vee \delta_{2,C,MGAM-GLAm})] \\
 & \quad | (\neg FC2 \vee \neg PKC1).
 \end{aligned} \tag{9.9}$$

Принятые в настоящем исследовании обозначения консенсуса:  $FC3$ ,  $FC2$  – полный консенсус третьего или второго уровня, соответственно;  $PKC2$ ,  $PKC1$  – частичный ключевой консенсус второго или первого уровня, соответственно;  $PCI$  – частичный простой консенсус первого уровня;  $SE$  – единичная положительная оценка.

Для всех четырех активностей ключевой вид консенсуса предусматривает обязательное наличие положительной оценки по докингу. Уровень консенсуса равен числу совпадающих оценок (простых или альтернативных) минус единица.

Количественными метриками консенсусного прогноза наличия заданной активности для соединения  $C$  служили средний индекс перспективности  $Ind_{0,C}$  и функция принадлежности к классу активных соединений  $F_{m,C}$ .

$$Ind_{0,C} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \frac{1}{B_i} \sum_{j=1}^{B_i} Ind_{y,C}, \tag{9.10}$$

$$F_{m,C} = \frac{\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^{B_i} Ind_{ij,C} + L_C + 0.01}{3 \cdot \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^{B_i} Ind_{ij,C} + L_C + 0.02}, \quad (9.11)$$

где  $Ind_{ij,C}$  – индекс перспективности наличия активности у соединения

$C$  в соответствии с  $j$ -й оценкой методом  $i$ ;

$B_i$  – число оценок в методе  $i$ ;

$L_C$  – уровень консенсуса прогнозных оценок активности соединения  $C$ ;

0.01, 0.02 – параметры несмещенности.

Примеры консенсусного прогноза различной активности нескольких соединений приведены в табл. 9.7. Общая технологическая схема консенсусного прогноза приведена на рис. 9.19.

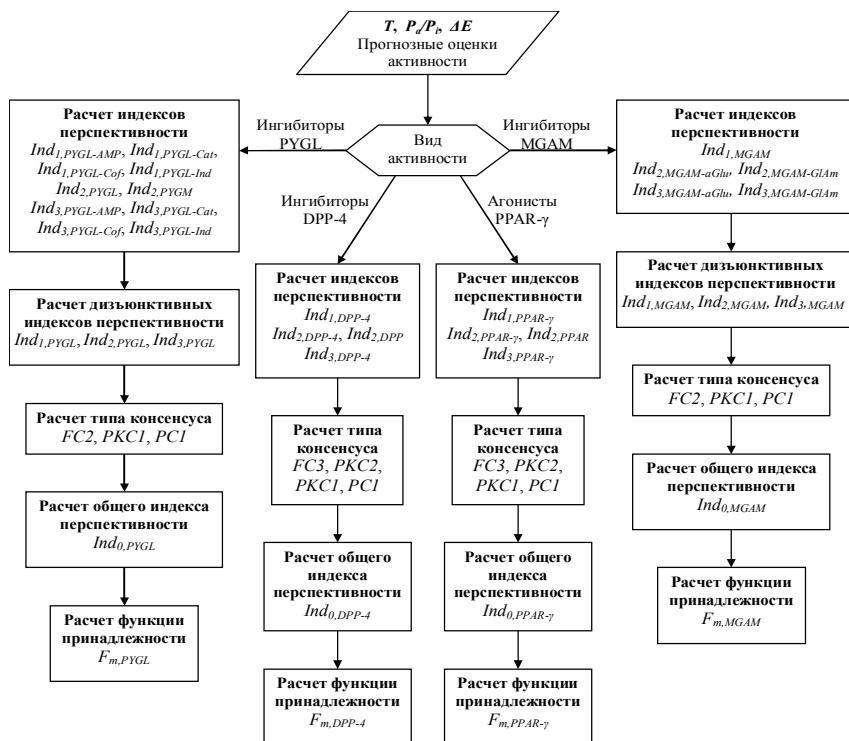


Рис. 9.19. Технологическая схема консенсусного прогноза активности соединений

Таблица 9.7

## Консенсусный прогноз активности некоторых новых химических соединений

Ингибиторы дипептидиллептидазы-4 (ДПП4)													
Шифр	ИТ «Микрокосм»		PASS				AutoDock Vina		Cons	Ind <sub>0</sub>	F <sub>m</sub>		
			ДПП4		DPP		ΔE	Ind					
	T	Ind	P <sub>α</sub> /P <sub>i</sub>	Ind	P <sub>α</sub> /P <sub>i</sub>	Ind	ΔE	Ind					
AB-0016	0.167	1	0.010	0	0.034	0	-7.65	1	PKCI	0.50	0.231		
AB-0020	0.187	1	0.005	0	0.005	0	-7.40	1	PKCI	0.50	0.231		
AB-0067	0.180	1	0.010	0	0.029	0	-7.64	1	PKCI	0.50	0.231		

Агонисты PPAR-γ											
Шифр	ИТ «Микрокосм»		PASS				AutoDock Vina		Cons	Ind <sub>0</sub>	F <sub>m</sub>
			PPAR-γ		PPAR		ΔE	Ind			
	T	Ind	P <sub>α</sub> /P <sub>i</sub>	Ind	P <sub>α</sub> /P <sub>i</sub>	Ind	ΔE	Ind			
TONS-0281	0.201	0	1.06	1	1.46	1	-8.72	1	PKCI	0.75	0.380
TONS-0462	0.192	0	1.92	1	1.11	1	-10.98	2	PKCI	1.00	0.385
TONS-0495	0.186	0	3.14	1	1.53	1	-12.12	3	PKCI	1.25	0.462

Ингибиторы гликогенфосфорилазы (ГФ)																							
Шифр	ИТ «Микрокосм»				PASS				AutoDock Vina						Cons	Ind <sub>0</sub>	F <sub>m</sub>						
	AMPSite		Cat Site		Cof Site		Ind Site		ГФ		PYGM		AMP Site					Cat Site		Cof Site		Ind Site	
	T	Ind	T	Ind	T	Ind	T	Ind	P <sub>α</sub> /P <sub>i</sub>	Ind	P <sub>α</sub> /P <sub>i</sub>	Ind	ΔE	Ind				ΔE	Ind	ΔE	Ind	ΔE	Ind
KNFA-0149	0.197	1	0.164	0	0.148	0	0.223	0	0.002	0	0.023	0	-8.03	0	-8.07	1	-7.43	0	-8.19	0	PKCI	0.20	0.097
KNFA-0156	0.191	1	0.172	0	0.145	0	0.228	0	0.002	0	0.027	0	-7.55	0	-8.16	2	-7.17	0	-8.35	0	PKCI	0.30	0.129
KNFA-0227	0.188	1	0.176	0	0.141	0	0.231	0	0.002	0	0.050	0	-7.08	0	-7.83	1	-7.27	0	-7.59	0	PKCI	0.20	0.097

Ингибиторы α-глюкозидазы (АГ)													
Шифр	ИТ «Микрокосм»		PASS				AutoDock Vina				Cons	Ind <sub>0</sub>	F <sub>m</sub>
			αGlu Site		GlAm Site		αGlu Site		GlAm Site				
	T	Ind	P <sub>α</sub> /P <sub>i</sub>	Ind	P <sub>α</sub> /P <sub>i</sub>	Ind	ΔE	Ind	ΔE	Ind			
DAВ-0004	0.129	1	0.031	0	0.081	0	-7.48	2	-8.38	2	PKCI	1.00	0.375
DAВ-0027	0.117	1	0.045	0	0.054	0	-8.03	2	-9.08	2	PKCI	1.00	0.375
DAВ-0028	0.128	1	0.042	0	0.032	0	-7.94	2	-8.78	2	PKCI	1.00	0.375



Все расчеты выполнены на кафедре фармакологии ВолгГМУ с использованием 64-х ядерного персонального суперкомпьютера гибридной архитектуры производительностью 2.79 Tflops, 24 ядерного вычислительного кластера производительностью 0.23 Tflops, 8 ядерного вычислительного сервера производительностью 0.07 Tflops и двух 6-ядерных рабочих станций общей производительностью 0.32 Tflops.

## Литература

1. Васильев П.М., Кочетков А.Н. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ ИТ «Микрокосм» № 2011618547 от 31.10.2011. – М., Российское агентство по патентам и товарным знакам (Роспатент).
2. Васильев П.М., Спасов А.А. Языки фрагментарного кодирования структуры соединений для компьютерного прогноза биологической активности // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева). – 2006. – Т. 50. – № 2. – С. 108–127.
3. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2015620158. Ингибиторы дипептидилпептидазы-4 / Васильев П.М., Спасов А.А., Чепляева Н.И., Литвинов Р.А. (Россия). – № 2014621771; заявл. 12.12.2014; зарег. 29.01.2015; опубл. 20.02.2015, Официальный бюллетень «Программы для ЭВМ. БД. ТИМС», № 2(100), 2015. – 1 с. – URL: <http://www1.fips.ru/Archive/EVM/2015/2015.02.20/Index.htm>.
4. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2015621313. Ингибиторы гликогенфосфорилазы / Васильев П.М., Спасов А.А., Чепляева Н.И., Яналиева Л.Р., Воробьев Е.С. (Россия). – № 2015620821; заявл. 30.06.2015; зарег. 25.08.2015; опубл. 20.09.2015, Официальный бюллетень «Программы для ЭВМ. БД. ТИМС» [Электронное издание], № 9(107), 2015. – 1 с. – URL: <http://www1.fips.ru/Archive/EVM/2015/2015.09.20/DOC/RUNW/000/002/015/621/313/document.pdf>.
5. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2016620548. Агонисты PPAR-гамма / Васильев П.М., Спасов А.А., Яналиева Л.Р., Ворфоломеева В.В. (Россия). – № 2015621704; заявл. 29.12.2015; зарег. 28.04.2016; опубл. 20.05.2016, Официальный бюллетень «Программы для ЭВМ. БД. ТИМС» [Электронное издание], № 5(115), 2016. – 1 с. – URL: <http://www1.fips.ru/Archive/EVM/2016/2016.05.20/DOC/RUNW/000/002/016/620/548/document.pdf>.
6. Спасов А.А., Иежица И.Н., Васильев П.М., Озеров А.А. Фармакология стереоизомеров лекарственных веществ»: Монография / Под общ. ред. чл.-корр. РАНН А.А.Спасова. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2011. – 348 с.
7. Филимонов Д.А., Поройков В.В. Прогноз спектра биологической активности органических соединений // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). – 2006а. – Т. 50. – № 2. – С. 66-75.

8. Филимонов Д.А., Поройков В.В., Глориозова Т.А., Лагунин А.А. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ PASS № 2006613275 от 15.09.2006б. – М., Российское агентство по патентам и товарным знакам (Роспатент).

9. Agrawal R., Jain P., Dikshit S.N. Ligand-based pharmacophore detection, screening of potential gliptins and docking studies to get effective antidiabetic agents // Comb. Chem. High Throughput Screen. – 2012. – V. 15. – Iss. 10. – P. 849-876.

10. Al-Masri I.M., Mohammad M.K., Taha M.O. Discovery of DPP IV inhibitors by pharmacophore modeling and QSAR analysis followed by *in silico* screening // ChemMedChem. – 2008. – V. 3. – Iss. 11. – P. 1763-1779.

11. Anderka O., Loenze P., Klabunde T. et al. Thermodynamic characterization of allosteric glycogen phosphorylase inhibitors // Biochemistry. – 2008. – V. 47. – P. 4683-4691.

12. AutoDock Vina: Официальный сайт Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute [Электронный ресурс]. URL: <http://vina.scripps.edu> (дата обращения 07.03.2011).

13. Bhatt A., Patel P.D., Patel M.R. et al. CoMSIA study on substituted aryl alkanolic acid analogs as GPR40 agonists // Chem. Biol. Drug Des. – 2011. – V. 77. Iss. 5. – P. 361-372.

14. BindingDB: The Binding Database: Официальный сайт Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California (USA) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (дата обращения 18.09.2014).

15. Boobbyer D.N.A., Goodford P.J., McWhinnie P.M. et al. New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure // J. Med. Chem. – 1989. – V. 32. – Iss. 5. – P. 1083-1094.

16. Cardona F., Parmeggiani C., Faggi E et al. Total syntheses of casuarine and its 6-O-alpha-glucoside: complementary inhibition towards glycoside hydrolases of the GH31 and GH37 families // Chemistry. – 2009. – V. 15. – P. 1627-1636.

17. ChemAxon: Официальный сайт компании ChemAxon Kft. (Hungary) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.chemaxon.com/> (дата обращения 11.12.2014).

18. ChEMBL: Database of Bioactive Drug-like Small Molecules: Официальный сайт European Bioinformatics Institute (UK) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (дата обращения 18.09.2014).

19. Drug Design: Structure- and Ligand-Based Approaches / Ed. K.M. Merz, D. Ringe, C.H. Reynolds. – N.-Y.: Cambridge University Press, 2010. – 274 p.

20. DrugBank: Drug & Target Database: Официальный сайт University of Alberta (Canada) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.drugbank.ca/> (дата обращения 18.09.2014).

21. Ekstrom J.L., Pauly T.A., Carty M.D. et al. Structure-activity analysis of the purine binding site of human liver glycogen phosphorylase // *Chem. Biol.* – 2002. – V. 9. – № 8. – P. 915-924.
22. Fracchiolla G., Laghezza A., Piemontese L. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular investigation of fluorinated peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha/\gamma$  dual agonists // *Bioorg. Med. Chem.* – 2012. V. 20. – P. 2141-2151.
23. Huey R., Morris G.M., Olson A.J. et al. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation // *J. Comput. Chem.* – 2006. – V. 28. – № 6. – P. 1145-1152.
24. IntegritySM: Empowering knowledge-based drug discovery and development: Официальный сайт Thomson Reuters (USA) [Электронный ресурс]. URL: <https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/> (дата обращения 02.05.2012).
25. IUPHAR: International Union of Basic and Clinical Pharmacology: Официальный сайт [Электронный ресурс]. URL: <http://www.iuphar.org/> (дата обращения 18.09.2014).
26. Izenman A.J. Modern Multivariate Statistical Techniques: Regression, Classification, and Manifold Learning / Springer Texts in Statistics / Ed. G. Casella, S. Fienberg, I. Olkin. – N.-Y.: Springer Science + Business Media, LLC, 2008. – 731 p.
27. Kelemen A.A., Kiss R., Ferenczy G.G. et al. Structure-Based Consensus Scoring Scheme for Selecting Class A Aminergic GPCR Fragments // *J. Chem. Inf. Model.* – 2016. – V. 56. – № 2. – P. 412-422.
28. Kristiansen M., Andersen B., Iversen L.F. et al. Identification, synthesis, and characterization of new glycogen phosphorylase inhibitors binding to the allosteric AMP site // *J. Med. Chem.* – 2004. – V. 47. – № 14. – P. 3537-3545
29. Kubinyi H. Similarity and Dissimilarity – A Medicinal Chemist's View // *Perspect. Drug Discov. Des.* – 1998. – V. 9. – № 11. – P. 225-252.
30. Marzo M., Kulkarni S., Manganaro A. et al. Integrating *in silico* models to enhance predictivity for developmental toxicity // *Toxicology.* – 2016. – V. 370. – P. 127-137. doi: 10.1016/j.tox.2016.09.015. Epub 2016 Sep 28.
31. Mehler E.L., Solmajer T. Electrostatic effects in proteins: comparison of dielectric and charge models // *Protein Eng.* – 1991. – V. 4. – Iss. 8. – P. 903-910.
32. MGLTools: Официальный сайт Molecular Graphics Laboratory, the Scripps Research Institute [Электронный ресурс]. URL: <http://mgltools.scripps.edu/> (дата обращения 07.03.2011).
33. MOPAC: Официальный сайт J.J.P. Stewart, Stewart Computational Chemistry [Электронный ресурс]. URL: <http://openmopac.net> (дата обращения 07.03.2015).
34. Morris G.M., Huey R., Lindstrom R. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // *J. Comput. Chem.* – 2009. – V. 30. – Iss. 16. – P. 2785-2791.

35. Murcia-Soler M., Pérez-Giménez F., Nalda-Molina R. et al. QSAR analysis of hypoglycemic agents using the topological indices // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 2001. – V. 41. – Iss. 5. – P. 1345-1354.
36. Nabeno M., Akaoshi F., Kishida H. et al. A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – V. 434. – № 2. – P. 191-196.
37. Oberfield J.L., Collins J.L., Holmes C.P. et al. A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1999. – V. 96. – P. 6102-6106.
38. Oikonomakos N.G., Tiraidis C., Leonidas D.D. et al. Iminosugars as potential inhibitors of glycogenolysis: structural insights into the molecular basis of glycogen phosphorylase inhibition *J. Med. Chem.* – 2006. – V. 49. – № 19. – P. 5687-5701.
39. Onda K., Suzuki T., Shiraki R. et al. Synthesis of 5-chloro-N-aryl-1H-indole-2-carboxamide derivatives as inhibitors of human liver glycogen phosphorylase a // *Bioorg. Med. Chem.* – 2008. – V. 16. – P. 5452-5464.
40. Open Babel: The Open Source Chemistry Toolbox: Официальный сайт [Электронный ресурс]. URL: <http://openbabel.org/> (дата обращения 07.03.2015).
41. PDBE: Protein Data Bank in Europe: Официальный сайт European Molecular Biology Laboratory of European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/> (дата обращения 20.10.2011).
42. PubChem: Официальный сайт National Center for Biotechnology Information (USA) [Электронный ресурс]. URL: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения 18.09.2014).
43. PubMed: Официальный сайт US National Library of Medicine, National Institutes of Health (USA) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (дата обращения 18.09.2014).
44. PyMOL: A molecular visualization system: Официальный сайт Open Source Foundation, Schrodinger [Электронный ресурс]. URL: <https://www.pymol.org>
45. PyRx – Virtual Screening Tool: Официальный сайт SourceForge [Электронный ресурс]. URL: <https://sourceforge.net/projects/pyrx/> (дата обращения 20.09.2011).
46. Rath V.L., Ammirati M., Danley D.E. et al. Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site // *Chem. Biol.* – 2000a. – V. 7. – № 9. – P. 677-682.
47. Rath V.L., Ammirati M., LeMotte P.K. et al. Activation of Human Liver Glycogen Phosphorylase by Alteration of the Secondary Structure and Packing of the Catalytic Core // *Mol. Cell.* – 2000b. – V. 6. – № 1. – P. 139-148.
48. Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications / Ed. T. Puzyn, J. Leszczynski, M.T.D. Cronin / Challenges and Advances in Computational

Chemistry and Physics, Vol. 8. – Dordrecht (Netherlands): Springer Science + Business Media B.V., 2010. – 414 p.

49. Ren L, Qin X, Cao X et al. Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase // *Protein Cell.* – 2011. – V. 2. – № 10. – P. 827-836.

50. Saqib U., Siddiqi M.I. 3D-QSAR studies on triazolopiperazine amide inhibitors of dipeptidyl peptidase-IV as anti-diabetic agents // *SAR QSAR Environ. Res.* – 2009. – V. 20. – Iss. 5-6. – P. 519-535.

51. Sheehan S.M., Mest H.J., Watson B.M. et al. Discovery of non-covalent dipeptidyl peptidase IV inhibitors which induce a conformational change in the active site // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – V. 17. – P. 1765-1768.

52. Shi G.Q., Dropinski J.F., McKeever B.M. et al. Design and synthesis of alpha-aryloxyphenylacetic acid derivatives: a novel class of PPAR $\alpha$ / $\gamma$  dual agonists with potent antihyperglycemic and lipid modulating activity // *J. Med. Chem.* – 2005. – V. 48. – P. 4457-4468.

53. Sim L., Jayakanthan K., Mohan S. et al. New glucosidase inhibitors from an ayurvedic herbal treatment for type 2 diabetes: structures and inhibition of human intestinal maltase-glucoamylase with compounds from *Salacia reticulata* // *Biochemistry.* – 2010. – V. 49. – P. 443-4451.

54. Sim L., Quezada-Calvillo R., Sterchi E.E. et al. Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity // *J. Mol. Biol.* – 2008. – V. 375. – № 3. – P. 782-792.

55. Stouten P.F.W., Frommel C., Nakamura H. et al. An Effective Solvation Term Based on Atomic Occupancies for Use in Protein Simulations // *Mol. Simul.* – 1993. – V. 10. No. 2. – P. 97-120.

56. Taha M.O., Habash M., Al-Hadidi Z. et al. Docking-based comparative intermolecular contacts analysis as new 3-D QSAR concept for validating docking studies and *in silico* screening: NMT and GP inhibitors as case studies // *J. Chem. Inf. Model.* – 2011. – V. 51. – Iss. 3. – P. 647-669.

57. Tao L., Zhang P., Qin C. et al. Recent progresses in the exploration of machine learning methods as in-silico ADME prediction tools // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2015. – V. 86. – P. 83-100.

58. Thomson S.A., Banker P., Bickett D.M. et al. Anthranilimide based glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. Part 3: X-ray crystallographic characterization, core and urea optimization and *in vivo* efficacy // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – V. 19. – P. 1177-1182.

59. Tiraidis C., Alexacou K.M., Zographos S.E. et al. FR258900, a potential antihyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase // *Protein Sci.* – 2007. – V. 16. – № 8. – P. 1773-1782

60. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading // *J. Comp. Chem.* – 2010. – V. 31. – Iss. 2. – P. 455-461.

61. UniProtKB: Universal Protein Knowledgebase: Официальный сайт UniProt Consortium of European Bioinformatics Institute (EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) and the Protein Information Resource (PIR) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.uniprot.org/> (дата обращения 23.09.2011).

62. Vassiliev P. M., Spasov A. A., Kosolapov V. A., et al. Consensus Drug Design Using IT Microcosm // *Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine* / Eds. L. Gorb, V. Kuz'min, E. Muratov / *Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics* / Ed. J. Leszczynski. – Vol. 17. – Dordrecht (Netherlands): Springer Science + Business Media, 2014. – 550 p. – P. 369-431.

63. Vassiliev P.M., Breslaukhov A.G. Hierarchical language for description of structures of bioactive compounds // *Second World Congress of Theoretical Organic Chemists: Abstracts* (University of Toronto, Canada, 8-14 July 1990). – Toronto, 1990. – AA-38.

64. Viira B., Gendron T., Lanfranchi D. et al. *In Silico* Mining for Antimalarial Structure-Activity Knowledge and Discovery of Novel Antimalarial Curcuminoids // *Molecules.* – 2016. – V. 21. – № 7. – Pii. E853.

65. VMD – Visual Molecular Dynamics: Официальный сайт Theoretical and Computational Biophysics Group, University of Illinois [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/> (дата обращения 20.09.2011).

66. Wallace M.B., Feng J., Zhang Z. et al. Structure-based design and synthesis of benzimidazole derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – V. 18. – P. 2362-2367.

67. Weiner S.J., Kollman P.A., Case D.A. et al. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins // *J. Am. Chem. Soc.* – 1984. – V. 106. – № 3. – P. 765-784.

68. Zhang Z., Wallace M.B., Feng J. et al. Design and synthesis of pyrimidinone and pyrimidinedione inhibitors of dipeptidyl peptidase IV // *J. Med. Chem.* – 2011. – V. 54. P. 510-524.

69. Zoete V., Grosdidier A., Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – V. 1771. – № 8. – P. 915-925.

## **10. Направленный поиск и изучение антидиабетической активности новых соединений**

Результаты проведенного консенсусного прогноза позволили сформировать фокусированные библиотеки соединений, обладающих вероятной активностью относительно биологических мишеней, важных для терапии сахарного диабета 2 типа: дипептидилпептидазы типа 4 (ДПП4), гликогенфосфорилазы (ГФ),  $\alpha$ -глюкозидазы (АГ), рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом (PPAR $\gamma$ ). При анализе результатов прогноза *in silico* с целью отбора соединений для последующего синтеза учитывался не только спектр прогнозных оценок, но синтетическая доступность веществ, ожидаемая термодинамическая стабильность и предполагаемая растворимость в воде.

### **10.1. Поиск ингибиторов дипептидилпептидазы типа 4**

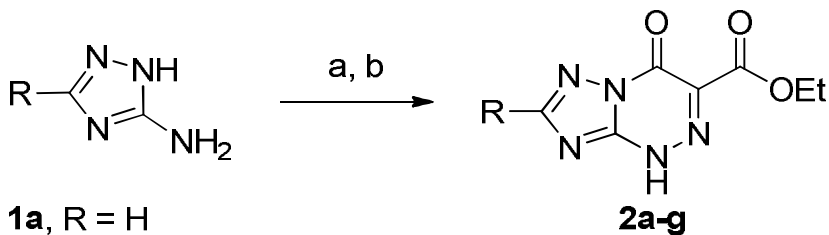
В соответствии с результатами выполненного прогноза, описанного в Гл. 9, были выбраны соединения для экспериментальной проверки влияния на дипептидилпептидазу типа 4 и осуществлен синтез новых соединений.

#### **10.1.1. Синтез производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазина**

*В. Л. Русинов, И. М. Сапожникова,  
А. М. Близник, О. Н. Чупахин, В. Н. Чарушин*

Наиболее удобным способом получения азоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов является аннелирование триазинового кольца путем диазотирования легкодоступных аминоазолов с последующей конденсацией с СН-активными соединениями [Rusinov и др., 2008]. Аминотриазолы 1a-г и аминопиразолы 3a-с, были использованы в качестве исходных аминоазолов, в то время как диэтилмалонат, этиловый эфир нитроацетата и цианоацетат – в качестве СН-активных компонентов. Диазотирование аминотриазолов 1a-г и аминопиразолов 3a-с осуществлялось в среде соляной кислоты;

взаимодействие с диэтилмалонатом или этилнитроацетатом и последующая циклизация – в 2 М водном растворе карбоната натрия (Схема 10.1).



- 1a**, R = H  
**1b**, R = Me  
**1c**, R = SMe  
**1d**, R = SEt  
**1e**, R = SPr  
**1f**, R = Si-Pr  
**1g**, R = COOEt

Схема 10.1. Синтез азоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов 2а-г:  
 а).  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{HCl}$ ; б).  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , диэтилмалонат

Были получены производные, содержащие в положении 3 цианогруппу. Ее можно рассматривать как фармакофорный фрагмент, так как ингибитор ДПП4 вилдаглиптин содержит цианогруппу в своей структуре [Fleming и др., 2010]. С другой стороны, высокая реакционная способность цианогруппы позволяет использовать ее для различных структурных модификаций.

Однако, попытки получить пиразоло[1,2,4]триазинов, несущие цианогруппу в положении 3, с использованием метода, описанного выше, не увенчались успехом. Причина заключается в том, что гидразоны, полученные сочетанием соответствующих солей диазония с этилцианоацетатом, способны давать продукты циклизации как с участием циано, так и этоксикарбонильной группы, таким образом, давая смесь продуктов [Gray и др., 1976].

Использование 3 М водного раствора ацетата натрия на стадии сочетания позволило изолировать промежуточные гидразоны 6а,б. Циклизация 6а,б гладко протекает в кипящем пиридине с образованием 3-циано-пиразолотриазинов 7а,б (Схема 10.2).



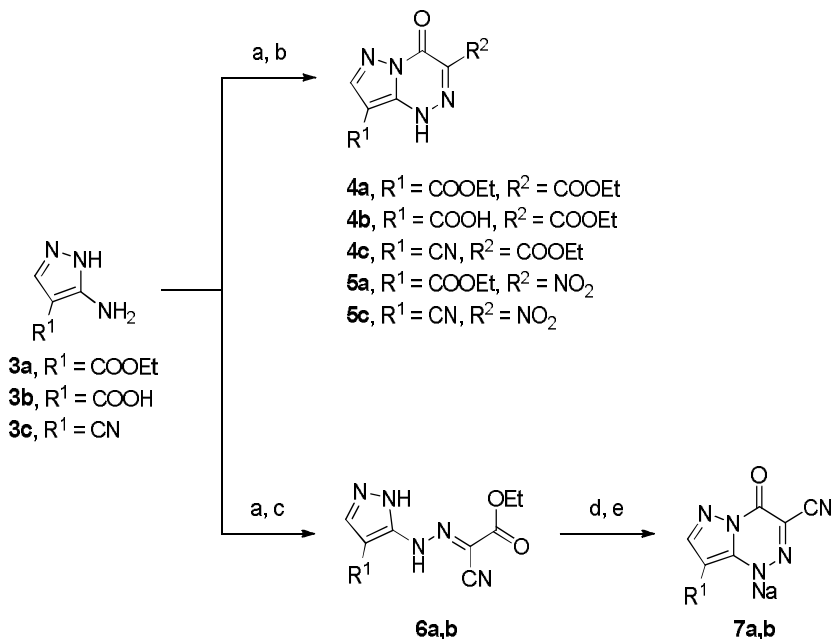


Схема 10.2. Синтез пиразолотриазинов: а) NaNO<sub>2</sub>, HCl; б) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, диэтилмалонат или этилнитроацетат; в) AcONa, этилцианоацетат; д) пиридин; е) NaOH

Гидролиз 4а позволил получить пиразолотриазин 8, содержащий две карбоксильные группы (Схема 10.3). 3-Аминопроизводное 9, синтезированное восстановлением нитрогруппы 5а, характеризуется существенно меньшей N<sup>1</sup>H-кислотностью вследствие положительного индуктивного эффекта аминогруппы и образуется в виде основания (Схема 10.4).

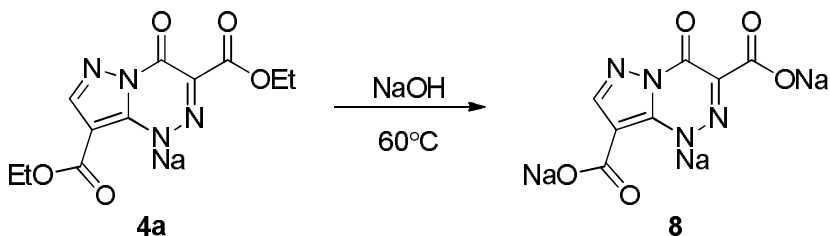


Схема 10.3. Синтез пиразолотриазина 8

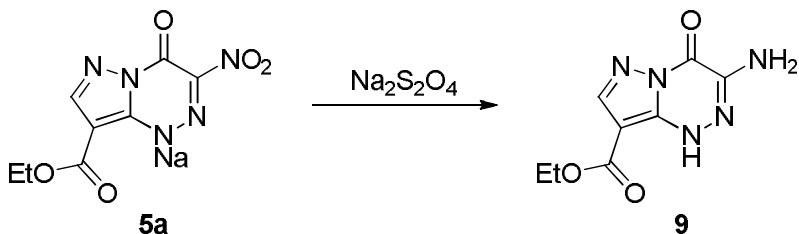


Схема 10.4. Синтез пиразолотриазина 9

Нитрилы способны взаимодействовать как с нуклеофилами, так и с электрофилами. Благодаря этому, взаимодействие с гидроксиламином по механизму нуклеофильного присоединения позволило получить амидоксимы 10a,b и 12. Атака нуклеофильного атома азота цианогруппы 7a,b на трет-бутильный карбокатион привела к амидам 11a,b (Схема 10.5).

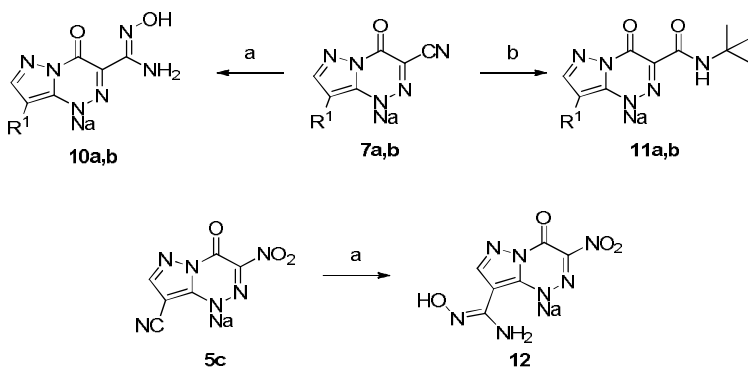


Схема 10.5. Синтез пиразолотриaziнов 11a,b и 12:  
 а)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ; б)  $\text{tert-BuOH}$ ,  $\text{TFA}$

### 10.1.2. Влияние производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазина на активность дипептидилпептидазы типа 4 (ДПП4)

А. А. Спасов, Д. А. Бабков, А. С. Таран, Т. Ю. Прохорова, Е. А. Стурова

Для оценки ингибиторной активности соединений в отношении дипептидилпептидазы типа 4 вносили 40 мкл плазмы крови в 50 мкл 0,1 М Трис-НСl буферного раствора (рН 8,0). В полученную смесь добавляли 10 мкл раствора исследуемого вещества заданной концентрации в Трис-

буферном растворе и преинкубировали при 37°C в течение 5 мин. Затем вносили в реакционную смесь 100 мкл 1 мМ раствора субстрата дипептидилпептидазы-4 Гли-Про-п-нитроанилида (Sigma, США). Инкубировали при 37°C в течение 15 мин и регистрировали образование п-нитроанилина по величине оптической плотности при длине волны 405 нм [Matheeußen и др., 2012], используя микропланшетный ридер Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). В качестве положительного контроля использовали вилдаглиптин (Sigma, США) [Pi-Sunyer и др., 2007].

На первом этапе скрининга вещества изучались в конечной концентрации 0,1 мкМ. Из 23 исследованных соединений большинство не проявляет активности, однако 5 веществ демонстрируют некоторые ингибиторные свойства, а еще 4 обладают выраженной ДПП4-ингибирующей активностью (Таблица 10.1).

Анализ взаимосвязи «структура-активность» позволил выявить ряд структурных элементов, ответственных за проявление ДПП4-ингибирующих свойств. Производные триазолотриазина оказались полностью неактивными. Исследованные производные пиразолотриазина различались между собой природой заместителей в положениях 3 и 8 гетероциклического ядра. Полученные данные убедительно показывают, что 3- или 8-этоксикарбонилзамещенные производные лишены активности, за исключением соединения 4b, ингибирующего ДПП4 на 39,7% в концентрации 0,1 мМ.

В свою очередь, введение в положение 3 небольших полярных заместителей оказывает благоприятное влияние на уровень активности. Так, соединения, содержащие 3-амино- (9b) и 3-нитрогруппу (5a-c, 11) являются наиболее активными.

Сходная закономерность прослеживается для радикалов в положении 8. Активность возрастает в ряду заместителей следующим образом: –C(O)OEt (5a) < –CN (5c)  $\approx$  –COOH (9b)  $\approx$  –C(NH<sub>2</sub>)=NOH (11). Таким образом, благодаря наличию полярных заместителей в структуре указанных веществ они явились наиболее активными в исследованной серии и были выбраны для углубленного изучения.

Изучение концентрационной зависимости показало, что характер ингибирования ДПП4 соединениями-лидерами носит дозозависимый эффект (Рис. 10.1). Были получены изотермы ингибирования и рассчитаны величины IC<sub>50</sub>, которые составили: 0,62 мМ для 5a, 63,56 мкМ для 5c, 61,32 мкМ 9b и 61,09 мкМ для соединения 12.

Таблица 10.1

## ДПП4-ингибирующая активность

Соед.	Лаб. шифр	Ингибирование в конц. 100 мкМ, %	IC50, мкМ
2a	IS-0215	-11,25 ± 3,23	
2b	IS-0221	-7,97 ± 10,25	
2c	MNR-0858	6,26 ± 6,68	
2d	IS-0218	-10,72 ± 13,37	
2e	IS-0219	-7,47 ± 9,84	
2f	IS-0223	3,01 ± 1,48	
2g	IS-0256	-1,9 ± 0,63	
4a	AB-0019	4,06 ± 6,13	
4b	AB-0058	39,68 ± 3,63*	
4c	AB-0015	-2,07 ± 1,95	
5a	AB-0020	87,77 ± 10,47*	620
5c	AB-0016	59,27 ± 5,79*	63,56
7a	AB-0021	0,95 ± 5,45	
7b	AB-0051	34,96 ± 0,17*	
8	AB-0041	6,75 ± 1,43	
9	AB-0046	-27,64 ± 10,91	
10a	AB-0045	-44,03 ± 10,78	
10b	AB-0053	31,3 ± 2,33*	
11a	IS-0255	27,22 ± 3,3*	
11b	AB-0059	37,19 ± 1,04*	
12	AB-0067	84,15 ± 5,25*	61,09
Дипротин А		96,68 ± 1,33*	17,31

\*  $p < 0,05$  (U-тест Манна-Уитни).

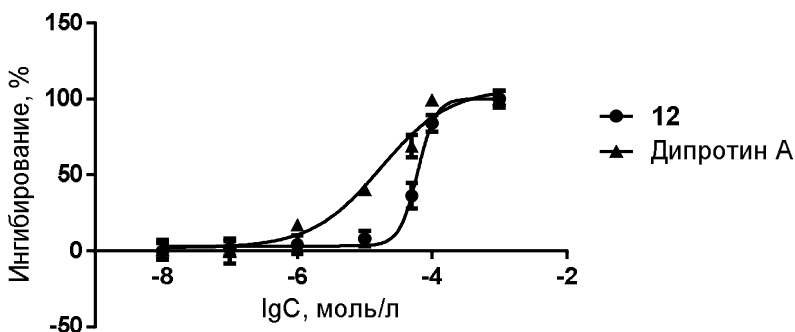


Рис. 10.1. Концентрационно-зависимое ингибирование дипептидилпептидазы 4 плазмы крови человека, определенное *in vitro*, для наиболее активного соединения 12 и препарата сравнения дипротина А

Отдельно следует отметить соединения 11a и 11b, содержащие 3-трет-бутилкарбамоильный заместитель. В концентрации 0,1 мМ они ингибировали пептидазную активность ДПП4 на 27% и 37%, соответственно, несмотря на наличие в положении 8 «неблагоприятного» этоксикарбонильного радикала. Возможным объяснением проявления активности данными производными могут служить пептидомиметические свойства амидного фрагмента и возможность формирования гидрофобных взаимодействий с аминокислотами центра связывания ДПП4, предоставляемая трет-бутильным фрагментом. Аналогичные структурные особенности описаны для высокоэффективных ингибиторов ДПП4 ряда [4,3-а]пиразино[1,2,4]триазолов [Kim и др., 2005].

В тоже время, полученные данные не позволяют однозначно говорить о предпочтительности пиразолотриазинового ядра над триазолотриазининовым. В частности, описан ряд активных и селективных ингибиторов ДПП4, являющихся производными пиразоло- и имидазолотриазининов [Feng и др., 2006]. Это свидетельствует о том, что положение атомов азота в пятичленном цикле не является детерминантой ингибирующей активности.

## **10.2. Выявление ингибиторов гликогенфосфорилазы**

В результате проведения консенсусного прогноза, описанного в Гл. 9, отобран ряд соединений для изучения влияния на гликогенфосфорилазу, а также синтезированы новые соединения.

### **10.2.1. Синтез тиетановых производных 2-бромимидазол-4,5-дикарбоновой кислоты**

*Ф. А. Халиуллин, А. Р. Валиева*

Диметилловый 2-бром-1-(тиетани-3-ил)-1H-имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты (14) синтезируют путем алкилирования диметил 2-бром-1H-имидазол-4,5-дикарбоксилата (13) с 2-хлорметилтиираном в водной среде в присутствии гидроксида калия, что сопровождается тииран-тиетановой перегруппировкой (Схема 10.6).

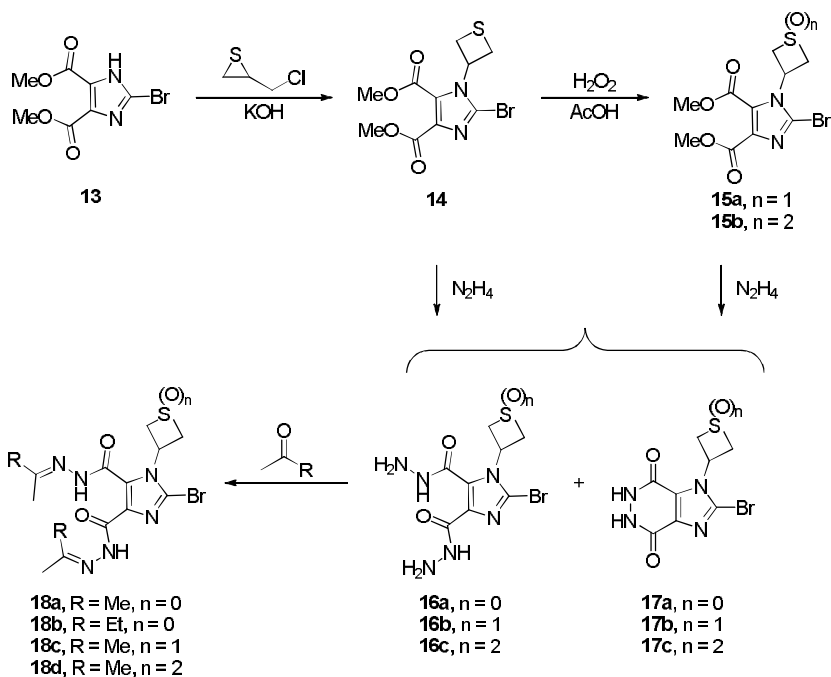


Схема 10.6. Схема тиетановых производных 2-бромимидазол-4,5-дикарбоновой кислоты

Окисление эфира 14 2 эквивалентами пероксида водорода в ледяной уксусной кислоте ведет к сульфоксиду 15а, в то время как использование 5 эквивалентов – к сульфону 15с с выходами 80% и 85%, соответственно. Дигидразиды 2-бром-1-(тиетанил-3)-, 2-бром-1-(1-оксотиеганил-3)-, 2-бром-1-(1,1-диоксотиеганил-3)имидазол-4,5-дикарбоновых кислот (16а-с) и 1-тиета-нилзамещенные 2-бромимидазо[4,5-д]пиридазин-4,7(5Н,6Н)-дионы (17а-с) получены гидразинолизом соответствующих диметилowych эфиров 14 и 15а,б по методикам, описанным в работе [Khaliullin, Valieva, Magadeeva, 2015]. Реакциями конденсации дигидразидов 2-бромимидазол-4,5-дикарбоновых кислот 16а-с с ацетоном и метилэтилкетонам синтезированы ди(метилэтилиденгидразиды) 2-бром-1-(тиетанил-3)-, 2-бром-1-(1-оксотиеганил-3)-, 2-бром-1-(1,1-диоксотиеганил-3)имидазол-4,5-дикарбоновых кислот (18а,с,д) и ди(этилэтилиденгидразид) 2-бром-1-(тиетанил-3)имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты 18б.

## 10.2.2. Влияние тиетановых производных 2-бромимидазол-4,5-дикарбоновой кислоты на активность гликогенфосфорилазы (ГФ)

*А. А. Спасов, Н. И. Чепляева, Д. А. Бабков, Е. С. Воробьев*

Для оценки ингибиторной активности соединений в отношении гликогенфосфорилазы 100 мкл 50 мМ HEPES буферного раствора (рН 7.2), содержащего 100 мМ KCl, 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ глюкозо-1-фосфата (Sigma #G6875, США) и 1 мг/мл гликогена, инкубировали с 0,2 ЕД/мл мышечной гликогенфосфорилазы кролика (Sigma #P1261, США) и 5 мкл раствора исследуемого вещества заданной концентрации при 30°C в течение 30 минут. Затем вносили в реакционную смесь 150 мкл раствора, содержащего 1.05 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> и 0.034% малахитового зеленого. Определяли количество высвобожденного фосфат-аниона через 20 мин при 30°C по величине оптической плотности при длине волны 620 нм [Hess, Derr, 1975], используя микропланшетный ридер Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). В качестве положительного контроля использовали экспериментальный ингибитор гликогенфосфорилазы CP-316819 (Sigma #PZ0189, США) [Suh и др., 2007].

Экспериментальное изучение синтезированных веществ показало, что ряд из них проявляет статистически значимые ингибирующие свойства относительно гликогенфосфорилазы. Дигидразиды 16a,b и 18c и имидазо[4,5-d]пиридазин-4,7(5H,6H)-дион 17b показали невысокую активность (22-38% ингибирование). Наиболее выраженные ингибиторные свойства отмечены для сульфонового дигидразида 16c (51%). Однако, и он существенно уступает препарату сравнения CP-316819 (Таблица 10.2).

*Таблица 10.2*

### ГФ-ингибирующая активность

Соед.	Лаб. шифр	Ингибирование в конц. 100 мкМ, %
16a	КНФА-0227	25,08 ± 4,72*
16b	КНФА-0147	21,82 ± 3,33*
16c	КНФА-0156	51,48 ± 5,30*
17a	КНФА-0228	-94,16 ± 0,31*
17b	КНФА-0148	21,85 ± 4,82*
17c	КНФА-0157	1,08 ± 7,95
18a	КНФА-0229	-183,52 ± 8,46*
18b	КНФА-0230	7,94 ± 4,25
18c	КНФА-0149	37,68 ± 2,16*
18d	КНФА-0158	-8,41 ± 7,56
CP-316819		91,63 ± 5,28*

### 10.3. Поиск ингибиторов $\alpha$ -глюкозидазы

Проведение консенсусного прогноза вероятности наличия ингибирующей активности относительно  $\alpha$ -глюкозидазы (Гл. 9) позволило отобрать ряд производных для осуществления синтеза и последующей экспериментальной проверки.

#### 10.3.1. Синтез производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазола

*А. С. Морковник, Т. А. Кузьменко, Л. Н. Диваева,  
Ю. В. Кошценко, В. А. Анисимова, М. В. Богославцева*

Исходными соединениями для получения целевых производных послужили diaзепинобензимидазолы, которые были синтезированы в несколько стадий по методике, описанной в работе [Anisimova и др., 2007]. Для этого бензимидазол-2-сульфокислоты (19a,b) [Dannhardt, Kohl, 2000] вводили в реакцию с 4-аминобутан-1-олом, образующийся при этом аминоспирты под действием тионилхлорида превращали в хлорбутиламинопроизводные 20a,b, которые в кипящем уксусном ангидриде циклизуются в 1-ацетилдiazеинобензимидазолы (Схема 10.7). Последние в результате кислотного гидролиза переходят в соединения 21a,b.

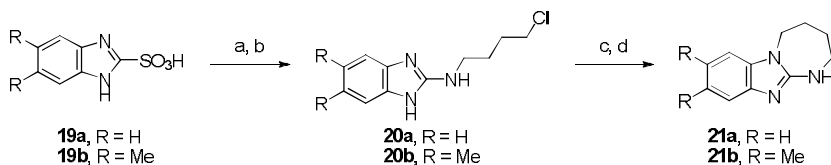


Схема 10.7. Синтез diaзепинобензимидазолов 21a,b:

a)  $NH_2(CH_2)_4OH$ ; b)  $SOCl_2$ ; c)  $Ac_2O$ ; d)  $H^+$ ,  $\Delta$

Синтез конечных соединений заключался в алкилировании 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазолов 21 разнообразными алкил- и бензилхлоридами или бромидами (Схема 10.8) [Morkovnik и др., 2015].





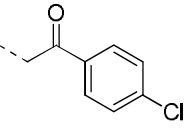
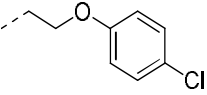
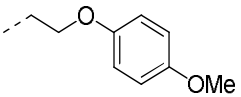
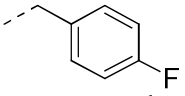
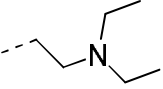
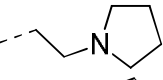
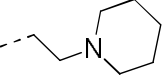
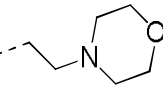
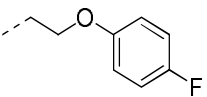
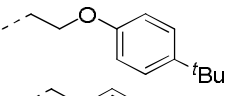
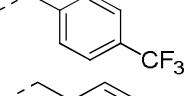
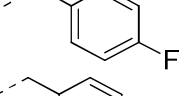
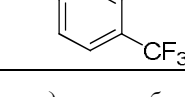
Соед.	R	R <sub>1</sub>	X
22a	H		Br
22b	H		Cl
22c	H		Br
22d	H		Cl
22e	H		Cl
22f	H		Cl
22g	H		Cl
22h	H		Cl
22i	H		Cl
22j	H		Br
22k	H		Cl
22l	Me		Cl
22m	Me		Cl

Схема 10.8. Синтез замещенных диазепинобензимидазолов

**10.3.2. Влияние производных  
2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazепино[1,2-а]бензимидазола  
на активность  $\alpha$ -глюкозидазы (АГ)**

*А. А. Спасов, Н. И. Чепляева, Д. А. Бабков, Д. А. Алешин*

Для оценки ингибиторной активности соединений в отношении  $\alpha$ -глюкозидазы преинкубировали исследуемые вещества в заданной концентрации в 50 мкл 0,1 М фосфатного буферного раствора (рН 6,8) с 25 мкл 5 мМ раствора субстрата – 4-нитрофенил- $\alpha$ -D-глюкопиранозида – при 37°C в течение 5 минут. Затем вносили 25 мкл раствора  $\alpha$ -глюкозидазы (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США), полученного растворением 1 мг фермента в 100 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора (рН 6,8), содержащего 200 мг бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Определяли прирост оптической плотности при длине волны 400 нм [Elyu и др., 2012], используя микропланшетный ридер Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). В качестве положительного контроля использовали акарбозу (Sigma, США) [Fujisawa и др., 2005].

Представленные в Табл. 10.3 данные свидетельствуют о наличии у представленных соединений выраженной ингибирующей активности относительно  $\alpha$ -глюкозидазы. Так у соединений под лабораторными шифрами DAB-4, DAB-27, DAB-28, DAB-28 наблюдалось значительное снижение активности при уменьшении концентрации, однако по величине  $IC_{50}$  они превосходили препарат сравнения, акарбозу (Рис. 10.2). Наиболее активным соединением было DAB-26 которое в 1,6 раза эффективнее, чем акарбоза блокировало  $\alpha$ -глюкозидазу.

*Таблица 10.3*

**АГ-ингибирующая активность**

Соед.	Лаб. шифр	Ингибирование в конц. 1 мМ, %	$IC_{50}$ , мкМ
22a	DAB-0004	77,87 $\pm$ 4,72*	780
22b	DAB-0013	13,01 $\pm$ 1,08	
22c	DAB-0014	9,01 $\pm$ 3,75	
22d	DAB-0015	0,27 $\pm$ 3,09	
22e	DAB-0020	-3,25 $\pm$ 3,41	
22f	DAB-0021	-6,21 $\pm$ 2,18	
22g	DAB-0022	-1,26 $\pm$ 2,48	
22h	DAB-0023	-0,69 $\pm$ 2,84	
22i	DAB-0025	17,11 $\pm$ 2,32	
22j	DAB-0026	72,07 $\pm$ 1,21*	620

Окончание табл. 10.3

Соед.	Лаб. шифр	Ингибирование в конц. 1 мМ, %	IC <sub>50</sub> , мкМ
22k	DAB-0027	84,71 ± 1,32*	820
22l	DAB-0028	74,24 ± 2,16*	810
22m	DAB-0029	67,36 ± 6,39*	800
Акарбоза		48,91 ± 3,44*	1000

\*  $p < 0,05$  (U-тест Манна-Уитни).

На основании проведенных исследований достоверно показано, что вновь синтезированные производные тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола превосходили по активности препарат сравнения (акарбозу).

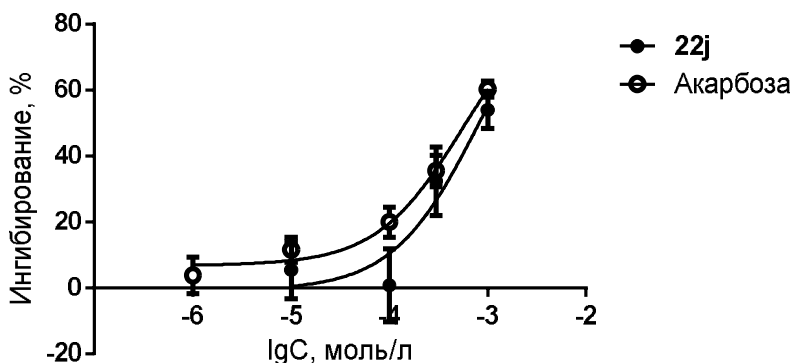


Рис. 10.2. Концентрационно-зависимое ингибирование  $\alpha$ -глюкозидазы, определенное *in vitro*, для наиболее активного соединения 22j и препарата сравнения акарбозы

#### 10.4. Выявление агонистов рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом

Исходя из результатов компьютерного прогноза, описанного в Гл. 9, были отобраны соединения для экспериментальной проверки агонистической активности относительно рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом типа  $\gamma$  и осуществлен синтез новых соединений.



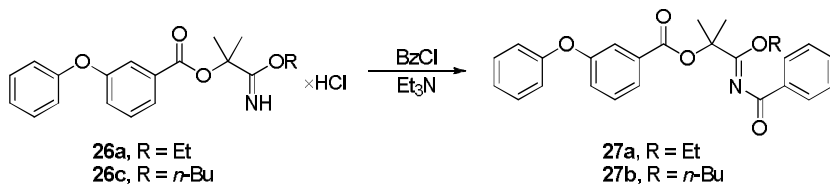


Схема 10.11. Синтез *N*-(бензоил) имидатов

Для получения эфиров *N*-замещенной 3-феноксифенил-карбоксоимидовой кислоты **31a-d** было осуществлено последовательное гидрохлорирование 3-феноксibenзонитрила (**28**) в условиях реакции Пиннера и ацилирование полученных гидрохлоридов имидатов **30a-d** хлорангидридами карбоновых кислот в соответствии со Схемой 10.12.

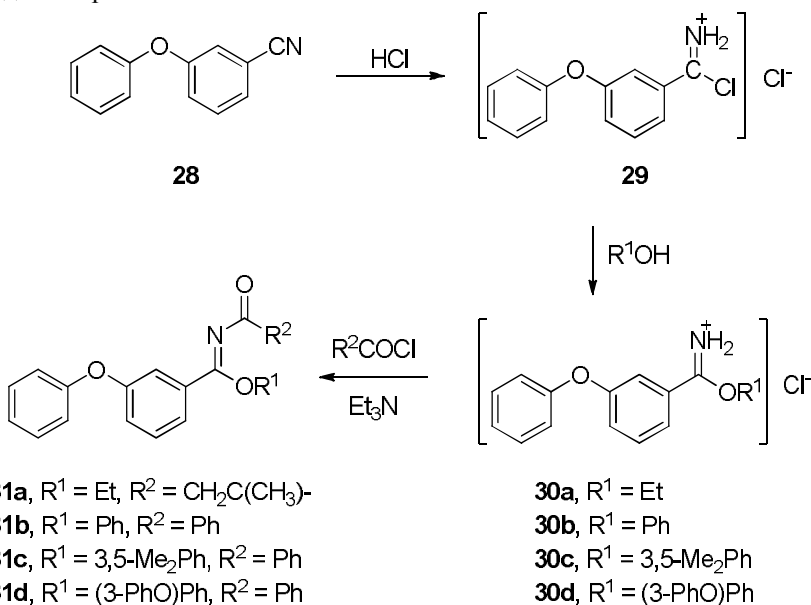


Схема 10.12. Синтез *N*-ацилированных имидатов

В качестве акцептора хлористого водорода использовали триэтиламин. Реакции проводили при мольном соотношении реагентов и двукратном избытке триэтиламина в среде абсолютного 1,4-диоксана при температуре 60–65 °С в течение 2 часов. Данные реакции протекают селективно, с хорошими выходами – 80–96%.

#### 10.4.2. Влияние 2-цианопропил(3-фенокси)бензоата и его производных на активность PPAR $\gamma$

*А. А. Спасов, Д. А. Бабков*

Агонистический эффект соединений изучался Serop Panlabs на клеточной культуре NIH 3T3 в сравнении с контрольной реакцией известного агониста PPAR $\gamma$  пиоглитазона [Dogmandy и др., 2005] в концентрации 10 мкМ [Yang, Rachez, Freedman, 2000].

Как показывают результаты экспериментальной проверки синтезированных соединений, 2-метил-2-(3-феноксибензоат)пропионитрил (25b) является активатором PPAR $\gamma$ , уступая препарату сравнения пиоглитазону (Табл. 10.4). Остальные производные не проявили активности. Это позволяет говорить о необходимости двух ключевых фрагментов, определяющих данный вид активности – феноксибензольного фрагмента и алифатической нитрильной группы.

*Таблица 10.4*

<b>PPAR<math>\gamma</math>-агонистическая активность</b>		
Соед.	Лаб. шифр	Активация PPAR $\gamma$ в конц. 10 мкМ, %
25a	TONS-0281-11	0,5
25b	TONS-0281	44,6
26a	TONS-0281-1	0,3
26b	TONS-0281-12	0,6
27a	TONS-0281-2	-0,1
27b	TONS-0281-10	0,1
31a	TONS-0281-9	-0,1
31b	TONS-0462	0,6
31c	TONS-0336	0,2
31d	TONS-0495	0,9
Пиоглитазон		68,9

## 10.5. Оценка результатов экспериментальной проверки консенсусного прогноза противодиабетической активности новых соединений

*П. М. Васильев, А. А. Спасов,  
В. В. Ворфоломеева, Л. Р. Яналиева*

### 10.5.1. Общая схема анализа точности прогноза

При анализе результатов прогноза *in silico* с целью выбора соединений для последующего синтеза учитывался спектр прогнозных оценок, синтезируемость соединений (возможность осуществления реакции, выход и т.п.), его возможная термодинамическая стабильность, предполагаемая растворимость в воде.

При сопоставлении данных консенсусного прогноза *in silico* и результатов экспериментального тестирования всех видов активности новых химических соединений рассчитывали оценки точности прогноза наличия активности, а затем, в случае достаточной вариабельности прогнозных показателей, выполняли их ROC-анализ.

Соединение считалось активным, если в данном экспериментальном тесте его фармакологический эффект превышал 20%. ROC-анализ проводили по стандартной методике [DeLong, DeLong, Clarke-Pearson, 1988].

### 10.5.2. Ингибиторы дипептидилпептидазы-4

Сопоставление экспериментальных данных и прогнозных оценок ингибирующей дипептидилпептидазу-4 (ДПП4) активности новых соединений приведено в табл. 10.5.

Все 21 изученных соединения характеризуются наличием консенсуса РКС1 и имеют одинаковые значения прогнозных метрик  $Ind_1$ ,  $Ind_2$ ,  $Ind_3$ ,  $Ind_0$ ,  $F_m$ . Следовательно, точность консенсусного поиска *in silico* активных соединений (чувствительность, sensitivity) составила  $F_a = 38.1\%$ . Неактивные по прогнозу соединения в данной серии экспериментов не испытывались.

ROC-анализ провести в данном случае не представляется возможным в связи с отсутствием вариабельности прогнозных показателей.

Таблица 10.5

**Экспериментальные и прогнозные оценки ДПП4 ингибирующей активности новых соединений**

Шифр	$\Delta(10^{-4})$ , %	Act	$Ind_1$	$Ind_2$	$Ind_3$	Cons	$Ind_0$	$F_m$
AB-0015	-2.07	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0016	59.27	1	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0019	4.06	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0020	87.77	1	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0021	0.95	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0041	6.75	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0045	-44.03	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0046	-27.64	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0051	34.96	1	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0053	31.30	1	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0058	39.68	1	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
7AB-0059	37.19	1	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
AB-0067	84.15	1	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
IS-0215	-11.25	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
IS-0218	-10.72	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
IS-0219	-7.47	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
IS-0221	-7.97	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
IS-0223	3.01	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
IS-0255	27.22	1	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
IS-0256	-1.90	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231
MNR-0858	6.26	0	1	0	1	PCK1	0.50	0.231

Примечание:  $\Delta(10^{-4})$ , % – ингибирующая активность в концентрации вещества  $10^{-4}$  M; Act – экспериментальный индекс наличия активности (1 – активно, 0 – неактивно);  $Ind_{1,2,3}$  – индексы перспективности наличия активности по данным прогноза в ИТ «Микрокосм», PASS и AutoDock Vina, соответственно; Cons – тип консенсуса;  $Ind_0$  – общий индекс перспективности наличия активности;  $F_m$  – функция принадлежности к классу активных соединений; PCK1 – частичный ключевой консенсус первого уровня.

### 10.5.3. Ингибиторы гликогенфосфорилазы

Сопоставление экспериментальных данных и прогнозных оценок ингибирующей гликогенфосфорилазу, печеночная форма (ГФ) активности новых соединений приведено в табл. 10.6. По данным прогноза в ИТ «Микрокосм» все соединения активны только в отношении АМР-связывающего сайта, а по данным докинга только в отношении каталитического сайта, поэтому для этих систем прогноза в таблице приводятся две оценки  $Ind_{1AMP}$  и  $Ind_{3cat}$ .



Таблица 10.6

**Экспериментальные и прогнозные оценки ГФ ингибирующей активности новых соединений**

Шифр	$\Delta(10^{-4}), \%$	Act	$Ind_{1AMP}$	$Ind_2$	$Ind_{3Cat}$	Cons	$Ind_0$	$F_m$
КНФА-0147	21.82	1	1	0	1	РСК1	0.20	0.097
КНФА-0148	21.85	1	1	0	1	РСК1	0.20	0.097
КНФА-0149	37.68	1	1	0	1	РСК1	0.20	0.097
КНФА-0156	51.48	1	1	0	2	РСК1	0.30	0.129
КНФА-0157	1.08	0	1	0	1	РСК1	0.20	0.097
КНФА-0158	-8.41	0	1	0	1	РСК1	0.20	0.097
КНФА-0227	25.08	1	1	0	1	РСК1	0.20	0.097
КНФА-0228	-94.16	0	1	0	1	РСК1	0.20	0.097
КНФА-0229	-183.52	0	1	0	1	РСК1	0.20	0.097
КНФА-0230	7.94	0	1	0	1	РСК1	0.20	0.097

*Примечание:*  $\Delta(10^{-4}), \%$  – ингибирующая активность в концентрации вещества  $10^{-4}$  M; Act – экспериментальный индекс наличия активности (1 – активно, 0 – неактивно);  $Ind_{1AMP}$  – индекс перспективности наличия активности по данным прогноза в ИТ «Микрокосм» для AMP-связывающего сайта;  $Ind_2$  – индекс перспективности наличия активности по данным прогноза в PASS;  $Ind_{3Cat}$  – индекс перспективности наличия активности по данным прогноза в AutoDock Vina для каталитического сайта; Cons – тип консенсуса;  $Ind_0$  – общий индекс перспективности наличия активности;  $F_m$  – функция принадлежности к классу активных соединений; РСК1 – частичный ключевой консенсус первого уровня.

Все 10 изученных соединения характеризуются наличием консенсуса РСК1 и имеют практически одинаковые значения прогнозных метрик  $Ind_{1AMP}$ ,  $Ind_2$ ,  $Ind_{3Cat}$ ,  $Ind_0$ ,  $F_m$ . Следовательно, точность консенсусного поиска *in silico* активных соединений (чувствительность, sensitivity) составила  $F_a = 50.0 \%$ . Неактивные по прогнозу соединения в данной серии экспериментов не испытывались.

Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее активное соединение КНФА-0156 имеет более высокий индекс перспективности по докингу  $Ind_{3Cat}$  и, соответственно, несколько более высокие значения  $Ind_0$  и  $F_m$ .

ROC-анализ провести в данном случае не представляется возможным в связи с отсутствием вариабельности прогнозных показателей.

### 10.5.4. Ингибиторы $\alpha$ -глюкозидазы

Сопоставление экспериментальных данных и прогнозных оценок ингибирующей  $\alpha$ -глюкозидазу (АГ) активности новых соединений приведено в табл. 10.7.

Таблица 10.7

#### Экспериментальные и прогнозные оценки АГ ингибирующей активности новых соединений

Шифр	$\Delta(10^{-3}), \%$	Act	$Ind_1$	$Ind_{2\alpha Glu}$	$Ind_{2GLAm}$	$Ind_{3\alpha Glu}$	$Ind_{3GLAm}$	Cons	$Ind_0$	$F_m$
DAB-0004	77.87	1	1	0	0	2	2	PKC1	1.00	0.375
DAB-0013	13.01	0	1	0	0	2	2	PKC1	1.00	0.375
DAB-0014	9.01	0	1	0	0	2	2	PKC1	1.00	0.375
DAB-0015	0.27	0	1	0	0	2	2	PKC1	1.00	0.375
DAB-0020	-3.25	0	0	0	0	1	1	SE	0.40	0.134
DAB-0021	-6.21	0	0	0	0	1	1	SE	0.40	0.134
DAB-0022	-1.26	0	0	0	0	2	2	SE	0.80	0.267
DAB-0023	-0.69	0	1	0	0	1	1	PKC1	0.60	0.250
DAB-0025	17.11	0	1	0	0	2	2	PKC1	1.00	0.375
DAB-0026	72.07	1	1	0	0	2	2	PKC1	1.00	0.375
DAB-0027	84.71	1	1	0	0	2	2	PKC1	1.00	0.375
DAB-0028	74.24	1	1	0	0	2	2	PKC1	1.00	0.375
DAB-0029	67.36	1	1	0	0	2	2	PKC1	1.00	0.375

Примечание:  $\Delta(10^{-3}), \%$  – ингибирующая активность в концентрации вещества  $10^{-3}$  M; Act – экспериментальный индекс наличия активности (1 – активно, 0 – неактивно);  $Ind_1$  – индекс перспективности наличия активности по данным прогноза в ИТ «Микрокосм»;  $Ind_{2\alpha Glu}$   $_{2GLAm}$  – индекс перспективности наличия активности по данным прогноза в PASS, для  $\alpha$ -глюкозидазного и глюкоамилазного сайтов, соответственно;  $Ind_{3\alpha Glu}$   $_{3GLAm}$  – индекс перспективности наличия активности по данным прогноза в AutoDock Vina, для  $\alpha$ -глюкозидазного и глюко-

амилазного сайтов, соответственно;  $Cons$  – тип консенсуса;  $Ind_0$  – общий индекс перспективности наличия активности;  $F_m$  – функция принадлежности к классу активных соединений;  $PKC1$  – частичный ключевой консенсус первого уровня;  $SE$  – единичная положительна оценка.

Из 13 изученных соединений, в соответствии с наличием консенсуса, должны быть активными 10, а неактивными три. Таким образом, точность консенсусного поиска *in silico* активных соединений (чувствительность, *sensitivity*) составила  $F_a = 50\%$ , а точность прогноза неактивных соединений (специфичность, *specificity*) равна  $F_n = 100\%$ .

На рис. 10.3 приведены данные сравнительного ROC-анализа прогностической способности показателей  $Ind_1$ ,  $Ind_{3aGlu}$ ,  $Ind_{3GIAm}$ ,  $Ind_0$ ,  $F_m$ .

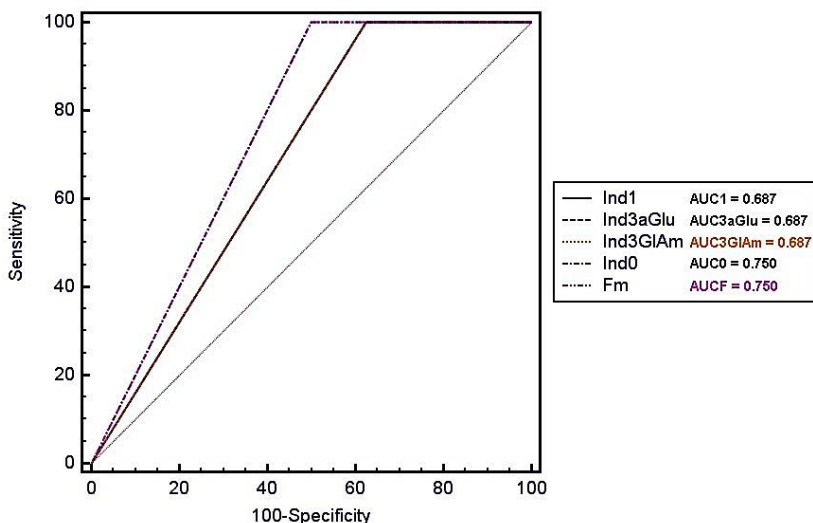


Рис. 10.3. ROC-анализ прогностической способности метрик наличия АГ ингибирующей активности

Видно, что использование консенсусных метрик  $Ind_0$  или  $F_m$  улучшает качество прогноза.

### 10.5.5. Агонисты рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом, подтип $\gamma$

Сопоставление экспериментальных данных и прогнозных оценок активности новых соединений в отношении рецепторов, активируемых пролифератами пероксисом, подтип гамма (PPAR $\gamma$ ) приведено в табл. 10.8.

Таблица 10.8

#### Экспериментальные и прогнозные оценки PPAR $\gamma$ агонистической активности новых соединений

Шифр	$\Delta(10^{-5}), \%$	Act	$Ind_1$	$Ind_2$	$Ind_3$	Cons	$Ind_0$	$F_m$
TONS-0281	44.60	1	0	1	1	PKC1	0.75	0.308
TONS-0281-01	0.30	0	0	1	2	PKC1	0.75	0.308
TONS-0281-02	-0.10	0	0	1	0	SE	0.50	0.084
TONS-0281-09	-0.10	0	0	1	2	PKC1	0.75	0.308
TONS-0281-10	0.10	0	1	1	0	PC1	0.75	0.250
TONS-0281-11	0.50	0	0	0	2	SE	0.25	0.042
TONS-0281-12	0.60	0	0	1	1	PKC1	0.75	0.308
TONS-0336	0.20	0	0	1	2	PKC1	1.00	0.385
TONS-0462	0.60	0	0	1	2	PKC1	1.00	0.385
TONS-0495	0.90	0	0	1	3	PKC1	1.25	0.462

Примечание:  $\Delta(10^{-5}), \%$  – агонистическая активность в концентрации вещества  $10^{-5} M$ ; Act – экспериментальный индекс наличия активности (1 – активно, 0 – неактивно);  $Ind_{1,2,3}$  – индексы перспективности наличия активности по данным прогноза в ИТ «Микрокосм», PASS и AutoDock Vina, соответственно; Cons – тип консенсуса;  $Ind_0$  – общий индекс перспективности наличия активности;  $F_m$  – функция принадлежности к классу активных соединений; PKC1 – частичный ключевой консенсус первого уровня; PC1 – частичный простой консенсус первого уровня; SE – единичная положительная оценка.

Из 10 изученных соединений, в соответствии с наличием консенсуса, должны быть активными восемь, а неактивными два. Таким образом, точность консенсусного поиска *in silico* активных соединений (чувствительность, sensitivity) составила  $F_a = 12.5 \%$ , а точность прогноза неактивных соединений (специфичность, specificity) равна  $F_n = 100 \%$ .

На рис. 10.4 приведены данные сравнительного ROC-анализа прогностической способности показателей  $Ind_1$ ,  $Ind_2$ ,  $Ind_3$ ,  $Ind_0$ ,  $F_m$ .

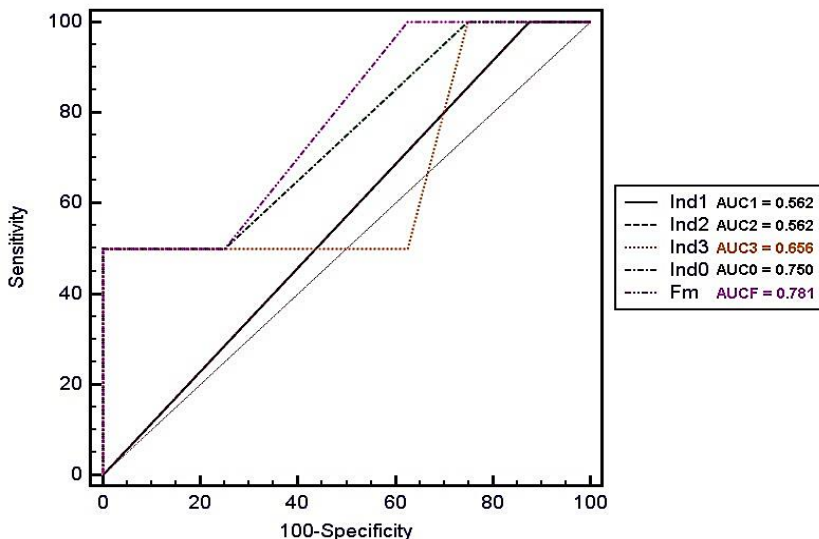


Рис. 10.4. ROC-анализ прогностической способности метрик наличия PPAR-γ агонистической активности

Видно, что использование консенсусных метрик, особенно функции принадлежности  $F_m$ , существенно улучшает качество прогноза.

## 10.6. Направленный поиск противодиабетических веществ с мультитаргетным действием

*П. М. Васильев, А. А. Спасов, Д. А. Бабков,  
В. В. Ворфоломеева, Л. Р. Яналиева*

В настоящее время поиск соединений, обладающих несколькими видами фармакологической активности, является весьма актуальным, так как позволяет создавать препараты с повышенным уровнем клинического эффекта и меньшим побочным действием, в сравнении с монотаргетными веществами [Lera de, Ganesan, 2016].

Для соединений, не испытанных на ингибирование ДПП4, но показавших достаточно высокую активность в отношении других биомолекул

ней, был выполнен прогноз *in silico* ДПП4 ингибирующих свойств с использованием описанного выше консенсусного подхода. Для экспериментального изучения отобраны вещества, имеющие ключевой или полный консенсус прогнозных оценок. Результаты прогноза и последующего экспериментального тестирования приведены в табл. 1.

Таблица 10.9

**Прогнозные оценки и экспериментальные значения ДПП4  
ингибирующей активности соединений  
с другой высокой активностью**

Шифр	Основная биомишень	Прогноз			Эксперимент	
		$\Delta$ , %	Cons	$Ind_0$	$F_m$	$\Delta(10^{-4})$ , %
KHFA-0149	PYGL	37.68	PKC1	0.50	0.231	49.03 ± 5.11
KHFA-0156	PYGL	51.48	PKC1	0.50	0.231	43.79 ± 7.92
DAB-0004	MGAM	77.87	PKC2	1.00	0.429	50.19 ± 12.47
DAB-0026	MGAM	72.07	PKC1	0.75	0.308	31.96 ± 10.12
DAB-0027	MGAM	84.71	FC3	1.25	0.533	36.53 ± 7.51
DAB-0028	MGAM	74.24	FC3	1.25	0.533	20.36 ± 7.67
TONS-0281	PPAR- $\gamma$	44.6	PKC1	0.50	0.231	30.56 ± 8.31

*Примечание:*  $\Delta$ ,% – активность вещества в концентрации  $10^{-4}$  M (PYGL, MGAM) и  $10^{-5}$  M (PPAR- $\gamma$ ); Cons – тип консенсуса;  $Ind_0$  – общий индекс перспективности наличия активности;  $F_m$  – функция принадлежности к классу активных соединений;  $\Delta(10^{-4})$ ,% – ДПП4 ингибирующая активность в концентрации вещества  $10^{-4}$  M; PKC1 – частичный ключевой консенсус первого уровня; PKC2 – частичный ключевой консенсус второго уровня; FC3 – полный консенсус третьего уровня.

Из семи изученных соединений шесть показали достаточно высокую ДПП4 ингибирующую активность  $\Delta(10^{-4}) > 20$  %. Следовательно, точность консенсусного поиска *in silico* противодиабетических соединений с двойной активностью составила 85,7 %.

Таким образом, использование консенсусной методологии прогноза позволяет проводить направленный поиск мультитаргетных противодиабетических соединений. Вещество DAB-0004, обладающее достаточно высокой MGAM ингибирующей и ДПП4 ингибирующей активностями может быть использовано как скаффолд для направленного конструирования новых структур с более высокой двойной активностью.

## Литература

1. Дедов, Шестакова. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика. Москва: ООО «Издательство "Медицинское информационное агентство"», 2011. 808 с.

2. Anisimova V.A. и др. Synthesis of 1(11)H-2,3,4,5-tetrahydro[1,3] diazepino[1,2-a]benzimidazole starting from benzimidazole-2-sulfonic acid. Intramolecular cyclization of 2-( $\delta$ -chlorobutylamino)benzimidazole // Russ. Chem. Bull. 2007. Т. 56. № 11. С. 2315–2322.

3. Borges de Melo E., Silveira Gomes A. da, Carvalho I.  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity // Tetrahedron. 2006. Т. 62. № 44. С. 10277–10302.

4. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A L.M. STOP-NIDDM Trial Research Group Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial // JAMA. 2003. Т. 290.

5. Dannhardt G., Kohl B.K. Benzimidazoles as NMDA Glycine-Site Antagonists: Study on the Structural Requirements in 2-Position of the Ligand // Arch. Pharm. (Weinheim). 2000. Т. 333. № 5. С. 123–129.

6. DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a non-parametric approach. // Biometrics. 1988. Т. 44. № 3. С. 837–85.

7. Derosa G. M.P.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice // Arch Med Sci. 2012. С. 899–906.

8. Dormandy J.A. и др. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial // Lancet. 2005. Т. 366. № 9493. С. 1279–1289.

9. Elya B. и др. Screening of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity from Some Plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae // J. Biomed. Biotechnol. 2012. Т. 2012. С. 1–6.

10. Feng J. и др. Dipeptidyl peptidase inhibitors // 2006.

11. Fleming F.F. и др. Nitrile-Containing Pharmaceuticals: Efficacious Roles of the Nitrile Pharmacophore // J. Med. Chem. 2010. Т. 53. № 22. С. 7902–7917.

12. Floris Alexander van de Laar. Alfa-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes // Vasc. Heal. Risk Manag. 2008. С. 1189–1195.

13. Fujisawa T. и др. Effect of two  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms // *Metabolism*. 2005. Т. 54. № 3. С. 387–390.

14. Gray E.J. и др. Cyclisation reactions of azolyhydrazones derived from ethyl cyanoacetate and malononitrile. Formation of azolo[5,1-c][1,2,4] triazines // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 1976. № 14. С. 1496.

15. Hess H.H., Derr J.E. Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1–5 nanomole range // *Anal. Biochem.* 1975. Т. 63. № 2. С. 607–613.

16. Kamiyama O. и др. In vitro inhibition of alpha-glucosidases and glycogen phosphorylase by catechin gallates in green tea // *Food Chem.* 2010. Т. 122. № 4. С. 1061–1066.

17. Khaliullin F.A., Valieva A.R., Magadeeva G.F. Hydrazinolysis of dimethyl 2-bromo-1-(thietan-3-yl)-1H-imidazole-4,5-dicarboxylates // *Russ. J. Org. Chem.* 2015. Т. 51. № 1. С. 91–94.

18. Kim D. и др. (2 R )-4-Oxo-4-[3-(Trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3- a ]pyrazin- 7(8 H )-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: A Potent, Orally Active Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes // *J. Med. Chem.* 2005. Т. 48. № 1. С. 141–151.

19. Lera A.R. de, Ganesan A. Epigenetic polypharmacology: from combination therapy to multitargeted drugs // *Clin. Epigenetics*. 2016. Т. 8. № 1. С. 105.

20. Matheussen V. и др. Method comparison of dipeptidyl peptidase IV activity assays and their application in biological samples containing reversible inhibitors // *Clin. Chim. Acta*. 2012. Т. 413. № 3–4. С. 456–462.

21. Moritoh Y., Takeuchi K., Hazama M. Combination treatment with alogliptin and voglibose increases active GLP-1 circulation, prevents the development of diabetes and preserves pancreatic  $\beta$ -cells in prediabetic db/db mice // *Diabetes, Obes. Metab.* 2010. Т. 12. № 3. С. 224–233.

22. Morkovnik A.S. и др. Prototropic equilibrium in 1(11)H-2, 3, 4, 5-tetrahydro[1, 3]diazepino[1, 2-a]benzimidazole, synthesis and pharmacological properties of its N-substituted derivatives // *Russ. Chem. Bull.* 2015. Т. 64. № 11. С. 2622–2631.

23. Pi-Sunyer F.X. и др. Efficacy and tolerability of vildagliptin monotherapy in drug-naïve patients with type 2 diabetes // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2007. Т. 76. № 1. С. 132–138.



24. Rusinov V.L. и др. Azolo[5,1-c]-1,2,4-triazines as a new class of antiviral compounds // Russ. Chem. Bull. 2008. Т. 57. № 5. С. 985–1014.

25. Seifarth C. и др. Prolonged and enhanced secretion of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) after oral sucrose due to alfa-glucosidase inhibition (acarbose) in type 2 diabetes patients // Diabet. Med. 1998. Т. 15. № 6. С. 485–491.

26. Suh S.W. и др. Astrocyte Glycogen Sustains Neuronal Activity during Hypoglycemia: Studies with the Glycogen Phosphorylase Inhibitor CP-316,819 ([R-R\*,S\*]-5-Chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide) // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007. Т. 321. № 1. С. 45–50.

27. Yang W., Rachez C., Freedman L.P. Discrete Roles for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Retinoid X Receptor in Recruiting Nuclear Receptor Coactivators // Biol. Mol. Cell. 2000. Т. 20. № 2. С. 8008–8017.

## **11. Анализ механизмов связывания наиболее активных соединений с сайтами биомишеней**

*П. М. Васильев, А. А. Спасов, Д. А. Бабков*

С целью выработки рекомендаций для направленного синтеза новых высоко активных соединений был проведен анализ механизмов взаимодействия с сайтами связывания биомишеней наиболее активных веществ, из числа экспериментально изученных. Анализ выполняли с помощью программ LigPlot<sup>+</sup> 1.4.5 [Laskowski, 2011] и LigandScout 4.1 Advanced [inte:ligand, 2016].

### **11.1. Ингибиторы дипептидилпептидазы-4**

Для наиболее активного соединения АВ-0020 с помощью программы LigPlot<sup>+</sup> 1.4.5 был проанализирован механизм взаимодействия с сайтом связывания модели 3G0B в конформации с минимальной энергией  $\Delta E = -7.6$  Ккал/моль, выбранной из ансамбля в 30 конформаций, полученных при докинге этой структуры во все сайты трех валидных моделей ДПП4. Результаты приведены на рис. 11.1.

По этим данным, ДПП4 ингибирующую активность данного скаффолда определяют три водородные связи и неспецифические гидрофобные взаимодействия.

Для подтверждения и уточнения полученных результатов механизм связывания соединения АВ-0020 с сайтом модели 3G0B был дополнительно проанализирован с помощью программы LigandScout 4.1. Результаты приведены на рис. 11.2.

Уточнено, что определяющей является только одна водородная связь, между кислородом группы NO<sub>2</sub> и Ser-904, и подтверждено выраженное гидрофобное взаимодействие с этильным фрагментом сложноэфирной группы.

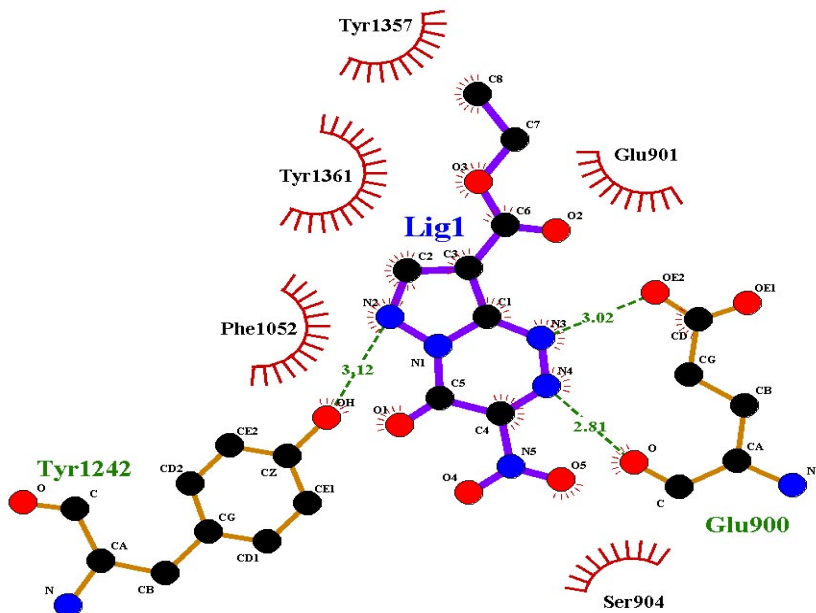


Рис. 11.1. Механизм связывания соединения АВ-0020 с сайтом ДПП4  
(по данным расчетов в программе LigPlot<sup>+</sup>)

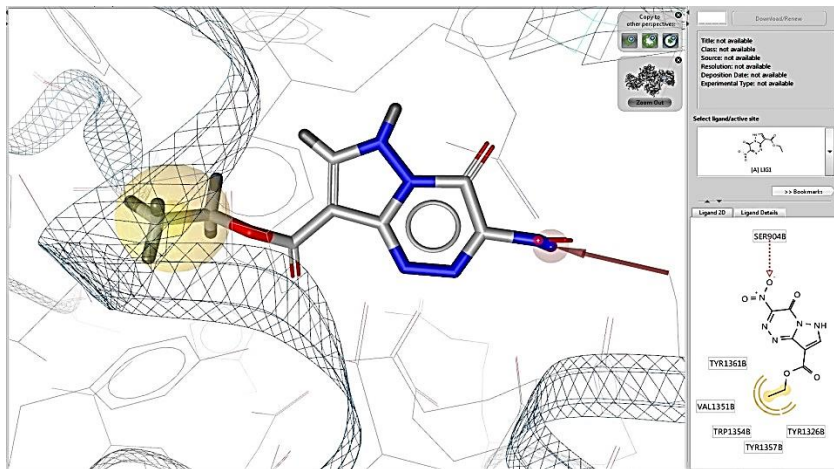


Рис. 11.2. Механизм связывания соединения АВ-0020 с сайтом ДПП4  
(по данным расчетов в программе LigandScout)

По результатам прогноза в ИТ «Микрокосм», наибольший коэффициент структурного сходства соединения АВ-0020 равен  $T=0.3830$  для референсного вещества ASP-8497-394594.

С целью разработки рекомендаций для направленного синтеза более активных структур, механизм связывания указанного референса с сайтом модели 3G0B (энергия докинга  $\Delta E = -7.1$  Ккал/моль) также был проанализирован с помощью программ LigPlot<sup>+</sup> и LigandScout.

Результаты представлены на рис. 11.3 и 11.4.

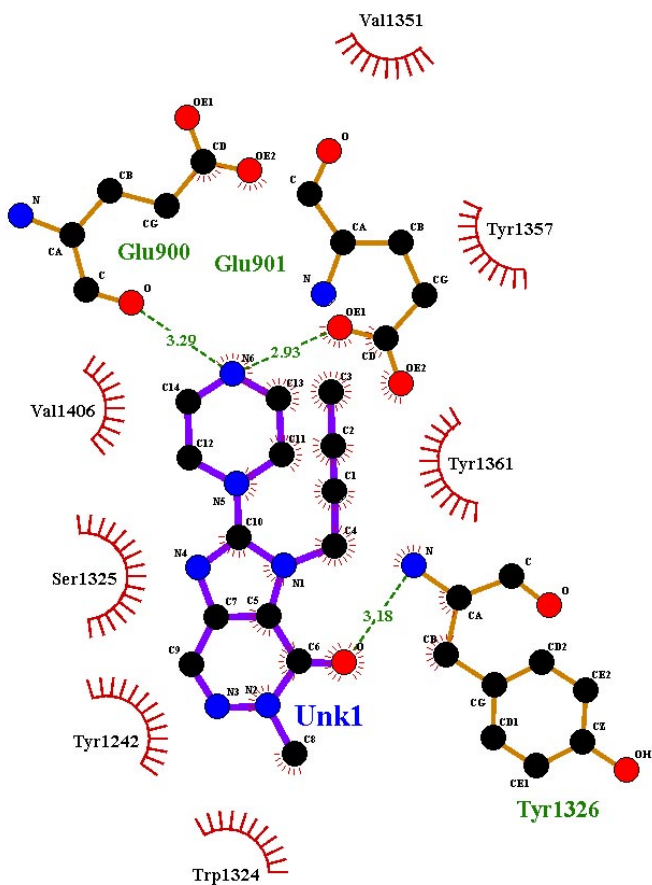


Рис. 11.3. Механизм связывания референсного вещества ASP-8497-394594 с сайтом ДПП4 (по данным расчетов в программе LigPlot<sup>+</sup>)

На рис. 11.3 видно, что по данным LigPlot<sup>+</sup> для ASP-8497-394594 также характерно связывание водородной связью с Glu-900, но при этом имеются еще две новых водородных связи с Glu-901 и Tyr-1326. Протяженная трициклическая система обеспечивает выраженное гидрофобное взаимодействие с пятью аминокислотами.

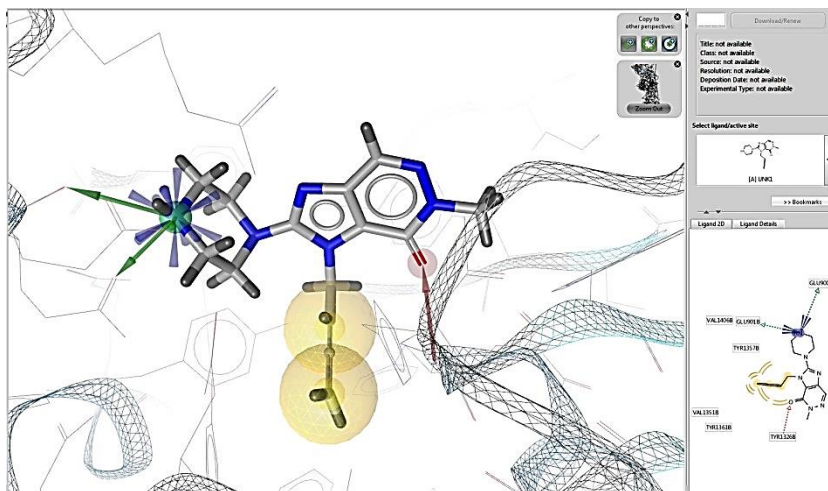


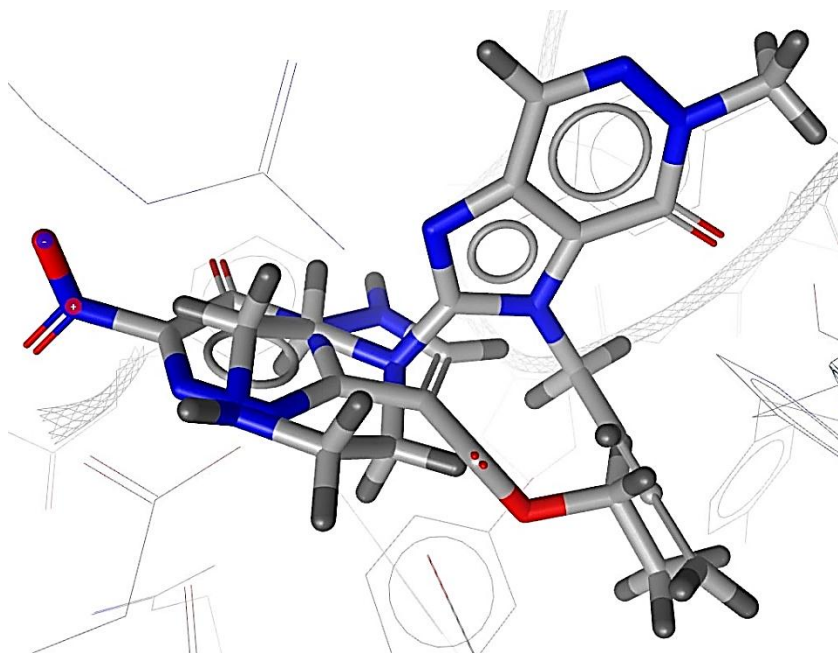
Рис. 11.4. Механизм связывания референсного вещества ASP-8497-394594 с сайтом ДПП4 (по данным расчетов в программе LigandScout)

Данные анализа в LigandScout (рис. 11.4) подтверждают наличие водородных связей с Glu-900, Glu-901 и Tyr-1326, уточняя, что в случае Glu-900 и Glu-901 дополнительный вклад вносит также электростатическое взаимодействие, за счет возможного протонирования азота пиперазинового цикла. Выявлен существенный вклад в гидрофобное взаимодействие углеродной цепочки с тройной связью.

С помощью программы LigandScout были совмещены положения (poses) в сайте ДПП4 двух указанных структур. Результаты представлены на рис 11.5.

Положение 3D-структуры вещества АВ-0020 только частично совпадает с положением ASP-8497-394594, что и обуславливает не очень высокую активность соединения АВ-0020, хотя энергии докинга обеих молекул одинаковы. При этом NO<sub>2</sub>-группа в структуре АВ-0020 мешает

образованию водородной связи и исключает ионное взаимодействие через положительно заряженную протонируемую группу.



*Рис. 11.5. Ориентация соединения АВ-0020 и референсного соединения ASP-8497-394594 в сайте ДПП4 (по данным расчетов в программе LigandScout)*

Характерно, что в обеих молекулах есть гидрофобный фрагмент в виде цепочки из четырех атомов, но, возможно, в АВ-0020 гидрофобное взаимодействие ослаблено за счет кислородных атомов сложноэфирной группы. В АВ-0020 также нет ароматического фрагмента, обеспечивающего гидрофобные взаимодействия с Val-406, Ser-1325, Tyr-1242 и Trp-1324.

Таким образом, ДПП4 ингибирующую активность соединения АВ-0020 можно повысить, если удалить из его структуры  $\text{NO}_2$ -группу (для обеспечения возможности образования водородной связи), заменить карбоксиэтильный фрагмент на н-бутил (с целью усиления гидрофобных взаимодействий) и ввести в положение 7 фенильный заместитель (что также усилит гидрофобное взаимодействие).

## 11.2. Ингибиторы гликогенфосфорилазы

Анализ механизма взаимодействия наиболее активного ингибитора ГФ соединения КНФА-0156 с каталитическим сайтом модели 3CEJ также был проведен с помощью программ LigPlot<sup>+</sup> и LigandScout. Конформация КНФА-0156 с минимальной энергией  $\Delta E = -8.7$  Ккал/моль была отобрана из ансамбля в 18 конформаций, полученных при докинге его структуры во все каталитические сайты трех валидных моделей ГФ.

По результатам расчетов в программе LigPlot<sup>+</sup> (рис. 11.6), связывание КНФА-0156 с каталитическим сайтом ГФ в основном обеспечивается многочисленными водородными связями (всего их одиннадцать).

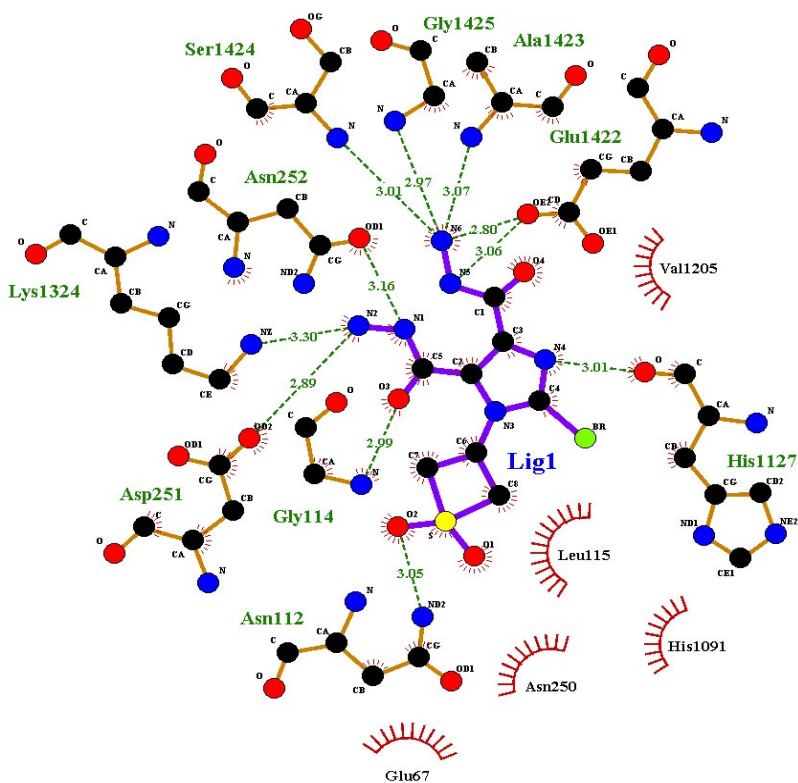


Рис. 11.6. Механизм связывания соединения КНФА-0156 с каталитическим сайтом ГФ (по данным расчетов в программе LigPlot<sup>+</sup>)

Однако по данным моделирования в LigandScout (рис. 11.7), водородных связей всего две, но существенное влияние на аффинитет к ГФ указанного скаффолда оказывают кулоновские взаимодействия за счет протонирования двух  $\text{NH}_2$  групп гидразидных фрагментов. Выявлено также гидрофобное (возможно, специфическое галогенное) взаимодействие через атом брома.

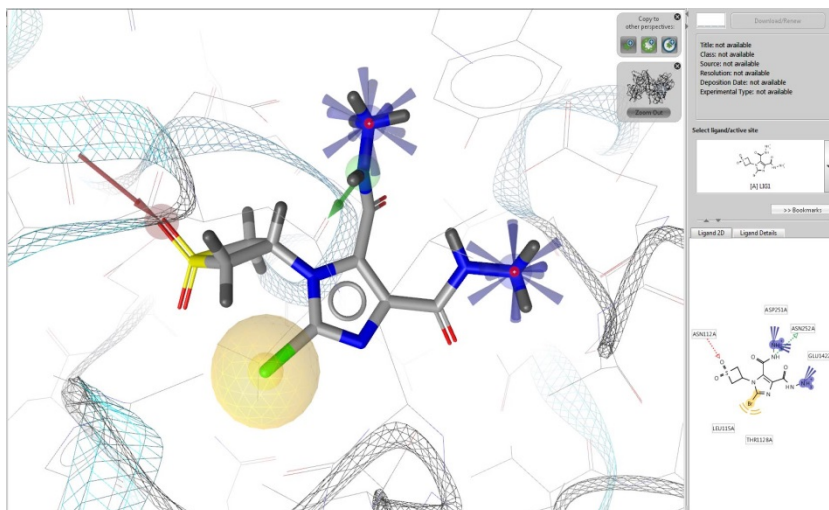


Рис. 11.7. Механизм связывания соединения KHFA-0156 с каталитическим сайтом ГФ (по данным расчетов в программе LigandScout)

По результатам прогноза в ИТ «Микрокосм» по сходству к эталонам, наиболее близким по структуре к соединению KHFA-0156 из ингибиторов каталитического сайта ГФ является референсное вещество 50295843 (коэффициент сходства  $T=0.2779$ ).

Механизм связывания этого референса с каталитическим сайтом модели ЗСЕJ (энергия докинга  $\Delta E = -9.0$  Ккал/моль) также был проанализирован с помощью программ LigPlot<sup>+</sup> и LigandScout. Результаты представлены на рис. 11.8 и 11.9.

Из данных рис. 11.8 следует, что для связывания соединения 50295843 характерно наличие многочисленных водородных связей (всего



их также одиннадцать), но дополнительно значительный вклад вносят гидрофобные взаимодействия.

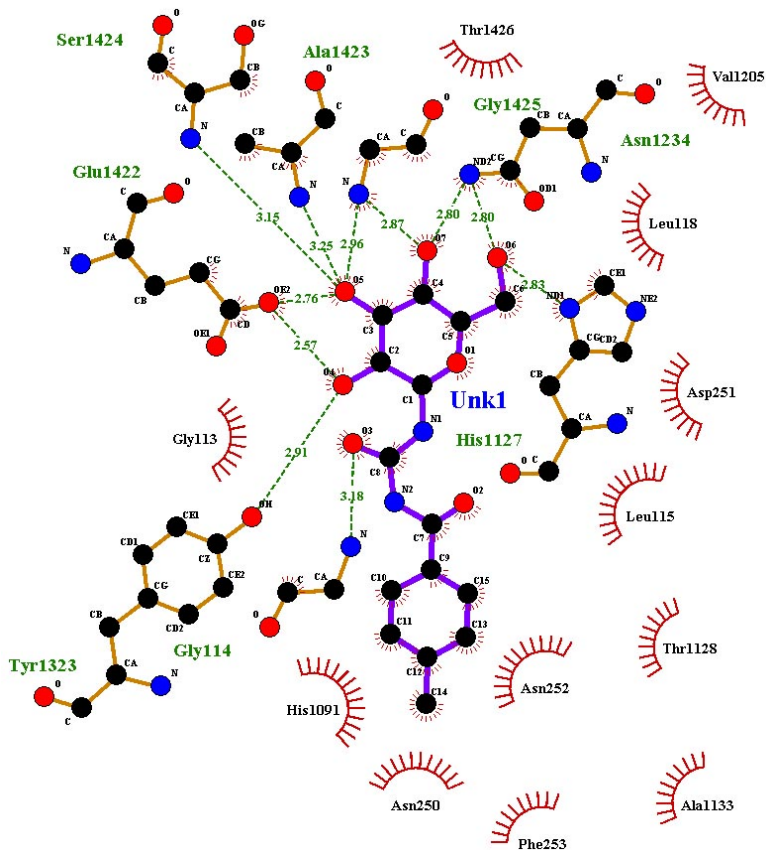


Рис. 11.8. Механизм связывания референсного вещества 50295843 с каталитическим сайтом ГФ (по данным расчетов в программе LigPlot<sup>+</sup>)

Результаты анализа в программе LigandScout (рис. 11.9) подтверждают основной вклад водородных связей во взаимодействие молекулы 50295843 с каталитическим сайтом ГФ – всего их шесть, все за счет глюконозного фрагмента. Прочность связывания дополняется гидрофобным взаимодействием за счет толильного заместителя.

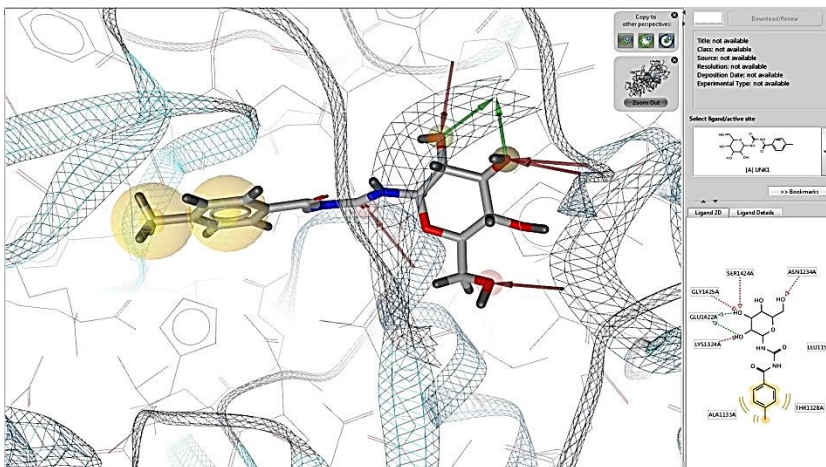


Рис. 11.9. Механизм связывания референсного вещества 50295843 с каталитическим сайтом ГФ (по данным расчетов в программе LigandScout)

Положения в каталитическом сайте ГФ обеих изучаемых 3D-структур были проанализированы в программе LigandScout (рис 11.10).

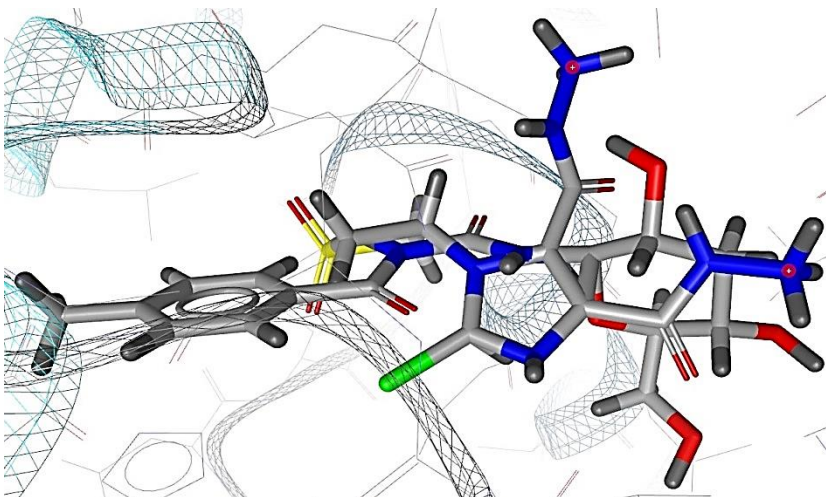


Рис. 11.10. Ориентация соединения KHFA-0156 и референсного соединения 50295843 в каталитическом сайте ГФ (по данным расчетов в программе LigandScout)

Как видно, положения молекул KHFA-0156 и 50295843 в каталитическом сайте ГФ не совпадают, что объясняет низкую ингибирующую активность вещества KHFA-0156. Вероятно, это обусловлено наличием в структуре KHFA-0156 двух протонируемых NH<sub>2</sub> групп, обеспечивающих мощное электростатическое взаимодействие, а также полярного фрагмента SO<sub>2</sub>, способного к образованию сильной водородной связи. Энергии докинга обеих структур одинаковы, что свидетельствует об их прочном связывании с сайтом ГФ. С другой стороны, сравнение результатов анализа в LigandScout показывает, что для связывания обеих соединений характерно гидрофобное взаимодействие с Leu-115 и Thr-128.

Суммируя полученные результаты, можно предположить, что увеличение ГФ ингибирующей активности соединения KHFA-0156 следует ожидать при замене в положении 2 атома брома на *p*-бромфенил (для усиления гидрофобных взаимодействий), присоединении к NH<sub>2</sub> группе гидразидного фрагмента в положении 5 фрагмента глюкозы (с целью обеспечения специфичной фиксации молекулы за счет водородных связей) и удалении двух кислородных атомов SO<sub>2</sub> группы, с сохранением в положении 1 тиетанового цикла (для устранения нежелательных водородных связей, с сохранением липофильности фрагмента).

### 11.3. Ингибиторы $\alpha$ -глюкозидазы

Для самого активного ингибитора АГ вещества DAB-0027 механизм взаимодействия с помощью программ LigPlot<sup>+</sup> и LigandScout исследовали на модели ЗТОР при связывании с глюкоамилазным сайтом, который характеризуется более высокими энергиями докинга референсов, чем  $\alpha$ -глюкозидазный сайт.

Энергетически наиболее выгодная конформация DAB-0027 с энергией связывания  $\Delta E = -9.6$  Ккал/моль была выбрана из ансамбля в 12 конформаций, полученных при докинге этого вещества во все глюкоамилазные сайты двух валидных моделей АГ.

Расчеты в программе LigPlot<sup>+</sup> (рис. 11.11) показали, что взаимодействие DAB-0027 с глюкоамилазным сайтом АГ определяется исключительно гидрофобными взаимодействиями.

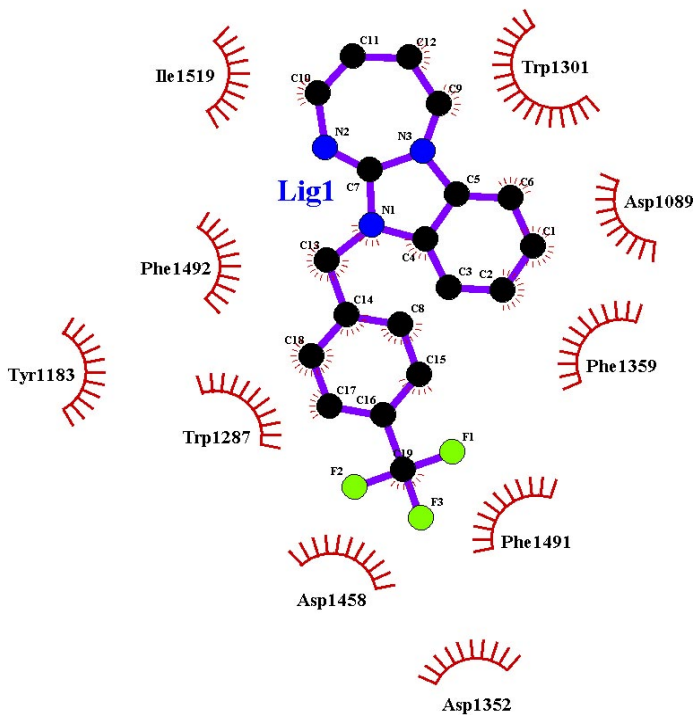


Рис. 11.11. Механизм связывания соединения DAB-0027 с глюкоамлазным сайтом АГ (по данным расчетов в программе LigPlot<sup>+</sup>)

При рассмотрении модели лиганд-белкового комплекса в LigandScout (рис. 11.12) выяснилось, что основное взаимодействие скаффолда DAB-0027 также обеспечивают только гидрофобные взаимодействия. Сопоставление результатов анализа с помощью двух программ показало, что наиболее существенными для гидрофобного связывания аминокислотами являются Туг-1183, Трп-1287, Трп-1301, Phe-1359 и Phe-1491.

По результатам анализа сходства в ИТ «Микрокосм», структурно самым близким к соединению DAB-0027 из числа референсных ингибиторов АГ оказалось вещество BMCL-2008-18-13-3711-3 с коэффициентом сходства  $T = 0.1772$ . Результаты анализа в программах LigPlot<sup>+</sup> и LigandScout механизма связывания структуры референса BMCL-2008-18-13-3711-3 с глюкоамлазным сайтом АГ модели ЗТОР ( $\Delta E = -10.5$  Ккал/моль) изображены на рис. 11.13 и 11.14.

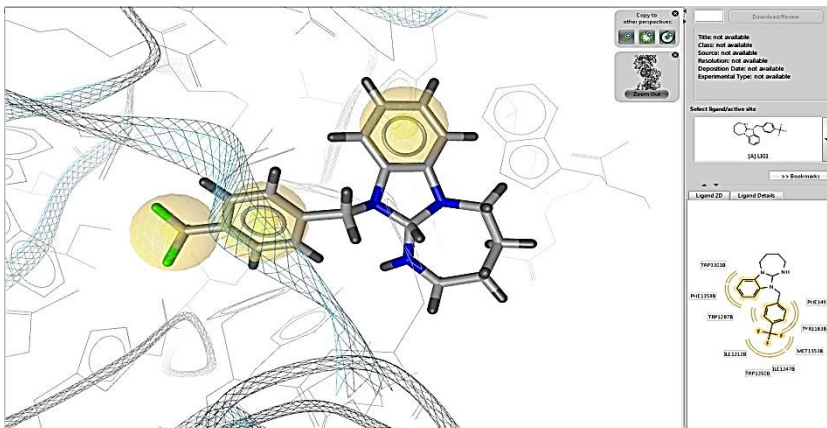


Рис. 11.12. Механизм связывания соединения DAB-0027 с глюкоamilазным сайтом АГ (по данным расчетов в программе LigandScout)

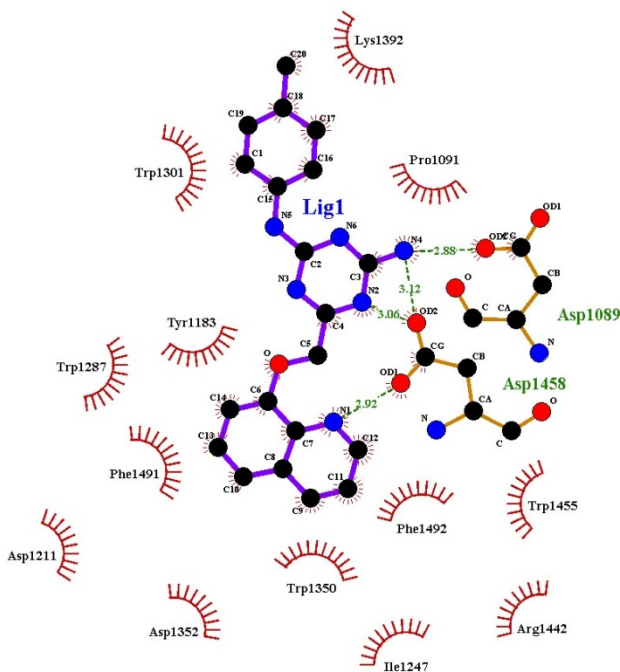


Рис. 11.13. Механизм связывания референса VMCL-2008-18-13-3711-3 с глюкоamilазным сайтом АГ (по данным расчетов в программе LigPlot<sup>+</sup>)

Анализ в LigPlot<sup>+</sup> характера связывания вещества BMCL-2008-18-13-3711-3 (рис. 11.13) показал, что для него также типичны множественные гидрофобные взаимодействия. Однако дополнительно существенную роль в связывании играют четыре водородные связи.

Результаты расчетов с помощью LigandScout (рис. 11.14) подтвердили преимущественно гидрофобный характер связывания молекулы BMCL-2008-18-13-3711-3.

Водородная связь при этом выявлена только одна и дополнительно обнаружено стэкингное взаимодействие  $\pi$ -системы толильного заместителя с Trp-1301.

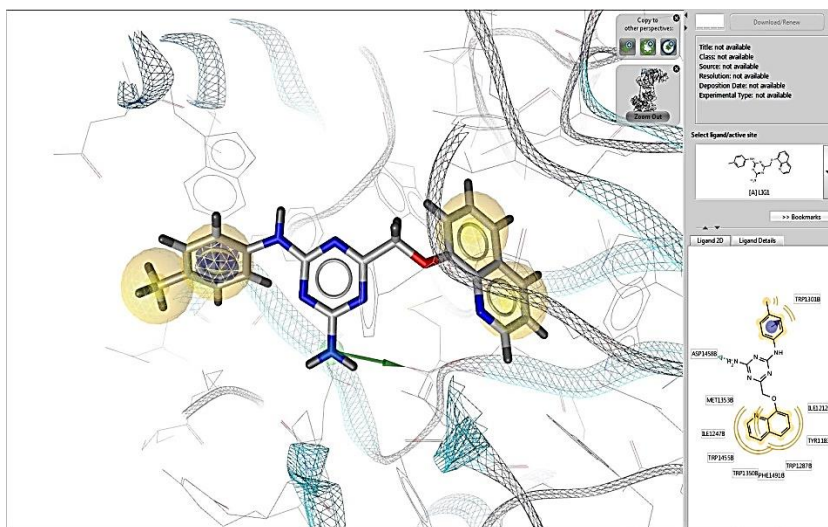


Рис. 11.14. Механизм связывания референса BMCL-2008-18-13-3711-3 с глюкоамилазным сайтом АГ (по данным расчетов в программе LigandScout)

Взаимная ориентация молекул DAB-0027 и BMCL-2008-18-13-3711-3 в глюкоамилазном сайте АГ исследована с помощью программы LigandScout и представлена на рис. 11.15.

3D-структуры в сайте АГ хорошо совпадают, что и обуславливает высокую активность нового вещества DAB-0027, превосходящую активность акарбозы.

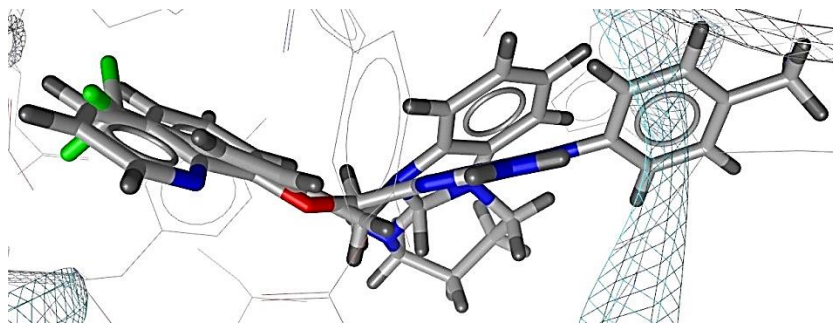


Рис. 11.15. Ориентация соединения DAB-0027 и референсного соединения BMCL-2008-18-13-3711-3 в глюкоамилазном сайте АГ (по данным расчетов в программе LigandScout)

При сравнении между собой всех результатов (рис. 11.11-11.14) было найдено, что общими для связывания с глюкоамилазным сайтом АГ соединений DAB-0027 и BMCL-2008-18-13-3711-3 являются 12 аминокислот: Phe-1492, Trp-1183, Trp-1287, Asp-1458, Asp-1352, Phe-1491, Asp-1089, Trp-1301, Ile-1212, Trp-1350, Ile-1247, Met-1353. При этом наиболее важными для гидрофобных взаимодействий являются Trp-1183, Trp-1287, Phe-1491, Trp-1301, Trp-1350 и Ile-1247. В референсном соединении через Asp-1458 осуществляется водородная связь, а через Trp-1301 – стэкинг-овое взаимодействие; оба эти взаимодействия отсутствуют в случае DAB-0027. Трифторметилфенильный фрагмент в DAB-0027 и конденсированный бицикл в BMCL-2008-18-13-3711-3 связываются с одними и теми же аминокислотами Trp-1183, Trp-1287, Asp-1458, Phe-1491, Ile-1212, Trp-1350, Ile-1247, Met-1353. Более высокая энергия докинга DAB-0027 ( $\Delta E = -9.6$  Ккал/моль), в сравнении с энергией докинга BMCL-2008-18-13-3711-3 ( $\Delta E = -10.5$  Ккал/моль), дает основания предполагать, что активность скаффолда DAB-0027 может быть повышена.

Сопоставляя полученные данные, можно предположить, что АГ ингибирующая активность DAB-0027 увеличится, если в положение 8 или 9 фенильного кольца трициклической системы ввести группу  $\text{NH}_2$  (для образования водородной связи), а в положение 3 или 4 diazepанового цикла ввести фенильный заместитель (для возникновения стэкинг-ового взаимодействия).

## 11.4. Агонисты PPAR-γ

Единственным активным агонистом PPAR-γ из числа экспериментально изученных веществ является соединение TONS-0281, механизм связывания которого исследовали с применением программ LigPlot<sup>+</sup> и LigandScout на модели 4PRG. Оптимальный конформер TONS-0281 с энергией связывания  $\Delta E = -9.4$  Ккал/моль был отобран из ансамбля в 24 конформера, полученных при докинге этого соединения во все сайты трех валидных моделей PPAR-γ.

В результате моделирования в программе LigPlot<sup>+</sup> связывания TONS-0281 с сайтом PPAR-γ (рис. 11.16) установлено, что оно обусловлено только гидрофобными взаимодействиями.

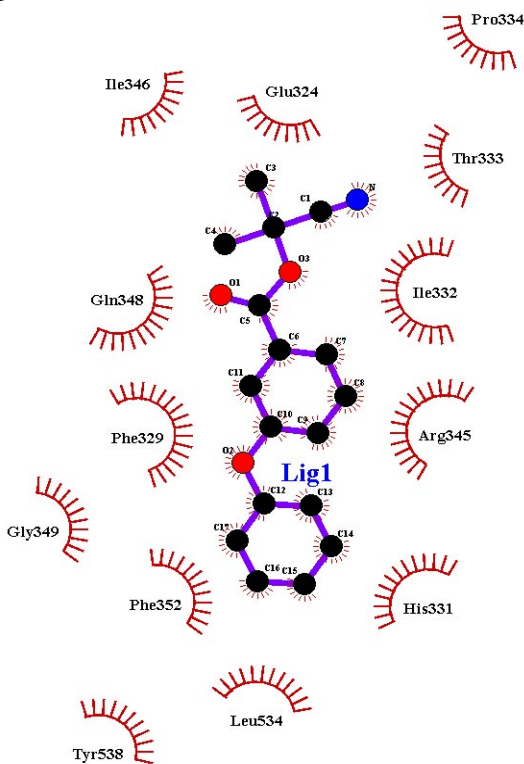


Рис. 11.16. Механизм связывания соединения TONS-0281 с сайтом PPAR-γ (по данным расчетов в программе LigPlot<sup>+</sup>)



Расчеты в LigandScout (рис. 11.17) также подтверждают исключительно гидрофобный характер взаимодействия TONS-0281 с сайтом PPAR- $\gamma$ . При сопоставлении результатов анализа с помощью двух программ найдено, что наиболее существенными для гидрофобного связывания аминокислотами являются Ile-346, Phe-329, Phe-352, Tyr-538, Leu-534 и Ile-332.

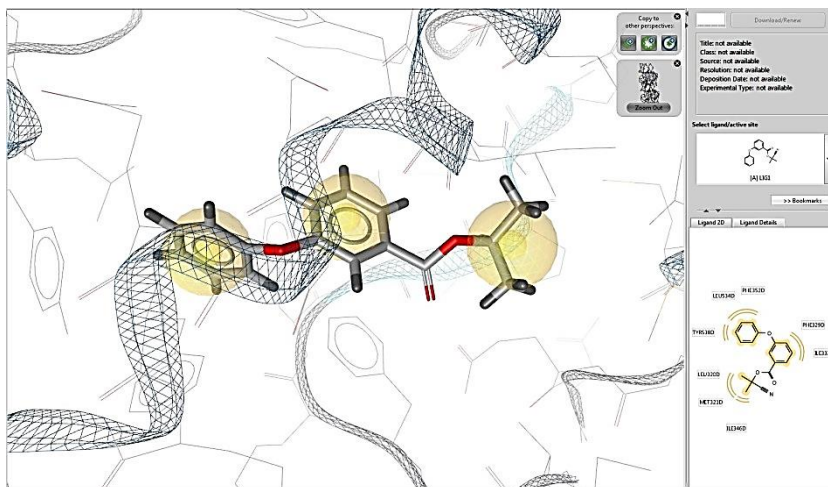


Рис. 11.17. Механизм связывания соединения TONS-0281 с сайтом PPAR- $\gamma$  (по данным расчетов в программе LigandScout)

Наиболее близким к TONS-0281 референсным соединением с коэффициентом структурного сходства  $T = 0.2792$  оказался препарат тезаглитазар.

Механизм связывания препарата тезаглитазар с сайтом PPAR- $\gamma$  для модели 4PRG ( $\Delta E = -8.7$  Ккал/моль) был проанализирован с помощью программ LigPlot<sup>+</sup> и LigandScout, результаты показаны на рис. 11.18 и 11.19.

Из данных, полученных в программе LigPlot<sup>+</sup>, следует, что связывание тезаглитазара, кроме гидрофобных взаимодействий, обусловлено также образованием двух водородных связей.

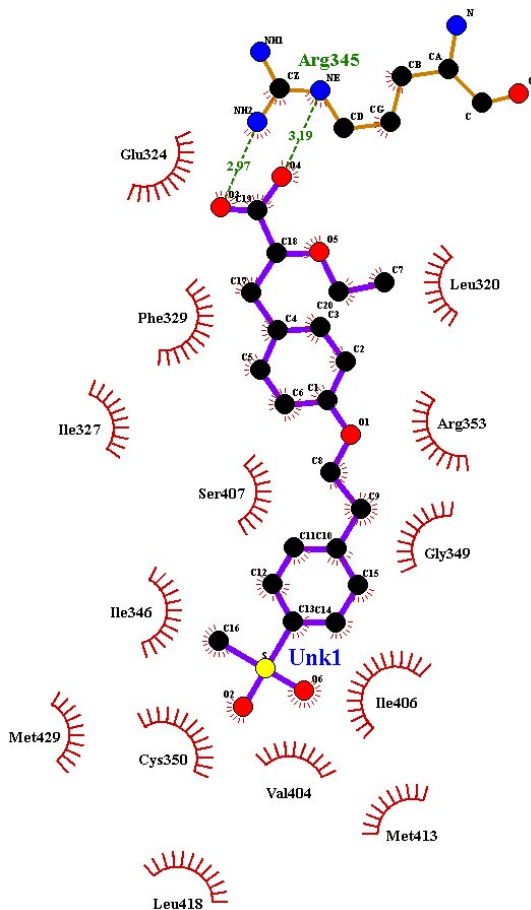


Рис. 11.18. Механизм связывания референсного препарата тезаглитазар с сайтом PPAR- $\gamma$  (по данным расчетов в программе LigPlot<sup>+</sup>)

Однако по результатам анализа в LigandScout найдена только одна водородная связь, дополнительно обнаружены стэкинг-взаимодействие и сильное электростатическое взаимодействие, возникающее за счет ионизации карбоксильной группы.

Проанализировано в программе LigandScout положение соединения TONS-0281 и тезаглитазара в сайте связывания PPAR- $\gamma$  (рис. 11.20).

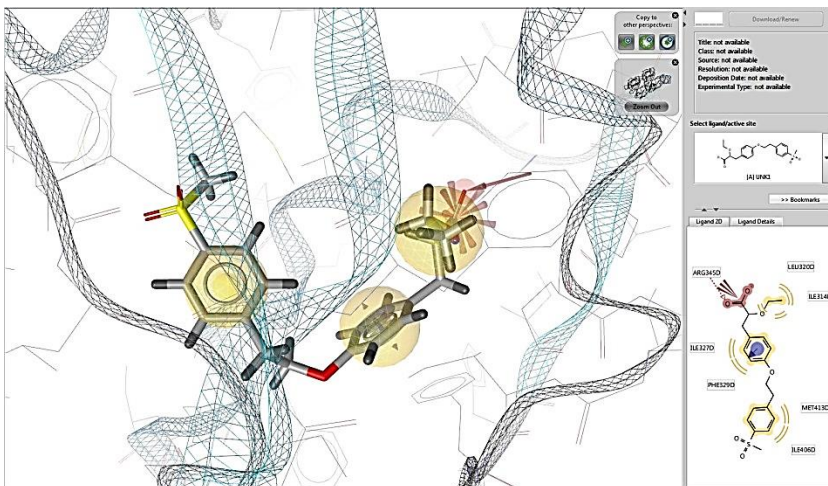


Рис. 11.19. Механизм связывания референсного препарата тезаглитазар с сайтом PPAR- $\gamma$  (по данным расчетов в программе LigandScout)

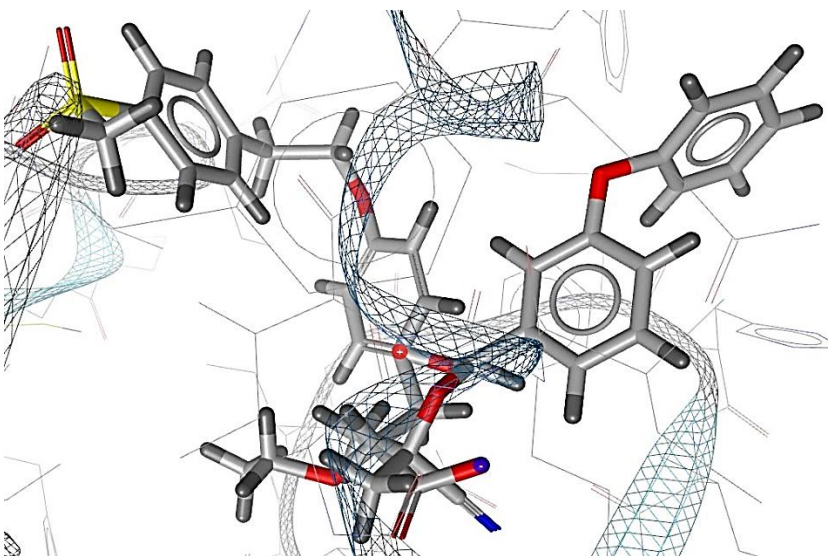


Рис. 11.20. Ориентация соединения TONS-0281 и референсного препарата тезаглитазар в сайте связывания PPAR- $\gamma$  (по данным расчетов в программе LigandScout)

Ориентация этих двух молекул в сайте PPAR- $\gamma$  весьма различается. Общая область связывания есть, но характер взаимодействия с аминокислотами не одинаков.

При сравнении между собой всех результатов (рис. 11.16-11.19) найдено, что из 25 аминокислот общими для связывания с сайтом PPAR- $\gamma$  соединения TONS-0281 и тезаглитазара являются только шесть: Glu-324, Ile-346, Phe-329, Gly-349, Arg-345, Leu-320. При этом гидрофобный характер взаимодействия одинаков только для четырех: Glu-324, Ile-346, Gly-349, Leu-320. В референсном соединении через Arg-345 осуществляется водородная связь и ионное взаимодействие, а через Phe-329 – стэкинговое взаимодействие; эти три взаимодействия отсутствует в случае TONS-0281. Дифенилоксидный фрагмент структуры TONS-0281 достаточно жесткий, что затрудняет конформационную адаптацию всей молекулы.

Энергия докинга TONS-0281 ( $\Delta E = -9.4$  Ккал/моль) даже ниже энергии докинга тезаглитазара ( $\Delta E = -8.7$  Ккал/моль), но скаффолд TONS-0281 более короткий и жесткий, что приводит к связыванию не с теми аминокислотами.

Агонистическую PPAR- $\gamma$  активность вещества TONS-0281 можно повысить, если при модификации его структуры поместить между двумя фенильными кольцами оксиметильную или оксиэтильную цепочку (для увеличения конформационной подвижности), концевую группу –  $C(CH_3)_2CN$  заменить на  $-CH_2CN$  (для устранения стерических затруднений), а в пара-положение незамещенного фенильного цикла ввести кислотную группу, например,  $-CH_2SO_3H$  (с целью обеспечения ионного взаимодействия и образования водородной связи).

## Литература

1. Laskowski R.A., Swindells M.B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery // J. Chem. Inf. Model. – 2011. – V. 51. – № 10. – P. 2778-2786.
2. Inte:ligand: Официальный сайт компании Inte:Ligand GmbH [Электронный ресурс]. URL: <http://www.inteligand.com/> (дата обращения 24.10.2016).

## Заключение

Направленный поиск веществ, действующих на белки-мишени регуляции углеводного обмена (дипептидилпептидаза-4, PPAR- $\gamma$  рецепторы, гликогенфосфорилаза,  $\alpha$ -глюкозидаза) является перспективным направлением разработки новых лекарственных средств для лечения диабета типа 2.

Выполнен поиск *in silico* соединений, афинных в отношении указанных биомишеней, на основе консенсусного подхода с использованием трех компьютерных систем: PASS, ИТ «Микрокосм» и AutoDock Vina. Исследования показали, что направленный мишень-ориентированный поиск антидиабетических веществ, проведенный с помощью консенсусной методологии, позволяет выявить активные соединения.

Синтезированы и экспериментально изучены 54 вещества различной химической структуры, найдено 19 активных соединений. В целом эффективность сочетанного виртуального и экспериментального скрининга составила 35.2 %. Выявлено пять веществ, превосходящих по активности препараты сравнения и три вещества, сопоставимых с ними по активности.

По отдельным биомишеням точность поиска активных соединений (чувствительность) составила: ингибиторов дипептидилпептидазы-4 38.1 %, агонисты PPAR- $\gamma$  12.5 %, ингибиторы гликогенфосфорилазы 50.0 %, ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы 50 %. Точность прогноза неактивных соединений (специфичность) во всех случаях составила 100 %. Полученные результаты показывают, что применяемый консенсусный подход позволяет с высокой точностью отсеивать неактивные соединения, минимизируя ошибку первого рода (вероятность «потерять» активное соединение). С другой стороны, в случае агонистов PPAR- $\gamma$  ошибка второго рода достаточно велика. Представляется целесообразным модифицировать предлагаемую консенсусную методологию на основе использования трех компьютерных систем таким образом, чтобы, при сохранении достаточно высокой точности прогноза неактивности, существенно повысить точность поиска активных соединений.

Среди семи наиболее активных веществ выполнен поиск *in silico* веществ с двойной активностью. Экспериментальное тестирование показало, что шесть из них обладают мультитаргетным действием. Из них два

одновременно ингибируют гликогенфосфоорилазу и дипептидилпептидазу-4, три ингибируют  $\alpha$ -глюкозидазу и дипептидилпептидазу-4, а одно проявляет сочетанную PPAR- $\gamma$  агонистическую и ингибирующую дипептидилпептидазу-4 активность. В данном случае точность поиска составила 85.7 %, что является весьма хорошим результатом.

Методами молекулярного моделирования изучены механизмы взаимодействия с сайтами связывания соответствующих биомишеней наиболее активных соединений, в сравнении со структурно наиболее сходными рефересными веществами. Найдены наиболее значимые факторы, которые могут повысить активность уже найденных соединений-лидеров. Для ингибирующей дипептидилпептидазу-4 активности – это гидрофобные и электростатические взаимодействия и водородные связи; для ингибиторов гликогенфосфоорилазы – гидрофобные взаимодействия и водородные связи; для агонистов PPAR- $\gamma$  существенным являются стэкинг и гидрофобные и электростатические взаимодействия; для ингибиторов  $\alpha$ -глюкозидазы – стэкинг, гидрофобные взаимодействия и водородные связи. Выработаны мотивированные рекомендации по синтезу более активных веществ.

Таким образом, в результате проведенных исследований создана комбинированная вычислительно-экспериментальная система направленного поиска мишень-ориентированных антидиабетических веществ, в том числе мультитаргетного действия, и показана ее эффективность в скрининге вновь синтезированных структурно разнородных химических соединений.

## Conclusion

Directed search for agents targeting proteins that regulate carbohydrate metabolism (dipeptidyl peptidase 4, PPAR $\gamma$  receptors, glycogen phosphorylase,  $\alpha$ -glucosidase) is a promising direction for development of new drugs for treatment of type 2 diabetes.

We have performed *in silico* search for compounds affine to the aforementioned biological targets employing a consensus approach based on three computer systems: PASS, IT «Microcosm» and AutoDock Vina. Studies have shown that directed target-oriented search for antidiabetic agents conducted with the consensus methodology is able to identify active compounds.

A total of 54 chemically diverse compounds were synthesized and evaluated, and 19 were found experimentally active. In general, effectiveness of the combined virtual and experimental screening is 35.2%. Five substances were found to exceed activity of the reference drugs and three substances are comparable with them.

Considering the biological targets separately, accuracy (sensitivity) of the active compounds search is as follows: 38.1% for inhibitors of dipeptidyl peptidase4, 12.5% for PPAR $\gamma$  agonists, 50.0% for glycogen phosphorylase inhibitors, and 50.0% for  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. The accuracy of inactivity prediction (specificity) in all cases is 100%. These results demonstrate that the consensus approach employed allows accurately exclude inactive compounds while minimizing the first kind errors (the probability of false negative prediction). On the other hand, the second kind error is sufficiently high in the case of PPAR- $\gamma$  agonists. It seems appropriate to modify the proposed consensus methodology using three computer systems to maintain a sufficiently high accuracy of inactivity prediction and improve precision of the active compounds identification.

Among the seven most active substances *in silico* search of substances with dual activity was performed. Experimental testing showed that six of them possess multitarget action. Two compounds simultaneously inhibit glycogen phosphorylase and dipeptidyl peptidase 4, three inhibit  $\alpha$ -glucosidase and dipeptidyl peptidase 4, and one demonstrates PPAR $\gamma$  agonism along with dipeptidyl peptidase 4 inhibitory activity. In this case, the accuracy of search is 85.7%.

The mode of interaction between the most active compounds and respective biological target binding sites were studied with molecular modeling in comparison with structurally relevant reference agents. We found the most significant factors that might improve the activity of lead compounds. I.e., hydrophobic, electrostatic interactions and hydrogen bonds for dipeptidyl peptidase 4 inhibitors; hydrophobic interactions and hydrogen bonds for glycogen phosphorylase inhibitors; stacking, hydrophobic and electrostatic interactions for PPAR $\gamma$  agonists; stacking, hydrophobic interactions and hydrogen bonds for  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. Motivated recommendations for optimization of active substances were developed.

Thus, as a result of the research we have created a combined computer assisted and experimental system of directed search for target-oriented antidiabetic agents, including multitarget compounds, and demonstrated its efficiency in screening of newly synthesized structurally diverse chemical compounds.



*Научное издание*

**МИШЕНЬ-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОИСК  
АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

*Под редакцией  
академика РАН А. А. Спасова;  
академика РАН В. И. Петрова*

Художественное и техническое редактирование,  
верстка *М. Н. Манохиной*

Директор Издательства ВолгГМУ *Л. К. Кожевников*

Санитарно-эпидемиологическое заключение  
№ 34.12.01.543. П 000006.01.07. от 11.12.2007 г.

Подписано в печать 27.11.2016 г. Формат 60x84/16.  
Гарнитура Таймс. Бумага офсетная.  
Усл. печ. л. 13,48. Уч.-изд. л. 12,15. Тираж 150 (1-й – 70) экз. Заказ 359.

Волгоградский государственный медицинский университет  
400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1.  
Издательство ВолгГМУ  
400006, Волгоград, ул. Дзержинского, 45.