



УДК 615.277:004.032.26

И. В. Семенюта, В. В. Ковалишин, С. Г. Пильо,  
В. Н. Благодатный, Е. П. Трохименко,  
В. С. Броварец, Л. А. Метелица

## Использование QSAR моделей для поиска ингибиторов тубулина в ряду производных 1,3-оксазола

(Представлено академиком НАН Украины В. П. Кухарем)

*Использование QSAR моделей для поиска новых ингибиторов тубулина показало высокую прогнозирующую способность. Предсказана активность 282 потенциальных ингибиторов тубулина на выборке из 978 производных оксазола и тиазола. Рассчитанный индекс Танимото для 127 веществ составил 0,5–0,76, что подтверждает подобие структур в обучающей и тестовой выборках. На культуре клеток Нер-2 изучено цитотоксическое действие 11 наиболее активных соединений. Показана высокая активность соединений 1, 3 и 4, для которых  $СД_{50}$  составляет 125,0; 31,7 и 62,5 мкг/мл, а максимально переносимая концентрация (МПК) — 15,8; 15,8 и 31,7 мкг/мл соответственно. Установленные  $СД_{50}$  и МПК соединений 1, 3 и 4 позволяют рекомендовать их для дальнейшего изучения как потенциальных антираковых агентов.*

Проблема злокачественных новообразований до настоящего времени является одной из важнейших в современной медицине, несмотря на большие успехи, достигнутые в области изучения опухолевого процесса, разработки методов профилактики, диагностики и лечения. При лечении злокачественных новообразований все большее значение приобретает химиотерапия, ставшая в настоящее время перспективным направлением в онкологии. Во многих странах мира проводятся интенсивные исследования по разработке методов синтеза, изучению физико-химических и цитостатических свойств соединений различных химических групп и классов [1].

Современная классификация противораковых препаратов включает в себя: цитостатические и цитотоксические препараты, антимагалоиты, противоопухолевые антибиотики, алкалоиды растительного происхождения, противоопухолевые гормональные препараты, иммуномодуляторы и иммунодепрессанты. Значительный интерес представляют алкалоиды растительного происхождения, в частности алкалоиды, действующие на микротрубочки

---

© И. В. Семенюта, В. В. Ковалишин, С. Г. Пильо, В. Н. Благодатный, Е. П. Трохименко, В. С. Броварец, Л. А. Метелица, 2014

живой клетки (колхицин, колхамин, винкаалкалоиды, таксаны) [2], поскольку микротрубочки составляют основу митотического аппарата (митотическое веретено) в период деления опухолевой клетки, а также являются важным компонентом ее цитоскелета. Поэтому поиск и создание новых антимиотических веществ, обладающих свойствами ингибиторов тубулина, является актуальной задачей биомедицинской теории и практики [3].

Известно, что в основе существующих методов разработки нового лекарственного препарата лежит применение математических методов анализа данных в форме программного обеспечения, позволяющего создавать прогнозирующие компьютерные модели, которые устанавливают связь между химической структурой и биологической активностью химических веществ (Quantitative Structure — Activity Relationship (QSAR)) [4]. QSAR методы широко применяются для поиска и конструирования лекарственных средств, для оценки их токсичности, тератогенности, мутагенности, канцерогенности, экотоксичности и позволяют существенно уменьшить время и сократить ресурсы, необходимые для создания новых химических соединений с заданными биологическими свойствами.

**Материалы и методы.** В предыдущем исследовании [5] мы проанализировали выборку соединений ингибиторов тубулина, отобранных из литературных источников и систематизированных в PubChem базе данных [6].

На первом этапе был исследован набор данных из 190000 соединений. Для построения QSAR моделей использовали 3242 соединения: “активные” ингибиторы тубулина и “неактивные” — по 1621 соединению соответственно. Выборку “неактивных” соединений создавали с помощью программы Instant Jchem [7] с индексом Дайса (Dice Index (DI)) [7] 0,5–0,6 по отношению к “активным” соединениям и оптимизировали методом Kennard-Stone Design (KSD) [8]. Молекулы “активных” и “неактивных” веществ были смоделированы с помощью программы ChemAxon Standardizer [9]. Для каждого соединения с помощью программы DRAGON [10] рассчитали и получили 1314 наиболее информативных дескрипторов, используя специальные методы анализа информативности дескрипторов, известные в литературе как “pruning methods” [11]. При построении прогнозирующих моделей использовался метод ассоциативных нейронных сетей (Associative Neural Networks (ASNN)) [11]. Точность моделей оценивали с помощью метода пятиразовой перекрестной проверки [4], который заключается в использовании 20% соединений, случайным образом отобранных в тестовый набор, тогда как оставшиеся 80% соединений из общего набора данных используются для построения QSAR моделей. Эту процедуру последовательно повторяли пять раз, при этом получили пять различных тестовых наборов данных и, соответственно, пять наборов для обучения. Таким образом, для каждого набора данных было создано пять моделей и обобщенный прогноз на основе тестовых наборов данных. Общая точность моделей была в пределах 96–97% для наборов обучения и 95–97% для тестовых наборов данных [5], что свидетельствует о высокой прогнозирующей способности созданных моделей.

**Результаты и обсуждение.** Известно, что производные оксазола и тиазола проявляют как противораковую, так и антимикробную активность [12]. По этой причине на втором этапе анализа созданные QSAR модели были использованы для предсказания противоопухолевой активности и выяснения механизма действия 978 гетероциклических соединений — производных тиазола и оксазола, синтезированных в Институте биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины [13]. С помощью классификационных QSAR моделей предсказана активность 282 веществ (из 978) как ингибиторов тубулина, что составляет 28,8% положительного прогноза. Положительно предсказанными — “активными” соединениями — считали вещества, для которых был позитивный прогноз у всех пяти QSAR моделей. Для

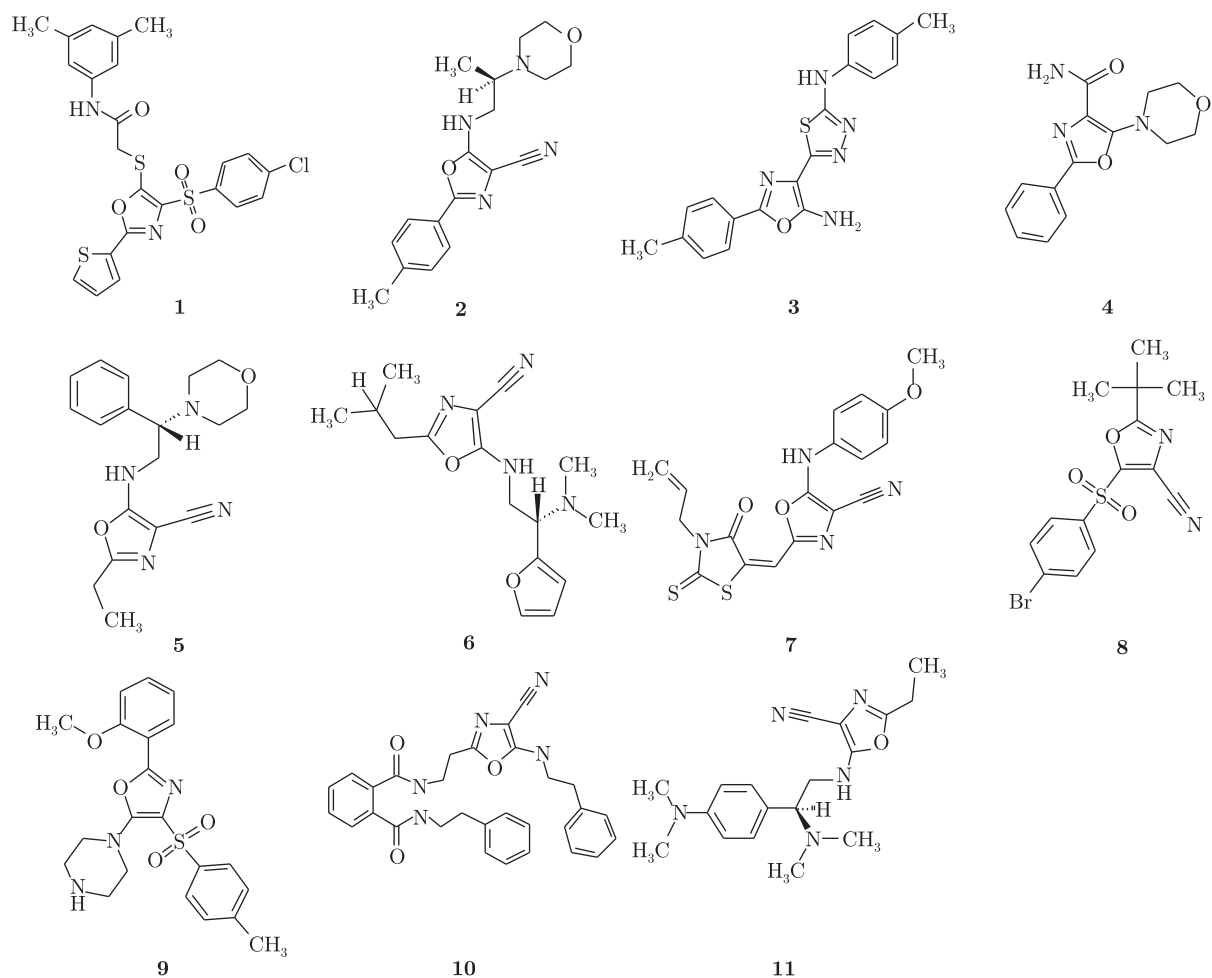


Рис. 1. Структуры соединений, отобранных для изучения цитотоксического действия

всех 978 соединений был рассчитан также и индекс Танимото [14]. В результате этого был получен набор из 127 веществ с индексом Танимото 0,5–0,76.

Таким образом, достаточно высокий процент положительного прогноза заданной биологической активности и величина рассчитанного индекса Танимото подтверждают наличие близких по структуре соединений в обучающей и тестовой выборках, а также свидетельствуют о высокой вероятности наличия активных *in vivo* веществ в ряду тестовых ингибиторов тубулина.

На третьем этапе исследований для изучения цитотоксического действия *in vitro* наиболее активных соединений были проведены испытания 11 производных 1,3-оксазола на культуре клеток НЕР-2 (рис. 1).

В работе использовались однослойные перевиваемые эпителиальные клетки аденокарциномы гортани человека Нер-2. Культивирование клеток Нер-2 проводилось в 96-луночных планшетах на питательной среде № 199 с добавлением 10% бычьей сыворотки и антибиотиков в течение 24–48 ч [15]. Клетки рассеивались в количестве  $(5 \div 7) \cdot 10^5$ /мл. Концентрации исследуемых соединений составляли 0,98; 1,95; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0; 1000,0 мкг/мл. Рабочее разведение соединений составляло 2000 мкг/мл. Исхо-

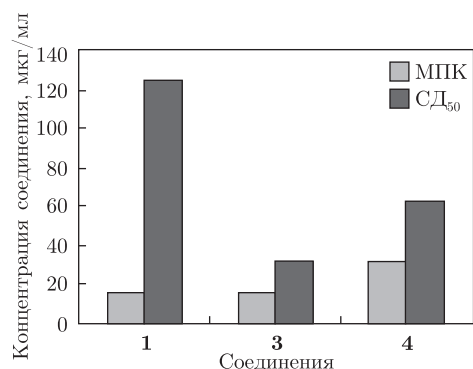


Рис. 2. Значения СД<sub>50</sub> и МПК для наиболее активных соединений

дные образцы разводили в смеси этанол–ДМСО (1 : 1) и в стерильном физиологическом растворе вносили в лунки (350 клеток на лунку). Клеточную культуру с препаратами инкубировали 24–72 ч при 37 °С в атмосфере 5% СО<sub>2</sub>. Цитотоксическое действие препаратов регистрировали через 24, 48 и 72 ч визуально при помощи инвертированного микроскопа, оценивая состояние клеточного монослоя на предмет дегенерации клеток.

Цитотоксическое действие оценивали по величине концентрации исследуемого соединения, которая вызывает дегенерацию клеток в половине исследуемых клеточных монослоев — СД<sub>50</sub>. В ходе исследования была установлена также и максимально переносимая концентрация (МПК), как наибольшая концентрация (мкг/мл), которая не вызывает цитотоксического повреждения клеточных монослоев при их контакте с исследуемым химическим агентом (табл. 1).

Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что наиболее цитотоксически активными являются соединения **1**, **3** и **4** с СД<sub>50</sub> 125,0; 31,7 и 62,5 мкг/мл соответственно. МПК этих веществ установлена как 15,8; 15,8 и 31,7 мкг/мл соответственно. Перспективность химических соединений **1**, **3** и **4** (рис. 2), как потенциальных антираковых препаратов, определяется не только достаточно низкой цитотоксической дозой (от 31,7 до 125,0 мкг/мл), но и величиной МПК (от 15,8 до 31,7 мкг/мл), уровень которой позволяет при необходимости существенно увеличить цитотоксический (антираковый) эффект этих химических агентов, не вызывая общего поражающего воздействия (ЛД<sub>100</sub>) на живые клетки макроорганизма.

Таблица 1. Цитотоксическая активность и максимально переносимая концентрация исследованных соединений

Соединение	МПК, мкг/мл	СД <sub>50</sub> , мкг/мл
<b>1</b>	15,8	125,0
<b>2</b>	62,5	125,0
<b>3</b>	15,8	31,7
<b>4</b>	31,7	62,5
<b>5</b>	250,0	250,0
<b>6</b>	125,0	125,0
<b>7</b>	125,0	250,0
<b>8</b>	62,5	125,0
<b>9</b>	125,0	500,0
<b>10</b>	125,0	125,0
<b>11</b>	250,0	500,0

Таким образом, использование созданных ранее QSAR моделей для поиска ингибиторов тубулина, как потенциальных противораковых агентов среди гетероциклических соединений классов тиазолов и оксазолов, показало высокую прогнозирующую способность и позволило отобрать для биологического тестирования наиболее активные соединения.

В экспериментах *in vitro* на модели однослойных перевиваемых эпителиальных клеток аденокарциномы гортани человека Hep-2 было протестировано 11 производных 1,3-оксазола. Установленные в ходе исследования дозы СД<sub>50</sub> и МПК соединений **1**, **3** и **4** позволяют рекомендовать их для дальнейшего изучения как потенциальных антираковых агентов.

1. Galmarini D., Galmarini C., Galmarini F. Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2012. – **84**. – P. 181–199.
2. Фармацевтична хімія: Навч. посіб. / За заг. ред. П. О. Безуглого. – Вінниця: Нова книга, 2008. – 560 с.
3. Marzo I., Naval J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: Promises and pitfalls // Biochem. Pharmacol. – 2013. – **86**. – P. 703–710.
4. Sushko I., Novotarskyi S., Körner R., Pandey A., Kovalishyn V. et al. Applicability domain for in silico models to achieve accuracy of experimental measurements // J. Chemometrics. – 2010. – **24**. – P. 202–208.
5. Семеновта И. В., Ковалишин В. В., Коперник И. Н., Василенко А. Н., Прокопенко В. В., Броварец В. С. Создание QSAR моделей для поиска ингибиторов тубулина // Доп. НАН України. – 2013. – № 11. – С. 168–173.
6. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
7. <http://www.chemaxon.com/products/instant-jchem/>.
8. Kennard R. W., Stone L. A. Computer aided design of experiment // Technometrics. – 1969. – **11**. – P. 137–148.
9. <http://www.chemaxon.com/products/standardizer/>.
10. [http://www.taletе.mi.it/products/dragon\\_description.htm](http://www.taletе.mi.it/products/dragon_description.htm).
11. Tetko I. V. Neural network studies. 4. Introduction to associative neural network // J. Chem. Inf. Comput. Sci. – 2002. – **42**. – P. 717–728.
12. Al-Saadi M. S., Faidallah H. M., Rostom S. A. Synthesis and biological evaluation of some 2, 4, 5-trisubstituted thiazole derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents // Arch. Pharm. – 2008. – **7**. – P. 424–434.
13. Драч Б. С., Броварец В. С., Смолий О. Б. Синтезы азотсодержащих гетероциклических соединений на основе амидоалкилирующих агентов. – Киев: Наук. думка, 1992. – 174 с.
14. Lipkus A. H. A proof of the triangle inequality for the Tanimoto distance // J. Math. Chem. – 1999. – **26**. – P. 263–265.
15. Bradwell A. R., Hughes R. G. Atlas of Hep-2 patterns: and laboratory techniques. – Birmingham: Binding Site, 2007. – 129 p.

Институт биоорганической химии и нефтехимии  
НАН Украины, Киев  
Национальная медицинская академия последипломного  
образования им. П. Л. Шупика, Киев

Поступило в редакцию 04.07.2014

І. В. Семенюта, В. В. Ковалішин, С. Г. Пільо, В. М. Благодатний,  
О. П. Трохименко, В. С. Броварець, Л. О. Метелиця

### Використання QSAR моделей для пошуку інгібіторів тубуліну в ряду похідних 1,3-оксазолу

*Застосування QSAR моделей для пошуку нових інгібіторів тубуліну показало високу прогно-  
зуючу здатність. Передбачено активність 282 потенційних інгібіторів тубуліну на вибірці  
з 978 похідних оксазолу та тіазолу. Розрахований індекс Танімото для 127 речовин стано-  
вить 0,5–0,76, що підтверджує подібність структур в навчальній і тестовій вибірках. На  
культури клітин Hep-2 вивчено цитотоксичну дію 11 найбільш активних сполук. Показа-  
но високу активність сполук 1, 3 і 4, для яких  $CD_{50}$  становить 125,0; 31,7 і 62,5 мкг/мл,  
а максимально переносима концентрація (МПК) – 15,8; 15,8 і 31,7 мкг/мл відповідно. Вста-  
новлені  $CD_{50}$  і МПК сполук 1, 3 і 4 дозволяють рекомендувати їх для подальшого вивчення  
як потенційних антиракових агентів.*

I. V. Semenyuta, V. V. Kovalishyn, S. G. Pilyo, V. N. Blagodatnyy,  
E. P. Trokhimenko, V. S. Brovarets, L. A. Metelitsa

### Application of QSAR models to the search for tubulin inhibitors in a series of derivatives of 1,3-oxazole

*The study shows the usage of QSAR models for the search for new tubulin inhibitors. The activity  
of 282 potential tubulin inhibitors on a dataset of 978 derivatives of oxazole and thiazole is predicted.  
The calculated Tanimoto index value was 0.5–0.76 for 127 compounds, which confirms the similarity  
of the structures in the training and test sets. The cytotoxic effect of 11 most active compounds  
was studied on the cell culture Hep-2. Compounds 1, 3, and 4 showed a high activity with  $LD_{50}$   
125.0, 31.7, and 62.5 mg/ml, respectively. Their maximum tolerated doses (MTD) are found to  
be 15.8, 15.8, and 31.7 mg/ml, respectively. The established  $LD_{50}$  and MTD of compounds 1, 3,  
and 4 allow us to recommend them for the further study as potential anticancer agents.*