

Р. О. Стратійчук<sup>1</sup>, Д. О. Дринь<sup>1, 2</sup>, О. В. Жолос<sup>1</sup>

## Структурне моделювання взаємодії GFB-887 із TRPC4 та оцінка його впливу на карбахол-індуковану скоротливість тонкої кишки миші

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ<sup>2</sup>Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, м. Київ

Ключові слова: TRPC4, GFB-887, сайт зв'язування, ADMET, молекулярний докінг, гладенькі м'язи

Родина каналів транз'єнтного рецепторного потенціалу (TRP) належить до ключових надродин неселективних катіонних каналів тварин, що забезпечують вхід  $\text{Na}^+$  та  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину й беруть участь у регуляції мембранної збудливості, кальцієвого сигналювання та широкого спектра фізіологічних процесів [1]. Серед підродин TRP особливе місце посідають канонічні канали (TRPC), які функціонально пов'язані з рецепторами, що активують фосфоліпазу C, і залучені до формування рецептор-керованих катіонних струмів у різних типах клітин. У межах цієї підродини особливий інтерес становить TRPC4, який разом із TRPC5 утворює близьку функціонально-структурну групу. TRPC4 бере участь у регуляції збудливості та скоротливості гладеньких м'язів, ендотеліальної функції та процесів у нервовій системі, а також може функціонувати як у вигляді гомотетрамера, так і в гетеромерних комплексах з іншими TRPC-субодинами [1].

Поява високоякісних структурних даних суттєво розширила можливості механістичного аналізу цього каналу. Дані крио-електронної мікроскопії (крио-ЕМ) щодо структури мишачого TRPC4 з ідентифікатором у банку

білкових структур (PDB ID: 5Z96) надали детальний опис просторової організації трансмембранного домену та цитозольних регіонів і створили основу для обчислювального моделювання взаємодії каналу з малими молекулами [2]. Подальші дослідження продемонстрували, що подібна архітектура зберігається у TRPC4 інших видів, зокрема у *Danio rerio*, для якого отримано крио-ЕМ структури в комплексах із піридазинон-похідними інгібіторами серії GFB [3]. Крім того, крио-ЕМ структура TRPC5 людини з інгібітором клемізолом (PDB ID: 7D4P) підтвердила просторову консервативність трансмембранного домену в межах групи TRPC4/TRPC5, що дозволяє екстраполювати дані між видами та використовувати ці структури як узгоджену основу для аналізу зв'язування лігандів [4].

Фармакологічна значущість каналів TRPC4/TRPC5 підтверджується наявністю широкого спектра малих молекул, здатних вибірково змінювати їхню активність. Одним із перших інгібіторів цієї групи став ML204, який широко використовувався як інструментальна сполука для дослідження внеску TRPC4/5 у клітинних моделях [4]. З протилежного боку фармакологічного спектра знаходиться природна сполука (-)-енглерин А – потужний активатор TRPC4 і TRPC5 [5].

---

---

Подальші дослідження призвели до створення селективних інгібіторів, зокрема Pico145, для якого показано ефективне пригнічення TRPC4-опосередкованих катіонних струмів і пов'язаних функціональних ефектів у гладеньких м'язах кишечника [6]. Крім того, розроблено сполуки HC-070 і клемізол, що проявляють інгібувальну дію щодо TRPC4/TRPC5 і використовуються як фармакологічні інструменти в дослідженнях ролі цих каналів у нервовій системі [3].

Оскільки більшість відомих модулаторів TRPC4/TRPC5 належить до ліпофільних малих молекул, які здатні проникати крізь біологічні мембрани, важливим аспектом їхнього дослідження є оцінювання показників абсорбції, розподілу, метаболізму, виведення та токсичності (ADMET). Аналіз таких характеристик дозволяє співвіднести структурні особливості сполук із їхньою фармакокінетичною поведінкою та потенційними тканинними ефектами.

У цьому дослідженні першочерговим етапом було обґрунтоване визначення потенційного сайту зв'язування у структурі TRPC4 для подальшого молекулярного докінгу. З цією метою застосовано підхід пріоритезації зв'язувальних кишень, що поєднує геометричний аналіз порожнин у структурі білка з пріоритезацією цих ділянок на основі експериментально підтверджених даних щодо амінокислотних залишків, наведених у наукових публікаціях [9].

З огляду на обмеженість експериментально підтверджених даних щодо молекулярних деталей взаємодії GFB-887 зі спорідненими TRPC-каналами, актуальним є поєднання структурного аналізу з функціональним тестуванням у фізіологічно релевантній моделі. Такий підхід дозволяє не лише запропонувати обґрунтовану гіпотезу

щодо можливого зв'язування сполуки з TRPC4 на основі структурних даних, але й співвіднести її з реальними тканинними ефектами.

*Мета дослідження* – з'ясувати можливий характер взаємодії GFB-887 з TRPC4 на основі обчислювального моделювання та зіставити отримані структурні припущення з функціональним впливом сполуки на карбахол-індуковану скоротливість гладеньких м'язів тонкої кишки миші.

*Матеріали та методи.* Потенційний сайт зв'язування для докінгу GFB-887 було визначено із застосуванням підходу пріоритезації сайтів зв'язування, що ґрунтується на аналізі наукових публікацій і запропонований у нещодавно опублікованому дослідженні [9]. У межах цього підходу початковий набір кандидатних кишень формували за допомогою геометрично орієнтованого алгоритму, реалізованого в програмі Focket [10], який виявляє потенційні порожнини на основі кластеризації Вороного та кластеризації альфа-сфер. Надалі ці геометрично ідентифіковані кишень пріоритезували із залученням доказів на рівні амінокислотних залишків, отриманих із наукової літератури шляхом текстового аналізу з використанням великої мовної моделі. У цьому підході релевантні публікації, що описують експериментально охарактеризовані ділянки зв'язування, систематично аналізували, а залишки, які пов'язані з взаємодією лігандів або функціональною модуляцією, ідентифікували та відображали на структурі цільового білка. Отримані набори залишків порівнювали з геометрично визначеними кишнями, що дозволяло обрати сайти зв'язування, підтверджені як структурними особливостями, так і незалежними експериментальними даними, наведеними в літературі.

---

---

Визначення сайту для докінгу при цьому не залежало від хімічної структури ліганду та ґрунтувалося виключно на інформації про білок.

Прогнозований сайт зв'язування було додатково підтверджено наявними даними кріо-ЕМ для TRPC4 *Danio rerio* у комплексі з низькомолекулярними інгібіторами серії GFB – GFB-8749 (PDB ID: 7B05), GFB-8438 (PDB ID: 7B0S) та GFB-9289 (PDB ID: 7B16), які демонструють локалізацію лігандів у тій самій ділянці трансмембранного домену.

Для проведення молекулярного докінгу було використано кріо-ЕМ структуру TRPC4 миші з ідентифікатором 5Z96, взяту з PDB. Цей файл складається з чотирьох ланцюгів А, В, С, D, де кожен відповідає окремій субодиниці. Перед проведенням молекулярного докінгу було додатково підготовлено обрану структуру: взято ланцюг А, структура очищена від наявних лігандів з використанням BIOVIA Discovery Studio 4.5.

Молекулярний докінг було проведено за допомогою програми AutoDock 4.2.6 [11], яка працює за методом на основі пошуку по сітці, що дозволяє швидко оцінювати енергію зв'язування з пробними конформаціями. У цьому методі білок-мішень поміщається в сітку, після чого кожен атом ліганду послідовно розміщується в кожній точці сітки, обраховується енергія зв'язування між атомом ліганду і білком-мішенню, значення зберігаються. Основним методом конформаційного пошуку є генетичний алгоритм Ламарка [12]. Під час роботи даного алгоритму створюється популяція пробних конформацій, з кожною генерацією вони мутують, обмінюються конформаційними параметрами, у результаті обирається один варіант з найменшою енергією зв'язування.

Спочатку молекула TRPC4 у форматі PDB додавалась у робочий простір супутнього програмного пакета AutoDock Tools. Далі додавались полярні атоми гідрогена, розраховувались часткові атомні заряди Колмана. Після цього файл зберігали у форматі PDBQT, який потім використовувався для докінгу. За допомогою автоматизованого скрипту програми для лігандів, які відібрані моделями машинного навчання, розраховувались часткові атомні заряди методом Гастієра, після чого молекулу ліганду GFB-887 зберігали у форматі PDBQT.

Докінг проводили в кубічну ділянку, яка називається грід боксом, що відповідала сайту зв'язування, який ідентифікований за допомогою запропонованого гібридного підходу визначення потенційних сайтів зв'язування. Для докінгу в 5Z96 кількість точок грід боксу вздовж розмірів x, y та z було встановлено як 36 x 34 x 50. Значення центру грід боксу встановлено як:  $x = 189,849$ ,  $y = 151,628$  та  $z = 172,226$ . Роздільна здатність сітки становила 0,375 Å. Решта параметрів були стандартними. Вихідні дані були збережені у форматі файлу параметрів сітки (GPF). Для розрахунку потенціалу було використано емпіричну скоринг функцію. Після проведення молекулярного докінгу був проведений аналіз результатів. З п'яти фінальних конформацій GFB-887 було обрано одну на основі енергії зв'язування та пози зв'язування з TRPC4. Комплекс GFB-8438 із TRPC4 *Danio rerio* з ідентифікатором 7B0S використовувався як референс для оцінки адекватної пози зв'язування. Візуалізацію отриманих комплексів GFB-887 із TRPC4 миші проводили за допомогою BIOVIA Discovery Studio 4.5.

*In silico* прогнозування властивостей ADMET виконували із застосуванням підходу на основі машинного навчання, детально описаного в дослідженні Stratiichuk та ін. [13]. Метод ґрунтується на моделях із навчанням з учителем, натренованих на великих публічно доступних ADMET-наборах даних, і призначений для розв'язання задач як класифікації, так і регресії для широкого спектра фармакокінетичних і токсикологічних показників. Навчання моделей здійснювали на експериментальних ADMET-наборах даних, систематизованих у межах платформи Therapeutics Data Commons (TDC), що забезпечує стандартизовані й узгоджені за форматом дані для задач фармакокінетичного та токсикологічного моделювання [14]. Молекулярні структури описували з використанням комбінації фізико-хімічних дескрипторів і молекулярних представлень, отриманих на основі аналізу даних. Зокрема, застосовували ембединги Mol2Vec для відображення субструктурної інформації, отриманої шляхом навчання без учителя на великих масивах хімічних сполук, які доповнювали традиційними молекулярними дескрипторами з метою підвищення прогностичної точності. Розрахунок дескрипторів і попередню обробку ознак виконували відповідно до стандартизованого протоколу, наведеного в базовому дослідженні, без змін архітектури моделей або значень гіперпараметрів. Прогнози отримували для заздалегідь визначеного набору ADMET-показників, що охоплювали параметри проникності крізь біологічні мембрани, пероральної абсорбції, особливостей розподілу, метаболічної стабільності та ризику токсичності. За наявності відповідні прогнозовані значення порівнювали з опублікованими експеримен-

тальними даними ADMET для оцінювання узгодженості та правдоподібності розрахункових оцінок. Усі розрахунки ADMET виконували з використанням стандартних налаштувань реалізованих моделей, без додаткового перенавчання в межах цього дослідження.

Експериментальне дослідження виконували на мишах-самцях лінії Albino B6 віком 3 місяці (маса тіла 30–35 г). Тварин утримували у стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Усі експериментальні процедури здійснювали з дотриманням вимог Конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), а також Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

*Реєстрація скоротливої активності гладеньких м'язів кишечника.* Скоротливі реакції гладеньких м'язів кишечника оцінювали методом тензометричної реєстрації в ізометричному режимі із застосуванням емнісних датчиків напруження та програмного забезпечення LabScribe3 («World Precision Instrument Inc.», США). Попередньо виконували лапаротомію в миші, після чого ділянку тонкої кишки швидко вилучали та негайно переносили в модифікований розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 120, глюкоза – 12, HEPES – 10, KCl – 6, CaCl<sub>2</sub> – 2,5, MgCl<sub>2</sub> – 1,2; pH 7,4 (корекція за допомогою NaOH). Далі кишечник розрізали на сегменти довжиною 1 см і переносили до камери, заповненої розчином Кребса-Рінгера, що містив (ммоль/л): NaCl – 133, NaHCO<sub>3</sub> – 16,3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,38, KCl – 4,7, MgCl<sub>2</sub> – 1,05, глюкоза – 11,5, CaCl<sub>2</sub> – 2,73, HEPES – 10; pH 7,4 (корекція за допомогою NaOH). Препарати

---

---

фіксували в камері між двома сталевими гачками, а саме: один гачок закріплювали стаціонарно, інший з'єднували з тензодатчиком. Для забезпечення оптимальної сили скорочення сегменти піддавали попередньому пасивному розтягненню із силою приблизно 0,5 г; перед початком експерименту тензодатчик встановлювали в нульове положення («нуль»). Перфузію здійснювали розчином Кребса–Рінгера зі сталою швидкістю 1,5 мл/хв за допомогою чотириканального перистальтичного насоса IPS ISM 930 («Ismatec», Німеччина). Після 60 хв адаптації та стабілізації гладеньком'язових препаратів у розчині проводили реєстрацію їхньої скоротливої активності. Для досліджень використовували реактиви виробництва «Sigma-Aldrich» (США), за винятком сполуки GFB-887, яку люб'язно надали колеги з Університету Лідса (Сполучене Королівство). Обробку отриманих реєстрацій і побудову графічних матеріалів проводили із застосуванням програмного забезпечення Origin 8.5 (OriginLab Corporation, США).

**Результати та їх обговорення.** На першому етапі дослідження було виконано *in silico* ідентифікацію потенційного сайту зв'язування малих молекул у каналі TRPC4 з метою обґрунтованого визначення області для подальшого молекулярного докінгу. Враховуючи складну тетрамерну організацію TRPC4 та наявність кількох функціонально різних трансмембранних і міжсубодиничних ділянок, пошук сайту зв'язування проводили із застосуванням раніше розробленого гібридного підходу, який поєднує геометричне прогнозування порожнин у білковій структурі з літературно зумовленою пріоритезацією на основі експериментально підтверджених амінокис-

лотних залишків [9]. Застосування геометричного алгоритму Focket до кріо-ЕМ структури TRPC4 (PDB ID: 5Z96) призвело до ідентифікації 267 потенційних кишень-кандидатів, що відображає характерну для геометричних методів тенденцію до надмірного прогнозування порожнин, значна частина яких не має прямої біологічної релевантності. Така кількість кишень-кандидатів унеможливає їхнє пряме використання для докінгу без додаткової фільтрації та підкреслює необхідність інтеграції незалежних джерел інформації для обґрунтованого вибору сайту зв'язування. Для біологічно обґрунтованої фільтрації геометрично визначених порожнин було використано інформацію з трьох наукових публікацій, в яких описано експериментально підтверджені сайти зв'язування та функціонально значущі амінокислотні залишки TRPC4 і споріднених структур [2, 3, 15]. За допомогою мовної моделі з текстів цих робіт було витягнуто набори амінокислотних залишків, асоційованих із взаємодією малих молекул-інгібіторів, які після алгоритмічного проектування на структуру 5Z96 сформували 16 узгоджених наборів залишків, що потенційно відповідають різним сайтам зв'язування. Подальше просторове кластеризування визначених таким чином залишків дозволило виділити 8 просторово відокремлених кластерів, що відповідають унікальним типам потенційних сайтів зв'язування. З урахуванням тетрамерної організації TRPC4 та повторюваності еквівалентних сайтів у межах різних субодиниць кожен із таких кластерів реалізується у вигляді кількох структурно еквівалентних кишень, у результаті чого було сформовано 16 фінальних кишень-кандидатів.

Отримані результати було проаналізовано, і для подальшого молекулярного докінгу було обрано трансмембранний сайт зв'язування, локалізований у регіоні між сегментами S1 та S4, який демонстрував найвищу узгодженість між геометричним прогнозуванням і даними літератури (рис. 1).

Набір амінокислотних залишків, що визначають цей сайт, які були витягнуті з джерел літератури та проєктовані на структуру TRPC4 (PDB ID: 5Z96), включає: His369, Tyr373, Phe413, Asp438, Met441, Asn442, Ser488, Arg491, Leu495 та Tyr646 (рис. 2).

Просторова локалізація ідентифікованого сайту зв'язування та його амінокислотний склад узгоджуються з даними крио-ЕМ TRPC4 у комплексі з малими молекулами-інгібіторами, опублікованими раніше. Зокрема, у крио-ЕМ структурах TRPC4 у комплексі з інгібіторами GFB-8438, GFB-9289 та GFB-8749 (PDB ID: 7B0S, 7B16 та 7B05 відповідно) показано, що зв'язування лігандів відбувається в трансмембранній області каналу, сформованій сегментами S1–S4, яка відповідає так званому «voltage-sensor-like» (VSL) домену [3]. У цих структурах густина ліганду локалізується на внутрішній поверхні трансмембранного домену, де взаємодії з бічними ланцюгами амінокислот стабілізують неактивну конформацію каналу та зумовлюють алостеричний механізм інгібування.

Для молекулярного докінгу сполуки GFB-887 як рецепторну модель було обрано апо-структуру мишачого каналу TRPC4 (PDB ID: 5Z96). Вибір саме цієї структури зумовлений її високою роздільною здатністю, повною реконструкцією трансмембранного домену та відсутністю зв'язаного ліганду, що мінімізує структурні упередження та забезпечує коректний

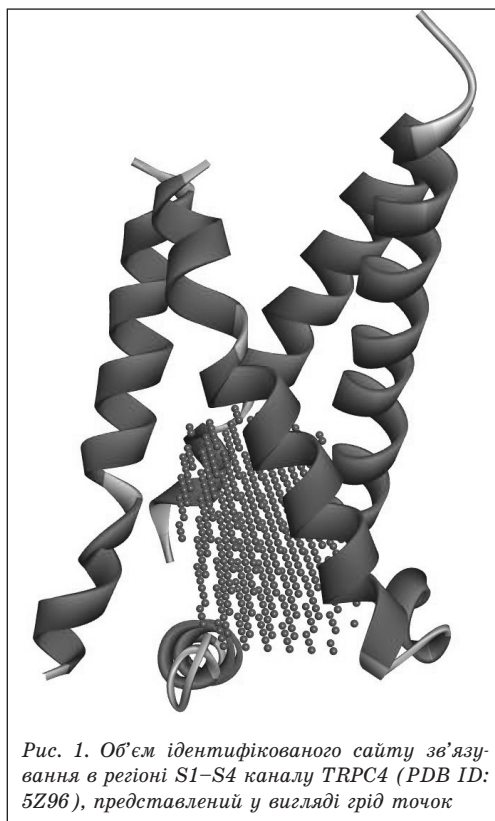


Рис. 1. Об'єм ідентифікованого сайту зв'язування в регіоні S1–S4 каналу TRPC4 (PDB ID: 5Z96), представлений у вигляді ґрид точок

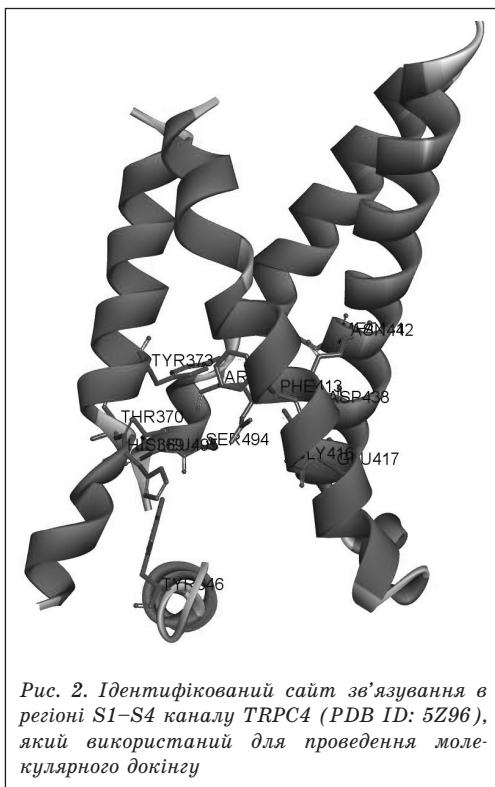
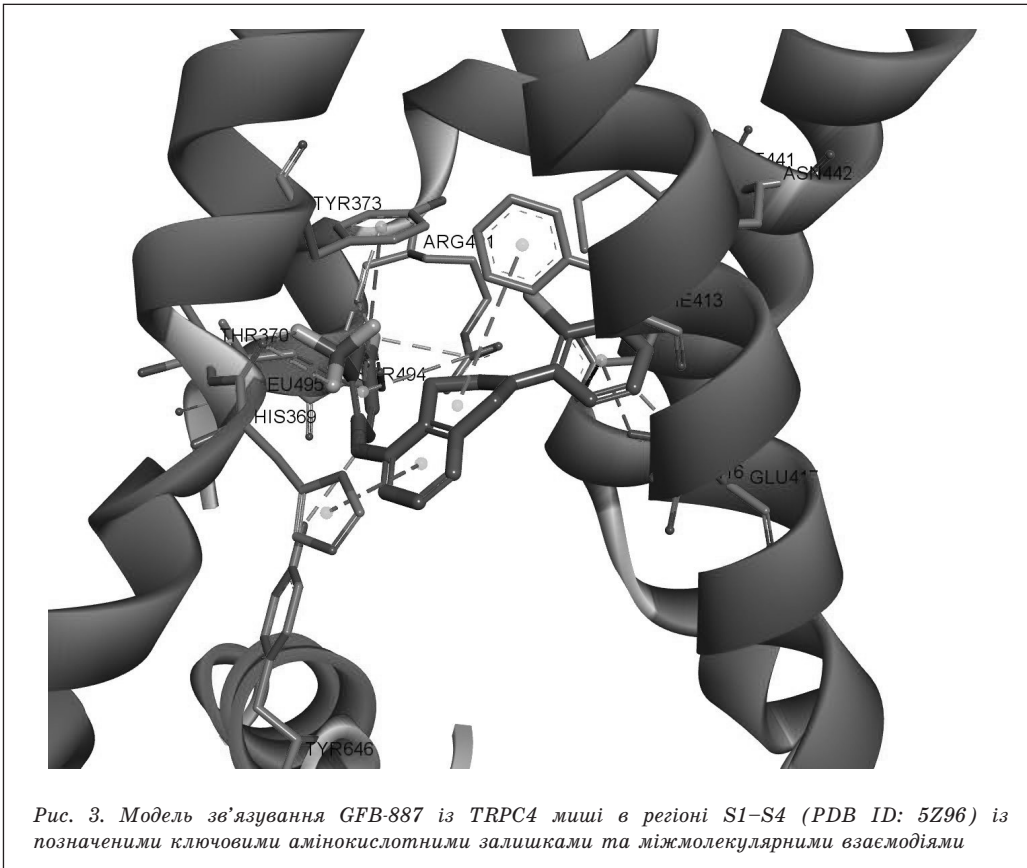


Рис. 2. Ідентифікований сайт зв'язування в регіоні S1–S4 каналу TRPC4 (PDB ID: 5Z96), який використаний для проведення молекулярного докінгу

аналіз потенційного сайту зв'язування. Крім того, ця структура широко використовується як репрезентативна модель TRPC4 у структурно-функціональних дослідженнях. У результаті докінгу GFB-887 у структуру 5Z96 було згенеровано п'ять енергетично найсприятливіших поз ліганду. Фінальний комплекс TRPC4:GFB-887 було обрано на основі сукупності критеріїв, що включали мінімальну енергію зв'язування, просторову узгодженість із попередньо ідентифікованим сайтом зв'язування та відповідність відомим експериментальним даним щодо локалізації інгібіторів TRPC4 у трансмембранному домені. Обрана докінгова поза GFB-887 характеризувалася енергією зв'язування – 8,11 ккал/моль і демонструвала стабільне розміщення ліганду в запропонованому сайті зв'язування (рис. 3).

У сформованому комплексі TRPC4:GFB-887 ліганд розташовується між спіралями трансмембранного домену, займаючи конформацію, що забезпечує щільне заповнення кишені. Гетероциклічне ядро GFB-887 орієнтоване в бік залишків Phe413, Tyr373 та Tyr646, формуючи стабілізуюче гідрофобно-ароматичне оточення. Фіксація ліганду в цій області забезпечується поєднанням  $\pi$ - $\pi$  stacking,  $\pi$ - $\pi$  T-shaped,  $\pi$ -alkyl і  $\pi$ - $\sigma$  взаємодій з ароматичними й аліфатичними фрагментами бічних ланцюгів, а також ван-дер-ваальсовими контактами. Додаткову стабілізацію та орієнтацію молекули в кишені забезпечує система полярних і електростатичних контактів із залишками His369, Glu417, Asp438, Asn442, Arg491 та Ser494. Залежно від локальної геометрії та протонаційного



стану бічних ланцюгів ці взаємодії реалізуються у вигляді конвенційних водневих зв'язків, а також  $\pi$ -cation і  $\pi$ -anion взаємодій за участю заряджених залишків. Окрім цього, відіграють роль у стабілізації комплексу гідрофобні залишки Met441, Leu492 та Leu495, які формують неполярне мікросередовище навколо відповідних фрагментів GFB-887 і беруть участь переважно в утворенні ван-дер-ваальсових і  $\pi$ -alkyl контактів. Додатково, наявність атомів флуору в структурі ліганду зумовлює формування галогенної взаємодії, що може робити внесок у локальну стабілізацію комплексу в трансмембранній кишені, трансмембранних сайтах іонних каналів.

Отримані дані узгоджуються з кріо-ЕМ структурами комплексів TRPC4 *Danio rerio* із інгібіторами серії GFB (PDB ID: 7B05, 7B0S, 7B16), які взаємодіють у сайті в межах VSL-домену, що просторово межує з TRP-спіраллю [3]. У цих структурах показано, що інгібітори даного хемотипу займають замкнену порожнину сайту та контактують із залишками Tyr373, Phe413, Met441, Asn442, Arg491, Leu492, Leu495 та Tyr646. Локалізація GFB-887 у цій ділянці є просторово сумісною з описаним у літературі положенням інгібіторів GFB-серії у структурах TRPC4. Також, додатковим підтвердженням отриманих результатів є інша робота, де було представлено кріо-ЕМ структуру TRPC5 людини в комплексі з інгібітором клемізолом. Було встановлено, що клемізол взаємодіє із внутрішньою порожниною VSL-домену кожної субодиниці та стабілізує закриту конформацію каналу при фіксації в цій кишені [4].

Аналіз прогнозованих ADMET-властивостей GFB-887 проводиться для інтерпретації його фармакокіне-

тичного та безпекового профілю з позицій експериментальних ADME-параметрів, що використовуються в галузі розробки лікарських засобів. Такий підхід дозволяє порівняти наявні клінічні спостереження з характеристиками, які зазвичай формують доклінічне уявлення про поведінку сполук, та окреслити напрями подальшої експериментальної перевірки. Прогнози отримані за допомогою моделі, що описана в роботі Stratiichuk та ін. [13], натренованої на експериментальних наборах даних, взятих на платформі TDC [14, 16]. Для оцінки застосовано класифікаційні та регресійні моделі. Класифікаційні моделі повертають імовірність належності до певного класу, який сформований за емпіричним порогом і закладений у модель на етапі навчання. Регресійні моделі прогнозують числове значення параметра у фізичних одиницях.

Було проведено оцінку за такими параметрами: проникність через моношар клітин аденокарциноми товстої кишки людини Caco-2 (Caco-2), кишкова абсорбція у людини (HIA), інгібування P-глікопротеїну (P-gp inhibition), проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр (BBB), зв'язування з білками плазми (PPB), об'єм розподілу у стаціонарному стані (VDss), чи є сполука субстратом ізоформ цитохрому P450 – CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, інгібування цих ізоформ, тест Еймса, лікарсько-індуковане ураження печінки (DILI) та інгібування калієвого каналу, який кодований геном human ether-a-go-go-related gene (hERG).

Серед наведених параметрів першочергову увагу привертають показники, що характеризують абсорбцію сполуки. Прогнозований коефіцієнт проникності (Papp) крізь моношар клітин Caco-2 становив  $1,46 \cdot 10^{-5}$  см/с,

що вказує на високу проникність і свідчить про сприятливий потенціал пасивної дифузії крізь кишковий епітелій. Узгоджено з цими даними, класифікаційний показник НІА дорівнював 0,9735, тобто, модель із високою ймовірністю відносить GFB-887 до класу сполук з ефективною кишковою абсорбцією. У доступних публікаціях щодо GFB-887 не наведено числових результатів *in vitro* тестів проникності Сасо-2 або інших кількісних оцінок кишкової абсорбції, що придатні для прямого порівняння. Доклінічні дослідження фармакокінетики показали, що пероральне введення GFB-887 у щурів із трансплантованими людськими органами забезпечує вимірювану концентрацію препарату як у плазмі, так і в тканинах органів, що опосередковано підтверджує здатність сполуки до надходження в системний кровотік після перорального застосування [17]. Крім того, у клінічному описі першого дослідження за участю людини зазначено, що сполука характеризувалася фармакокінетичним профілем, сумісним із режимом одноразового добового дозування та сприятливим профілем безпеки [8, 18]. Хоча такі клінічні дані не є прямим еквівалентом експериментальних ADME-параметрів, вони опосередковано підтверджують відсутність обмежень із боку абсорбції, що узгоджується з високими прогностичними значеннями Сасо-2 та НІА. Додатково, для ендпойнта P-gp inhibition отримано значення 0,4474, що відповідає помірній імовірності інгібування P-gp і не дозволяє зробити однозначний висновок без експериментальної перевірки. У літературі для GFB-887 також відсутні дані щодо взаємодії з транспортерами, тому цей параметр набуває особливої ваги як напрям для подальшої валідації.

Показники, що характеризують розподіл сполуки в організмі, мали такі прогностичні значення: BBB – 0,6004, плазмове зв'язування з білками – 95,8 %, а VDss – 0,95 л/кг. Публічні клінічні матеріали не містять детальних даних щодо співвідношення концентрацій у мозку та плазмі, фракції вільної речовини або параметрів розподілу в термінах VDss, тому ці значення доцільно розглядати як прогностичні оцінки. Водночас із точки зору фармакокінетики поєднання високого зв'язування з білками плазми крові та помірного об'єму розподілу є типовим для сполук, що тривалий час утримуються в системній циркуляції та характеризуються відносно повільним зниженням концентрації в плазмі. Така конфігурація параметрів не суперечить клінічно задекларованому режиму одноразового добового дозування для GFB-887 [8], хоча сама по собі ця узгодженість не може розглядатися як підтвердження коректності числових прогнозів.

Класифікаційна модель, яка прогнозує, чи є сполука субстратом деяких ізоформ CYP, показала високу ймовірність належності GFB-887 до субстратів CYP3A4 (0,9982) та CYP2C9 (0,8018) і низьку – для CYP2D6 (0,1809). Водночас модель інгібування CYP дала низькі значення для всіх трьох ізоформ: CYP2C9 (0,1178), CYP2D6 (0,0198) та CYP3A4 (0,1784). Таке поєднання результатів означає, що за прогнозом GFB-887 може метаболізуватися переважно за участю CYP3A4 і частково CYP2C9, водночас малоімовірно виступаючи інгібітором цих ферментів. Тобто, модель вказує на участь системи CYP у біотрансформації сполуки без ознак значущого пригнічення активності відповідних ізоформ. У доступних

клінічних публікаціях щодо GFB-887 відсутні експериментальні дані *in vitro* та *in vivo*, які б характеризували СYP-субстратність чи СYP-інгібування у форматі, який придатний для прямого порівняння [8, 18]. Тому ці результати слід розглядати як прогностичні оцінки, що визначають доцільність подальшої експериментальної перевірки участі СYP3A4 та СYP2C9 у метаболізмі сполуки.

Для GFB-887 класифікаційні прогнози токсикологічних ендпойнтів становили: імовірність мутагенності за тестом Еймса – 0,2113, індекс DILI – 0,8861, а показник потенційного блокування hERG – 0,5244.

Низьке значення тесту Еймса свідчить про низьку ймовірність генотоксичної активності сполуки. Водночас для молекул із подібною хімічною архітектурою, що не містять типових електрофільних або реакційноздатних фрагментів, логічно, що цей параметр прогнозується як негативний на підставі загальних структурних ознак. Тому в даному випадку прогноз тесту Еймса доцільно розглядати не як ключовий індикатор безпеки, а як підтвердження узгодженості токсикологічного прогнозу з очікуваними властивостями молекули з точки зору її хімічної будови. Для DILI отримано високе значення, однак у доступних джерелах відсутні дані, які придатні для прямого чи опосередкованого порівняння. Для hERG отримано значення 0,5244, що відповідає його ймовірній блокаді, проте в клінічних описах зазначено, що безпековий моніторинг включав електрокардіограму і не виявив клінічно значущих відхилень [8]. Це не замінює *in vitro* тесту блокування hERG, однак дозволяє співставити наявні клінічні факти з отриманим прогнозом.

Окремою й завершальною складовою дослідження було експериментальне оцінювання впливу GFB-887 на карбахол-індуковану скоротливість гладенької мускулатури тонкої кишки миші *in vitro* методом ізометричної тензометрії, що дозволило охарактеризувати функціональні ефекти сполуки в тканинній моделі ileum тонкої кишки миші *in vitro*. З наших власних досліджень та інших авторів добре відомо, що центральним компонентом холінергічного збудження та скорочення гладеньких м'язів кишечника є саме рецептор-керований TRPC4 канал, тому нами була обрана саме ця експериментальна модель для дослідження фармакологічних ефектів GFB-887 на TRPC4 канали в нативних клітинах [1–21].

Перед застосуванням агоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів карбахолу (КХ) підтверджували збереження функціональної активності препарату шляхом додавання гіперкалієвого розчину з концентрацією  $K^+$  60 ммоль/л, що викликало виражене скорочення та свідчило про фізіологічну інтактність та активність тканини (рис. 4).

Після відмивання гіперкалієвого розчину аплікація КХ (50 мкмоль/л) спричиняла пікову фазу скоротливої відповіді із наступним плато, тобто, тонічним скороченням. Далі після проведення контрольного тесту з КХ препарат відмивали в розчині Кребса протягом 20 хв, після чого до перфузійного середовища додавали GFB-887 у концентрації 10 мкмоль/л. По завершенню 20-хв інкубації препарату в розчині з GFB-887 повторно додавали КХ у тій самій концентрації, що й у контролі (50 мкмоль/л). За цих умов скоротлива реакція на КХ після попередньої обробки GFB-887 була суттєво зниженою і становила приблизно 40–50 % від контрольної відповіді на

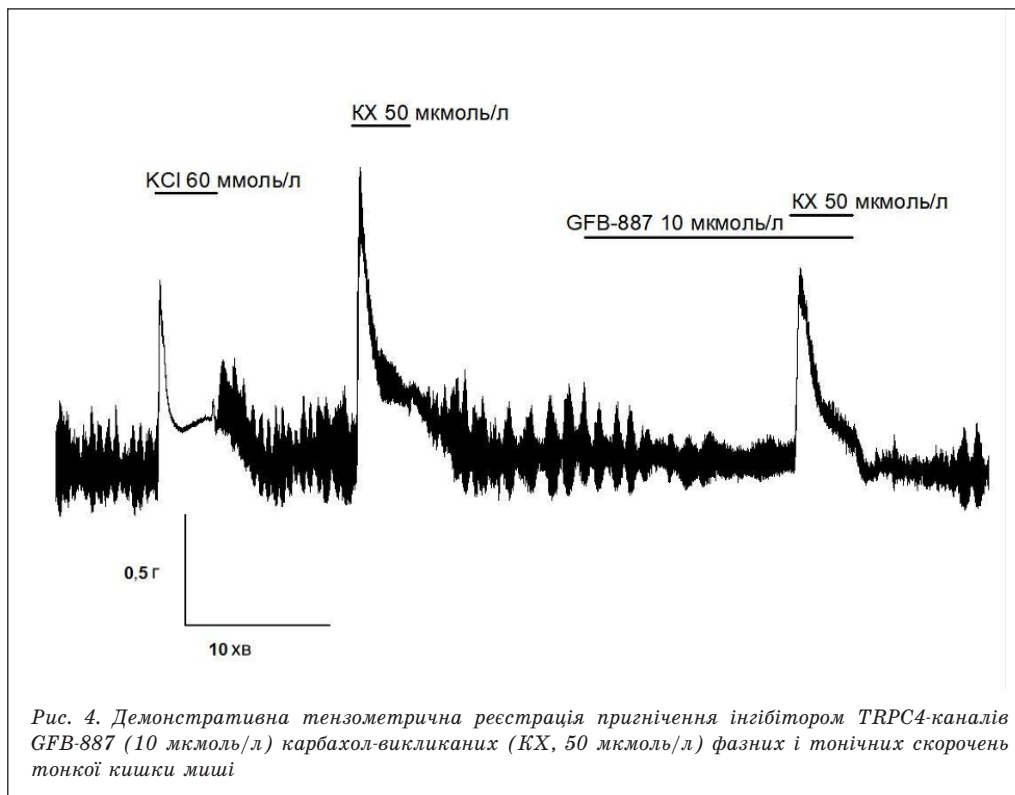


Рис. 4. Демонстративна тензометрична реєстрація пригнічення інгібітором TRPC4-каналів GFB-887 (10 мкмоль/л) карбахол-викликаних (КХ, 50 мкмоль/л) фазних і тонічних скорочень тонкої кишки миші

КХ (рис. 4). Виявлене тензометрією пригнічення холінергічно індукованої скоротливості узгоджується з клінічними проявами порушень із боку шлунково-кишкового тракту та підкреслює значущість ацетилхолін-залежного шляху ініціації скорочень кишечника.

У наших нещодавніх дослідженнях були отримані результати, де показано, що інший високоселективний інгібітор Pico145 у пікомольних концентраціях майже повністю блокує TRPC4-опосередкований індукований мускариновими рецепторами катіонний струм ( $mI_{CAT}$ ) та пов'язані  $Ca^{2+}$ -сигнали. Також Pico145 дозозалежно послаблював як спонтанні, так і КХ-індуковані скорочення (у поздовжньому й циркулярному шарах) і уповільнював кишковий транзит після проходження вмісту, підтверджуючи ключову роль

TRPC4-каналів у холінергічному збудженні гладеньких м'язів кишечника та визначаючи також потенційні як позитивні, так і негативні ефекти фармакологічного блокування TRPC4-каналів [7].

Експериментальні дані інших наукових груп свідчать про те, що окремі новосинтезовані модулятори TRP-каналів можуть виявляти психотропні властивості, зокрема й антидепресантний та анксиолітичний потенціал. Зокрема, для селективного інгібітора TRPC4/TRPC5-каналів M084 у мишей продемонстровано антидепресантоподібні та анксиолітичноподібні ефекти після гострого введення, що вказує на залучення TRPC4/TRPC5-опосередкованих механізмів до регуляції афективної поведінки [22]. Узгоджені результати отримано і для HC-070 – нового низькомолекулярного потужного антагоніста TRPC4 і TRPC5,

застосування якого супроводжувалося вираженим анксиолітичним та антидепресантоподібним ефектом у поведінкових тестах на мишах [23]. Сукупно ці спостереження підтримують концепцію терапевтичної доцільності фармакологічного таргетування TRPC4/TRPC5 при розладах, що характеризуються тривожно-депресивною симптоматикою, водночас підкреслюючи необхідність подальшого з'ясування молекулярних механізмів дії та трансляційної релевантності отриманих ефектів [22, 23].

### Висновки

У роботі запропоновано трансмембранний сайт зв'язування TRPC4 у трансмембранному регіоні S1–S4 для GFB-887 шляхом поєднання геометричного прогнозування порожнин із літературно зумовленою пріоритетністю амінокислотних залишків, що дозволило обґрунтовано визначити область для подальшого молекулярного докінгу. Молекулярний докінг GFB-887 у структуру TRPC4 (PDB ID: 5Z96) показав енергетично сприятливу позу (енергія зв'язуван-

ня – 8,11 ккал/моль) в даному сайті з мережею гідрофобно-ароматичних і полярних контактів, які узгоджені з наявними даними кріо-ЕМ. Функціональні експерименти *in vitro* тензометрії продемонстрували, що попередня інкубація з GFB-887 (10 мкмоль/л) суттєво знижує КХ-індуковану скоротливу відповідь ileum миші (до приблизно 40–50 % від контролю), в активації якої центральну роль відіграють рецептор-керовані TRPC4 канали. Отримані структурні та функціональні результати в сукупності узгоджуються з важливістю TRPC4-опосередкованих механізмів у холінергічному збудженні й скороченні гладеньких м'язів кишечника та підкреслюють фармакологічну релевантність модуляції цих каналів. Разом із даними щодо поведінкових ефектів інших селективних інгібіторів TRPC4 та TRPC5 каналів результати вказують на терапевтичний потенціал таргетування цих каналів і потребують подальшого уточнення молекулярних структур цих білків та їхніх взаємодій із відомими лігандами.

1. Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Nilius B., V. Flockerzi (Eds.). Handbook of Experimental Pharmacology, 222. Springer. 2014.
2. Structure of the mouse TRPC4 ion channel. J. Duan, Z. Li, J. Li et al. *Nature Communications*. 2018. V. 9. P. 3102.
3. Structural basis of TRPC4 regulation by calmodulin and small-molecule inhibitors. D. Vinayagam, D. Qiu, J. Yang et al. *eLife*. 2020. V. 9. P. e60603.
4. Structural basis for human TRPC5 channel inhibition by two distinct inhibitors. K. Song, M. Wei, W. Guo et al. *eLife*. 2021. V. 10. P. e63429.
5. Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels. M. Miller, J. Shi, Y. Zhu et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2011. V. 286 (38). P. 33436–33446.
6. (–)-Englerin A is a potent and selective activator of TRPC4 and TRPC5 calcium channels. Y. Akbulut, H. J. Gaunt, K. Muraki et al. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015. V. 54 (12). P. 3787–3791.
7. Pico145 inhibits TRPC4-mediated  $mI_{CAT}$  and postprandial small intestinal motility. D. O. Dryn, M. I. Melnyk, R. S. Bon et al. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023. V. 168. P. 115672.
8. Safety and efficacy of GFB-887, a TRPC5 channel inhibitor, in patients with focal segmental glomerulosclerosis, treatment-resistant minimal change disease, or diabetic nephropathy: TRACTION-2 trial design. L. Walsh, J. F. Reilly, C. Cornwall et al. *Kidney International Reports*. 2021. V. 6 (10). P. 2575–2584.
9. Leveraging large language models for literature-driven prioritization of protein binding pockets. R. Stratiichuk, M. Melnychenko, I. Koleiev et al. *Bioinformatics*. 2025. V. 41 (8). P. btaf449.
10. Le Guilloux V., Schmidtke P., Tuffery P. Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. P. 168.

11. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom et al. *Journal of Computational Chemistry*. 2009. V. 30 (16). P. 2785–2791.
12. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday et al. *Journal of Computational Chemistry*. 1998. V. 19 (14). P. 1639–1662.
13. Improving ADMET prediction with descriptor augmentation of Mol2Vec embeddings. R. Stratiichuk, N. Shevchuk, R. Kyrylenko et al. *bioRxiv*. 2025. <https://doi.org/10.1101/2025.07.14.664363>.
14. Therapeutics Data Commons: Machine learning datasets and tasks for drug discovery and development. K. Huang, T. Fu, W. Gao et al. *arXiv*. 2021. V. 2102. P. 09548. <https://arxiv.org/abs/2102.09548>.
15. Electron cryo-microscopy structure of the canonical TRPC4 ion channel. D. Vinayagam, T. Mager, A. Apelbaum et al. *eLife*. 2018. V. 7. P. e36615.
16. Artificial intelligence foundation for therapeutic science. K. Huang, T. Fu, W. Gao et al. *Nature Chemical Biology*. 2022. V. 18 (10). P. 1033–1036.
17. Transplanted organoids empower human preclinical assessment of drug candidate for the clinic. A. D. Westerling-Bui, E. M. Fast, T. W. Soare et al. *Science Advances*. 2022. V. 8 (27). P. eabj5633.
18. ClinicalTrials.gov. (n.d.). A first-in-human, phase 1, placebo-controlled study to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of GFB-887 (Identifier: NCT03970122). ClinicalTrials.gov. RLU: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03970122>.
19. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. T. B. Bolton, S. A. Prestwich, A. V. Zholos, D. V. Gordienko. *Annual Review of Physiology*. 1999. V. 61. P. 85–115.
20. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility *in vivo*. V. V. Tsvilovskyy, A. V. Zholos, T. Aberle et al. *Gastroenterology*. 2009. V. 137 (4). P. 1415–1424.
21. Zholos A. V., Melnyk M. I., Dryn D. O. Molecular mechanisms of cholinergic neurotransmission in visceral smooth muscles with a focus on receptor-operated TRPC4 channel and impairment of gastrointestinal motility by general anaesthetics and anxiolytics. *Neuropharmacology*. 2024. V. 242. P. 109776.
22. Acute treatment with a novel TRPC4/C5 channel inhibitor produces antidepressant and anxiolytic-like effects in mice. L. P. Yang, F. J. Jiang, G. S. Wu et al. *PLOS ONE*. 2015. V. 10 (8). P. e0136255.
23. Treatment with HC-070, a potent inhibitor of TRPC4 and TRPC5, leads to anxiolytic and antidepressant effects in mice. S. Just, B. L. Chenard, A. Ceci et al. *PLOS ONE*. 2018. V. 13 (1). P. e0191225.

**Р. О. Стратійчук, Д. О. Дринь, О. В. Жолос**  
**Структурне моделювання взаємодії GFB-887 із TRPC4 та оцінка його впливу на карбахол-індуковану скоротливість тонкої кишки миші**

Родина каналів транзйентного рецепторного потенціалу (TRP), зокрема канонічні канали TRPC4 і TRPC5, відіграє ключову роль у регуляції кальцієвого сигналювання, мембранної збудливості та скоротливої активності гладеньких м'язів. Фармакологічна модуляція цих каналів розглядається як перспективний підхід для впливу на функцію шлунково-кишкового тракту та інші фізіологічні процеси. Низькомолекулярний інгібітор GFB-887 є клінічно досліджуваною сполукою, однак молекулярні деталі його взаємодії з TRPC4 залишаються недостатньо охарактеризованими.

*Мета дослідження* – з'ясувати можливий характер взаємодії GFB-887 з каналом TRPC4 на основі структурного моделювання та співставити отримані *in silico* результати з функціональним впливом сполуки на карбахол-індуковану скоротливість гладеньких м'язів тонкої кишки миші.

Методи дослідження включали обґрунтоване визначення потенційного сайту зв'язування у структурі TRPC4 шляхом поєднання геометричного прогнозування порожнин (Pocket) із літературно зумовленою пріоритетизацією амінокислотних залишків за допомогою аналізу наукових публікацій. Молекулярний докінг GFB-887 проводили з використанням програми AutoDock 4.2.6 на основі крио-електронної мікроскопії (крио-ЕМ) структури TRPC4 миші (PDB ID: 5Z96). *In silico* оцінку ADMET-властивостей виконували із застосуванням моделей машинного навчання, натренованих на публічно доступних наборах даних платформи Therapeutics Data Commons. Функціональні ефекти GFB-887 оцінювали методом ізометричної тензометрії на ізольованих сегментах ileum тонкої кишки миші.

Результати показали, що найімовірніший сайт зв'язування GFB-887 локалізується в трансмембранному регіоні S1–S4 (VSL-домени) TRPC4, що узгоджується з даними крио-ЕМ структур комплексів TRPC4 з іншими інгібіторами серії GFB. Обрана докінгова поза характеризувалася енергією зв'язування – 8,11 ккал/моль і стабілізувалася системою гідрофобно-ароматичних і полярних взаємодій із функціонально значущими амінокислотними залишками. Прогноз ADMET-властивостей вказав на високу ймовірність ефективної кишкової абсорбції та фармакокінетичний профіль, сумісний із клінічними спостереженнями. У функціональних експериментах попередня інкубація з GFB-887 (10 мкмоль/л) знижувала карбахол-індуковану скоротливість відповідь ileum тонкої кишки миші приблизно до 40–50 % від контрольного рівня.

Отримані структурні та функціональні дані узгоджено свідчать про залучення TRPC4-опосередкованих механізмів до холінергічного збудження гладеньких м'язів кишечника та підтримують гіпотезу про інгібувальну дію GFB-887 через зв'язування у VSL-домени каналу. Поєднання *in silico* та *in vitro*

---

---

підходів є доцільним для подальшого уточнення молекулярних механізмів дії TRPC-модуляторів і їхньої трансляційної релевантності.

*Ключові слова:* TRPC4, GFB-887, сайт зв'язування, ADMET, молекулярний докінг, гладенькі м'язи

**R. O. Stratiichuk, D. O. Dryn, O. V. Zholos**  
**Structural modeling of the interaction between GFB-887 and TRPC4 and evaluation of its effect on carbachol-induced contractility of the mouse small intestine**

The transient receptor potential (TRP) channel family, in particular the canonical TRPC4 and TRPC5 channels, plays a key role in the regulation of calcium signaling, membrane excitability, and smooth muscle contractile activity. Pharmacological modulation of these channels is considered a promising approach for influencing gastrointestinal function and other physiological processes. The small-molecule inhibitor GFB-887 is a clinically investigated compound; however, the molecular details of its interaction with TRPC4 remain insufficiently characterized.

*The aim of the study* – to elucidate the possible mode of interaction between GFB-887 and the TRPC4 channel using structural modeling and to correlate the obtained *in silico* results with the functional effects of the compound on carbachol-induced contractility of mouse small intestinal smooth muscle.

The methods included rational identification of a potential binding site in the TRPC4 structure by combining geometry-based cavity prediction (Fpocket) with literature-driven prioritization of amino acid residues using analysis of scientific publications. Molecular docking of GFB-887 was performed using AutoDock 4.2.6 based on the cryo-EM structure of mouse TRPC4 (PDB ID: 5Z96). *In silico* assessment of ADMET properties was carried out using machine-learning models trained on publicly available datasets from the Therapeutics Data Commons platform. Functional effects of GFB-887 were evaluated by isometric tensometry on isolated segments of the mouse ileum.

The results demonstrated that the most probable binding site of GFB-887 is localized within the transmembrane S1–S4 region (VSL domain) of TRPC4, which is consistent with cryo-EM data of TRPC4 complexes with other inhibitors of the GFB series. The selected docking pose was characterized by a binding energy of – 8.11 kcal/mol and was stabilized by a network of hydrophobic-aromatic and polar interactions with functionally significant amino acid residues. ADMET predictions indicated a high probability of efficient intestinal absorption and a pharmacokinetic profile compatible with available clinical observations. In functional experiments, preincubation with GFB-887 (10 μmol/L) reduced the carbachol-induced contractile response of the mouse ileum to approximately 40–50% of the control level.

The obtained structural and functional data consistently indicate the involvement of TRPC4-mediated mechanisms in cholinergic excitation of intestinal smooth muscle and support the hypothesis that GFB-887 exerts its inhibitory action through binding within the VSL domain of the channel. The combination of *in silico* and *in vitro* approaches is appropriate for further elucidation of the molecular mechanisms of action of TRPC modulators and for assessing their translational relevance.

*Key words:* TRPC4, GFB-887, binding site, ADMET, molecular docking, smooth muscle

---

Надійшла: 26 січня 2026 р.

Прийнята до друку: 10 березня 2026 р.

---

**Контактна особа:** Стратійчук Роман, аспірант, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, буд. 64/13, вул. Володимирська, м. Київ. Тел.: + 38 0 44 239 33 33.  
Електронна пошта: romanstratiichuk1@gmail.com