

Ф. Ф. Лахвич, О. Н. Ринейская

ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SILICO* АФФИННОСТИ РИВАРОКСАБАНА К ГЛЮКОКИНАЗЕ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

*Сахарный диабет 2-го типа является актуальной проблемой современного здравоохранения. Сравнение структуры Ривароксабана со строением ряда экспериментальных лекарственных средств, активаторов глюкокиназы, показало перспективность его исследования для разработки лекарственных средств для лечения диабета 2 типа. В исследованиях *in silico* изучено взаимодействие Ривароксабана с глюкокиназой, которая участвует в фосфорилировании глюкозы клеток печени и поджелудочной железы. При помощи методов молекулярного докинга получены комплексы Ривароксабана с протеином в аллостерическом центре, который отвечает за действие активаторов глюкокиназы: минимальная энергия связывания –9,41 ккал/моль. Полученные результаты открывают перспективу разработки новых эффективных противодиабетических лекарственных средств и изучения сопутствующего действия антикоагулянта Ривароксабана.*

Ключевые слова: активаторы глюкокиназы, аллостерический центр, молекулярный докинг, Ривароксабан, сахарный диабет.

T. Lakhvich, V. Ryneiskaya

IN SILICO STUDY OF RIVAROXABAN AFFINITY TO GLUCOKINASE

*Type 2 diabetes mellitus is an urgent problem of health care. Comparison of the structure of the Rivaroxaban with the structure of a number of experimental drugs, which are Glucokinase activators, revealed the perspectives of its evaluation in the drug design for the treatment of type 2 diabetes. In *in silico* experiments, the interaction of Rivaroxaban with glucokinase, which is involved in glucose phosphorylation in liver and pancreas cells, has been studied. Using molecular docking methods, complexes of Rivaroxaban with a protein in the allosteric center responsible for the action of glucokinase activators, were generated: the minimum binding energy was found 9.41 kcal/mol. The results obtained in the experiment *in silico* open the perspectives of design and development of the new effective antidiabetic drugs as well as investigation of the concomitant action of the anticoagulant Rivaroxaban.*

Key words: allosteric center, diabetes mellitus, glucokinase activators, molecular docking, Rivaroxaban.

Сахарный диабет 2-го типа является актуальной проблемой современного здравоохранения. Это хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся резистентностью к инсулину и сопровождающееся гипергликемией и гиперлипидемией. Для коррекции сахарного диабета в настоящее время используется целый ряд лекарственных средств (ЛС), таких как бигуаниды, производные сульфонилмочевины, тиазолидиндионы, агонисты рецепторов глюкагонподобного пептида-1, ингибиторы дипептидилпептидазы-4 [1]. Однако представители вышеназванных групп ЛС имеют серьезные побочные

эффекты, что указывает на необходимость разработки новых противодиабетических ЛС.

Глюкокиназа, или АТФ: D-гексоза 6-фосфотрансфераза (ГК), которая участвует в фосфорилировании глюкозы клеток печени и поджелудочной железы, является перспективной мишенью в поиске новых ЛС, влияющих на углеводный обмен. Данный фермент относится к семейству гексокиназ, внутриклеточных ферментов, ответственных за начальную стадию утилизации глюкозы, на которой глюкоза превращается в глюкозо-6-фосфат. В отличие от других изоферментов гексокиназ, ГК встречается преимущественно

в гепатоцитах и в меньшей степени в нейроэндокринных клетках; она катализирует реакцию фосфорилирования глюкозы только при ее высоких концентрациях и играет важную роль в поддержании гомеостаза глюкозы. Так, в клетках печени активность глюкокиназы напрямую определяет скорость превращения глюкозы в гликоген. При низком уровне глюкозы ГК образует комплекс с регуляторным белком глюкокиназы (РБГК); при повышении уровня глюкозы РБГК замещается глюкозой, что приводит к увеличению активности ГК [2]. В островковых клетках поджелудочной кислоты ГК регулирует секрецию инсулина в ответ на изменение уровня глюкозы в крови. Так, при повышении уровня глюкозы ГК активируется и в клетке продуцируется большое количество АТР, что приводит к инактивации K_{ATP} каналов на поверхности островковых клеток. Как следствие, приток кальция в клетку приводит к высвобождению инсулина и понижению уровня глюкозы крови [3].

Таким образом, ГК играет важную роль в поддержании гомеостаза глюкозы, регулируя её поглощение печенью и секрецию инсулина поджелудочной железой. Так, начиная с 2003 года были предприняты многочисленные попытки дизайна активаторов глюкокиназы с целью разработки новых ЛС для лечения диабета 2 типа [4]. Однако в большинстве случаев исследования были приостановлены на 1–2 стадии клинических испытаний из-за низкой эффективности гипогликемического действия или возникновения побочных эффектов (например, рост уровня триацилглицеролов в крови) при длительном лечении [4, 5]. Поэтому поиск кандидатов для лечения диабета среди ЛС, которые уже используются для лечения других патологий и имеют хорошую доказательную базу об отсутствии побочных эффектов при длительном применении, является перспективным направлением.

Нами ранее была изучена *in silico* аффинность производных оксазолидинона, и в частности Ривароксабана по отношению к различным биологическим мишеням [6]. Анализ структуры Ривароксабана показал, что он содержит ряд групп, которые обеспечивают эффективное связывание с рядом АК; при этом молекула имеет геометрию, которая способствует ее легкой инкорпорации в карманы протеинов различной топологии. Также важным фактором перспективности расширения клинического использования Ривароксабана является то, что приблизительно треть данного ЛС выводится из организма в неизменном виде. Следовательно, можно предполагать, что исследования *in silico* аффинности Ривароксабана к по-

тенциальным лекарственным мишеням имеют прогностически высокие шансы быть валидизированными в исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

Сравнение структуры Ривароксабана со строением ряда экспериментальных ЛС, активаторов ГК, показало перспективность его исследования для разработки ЛС для лечения диабета 2 типа. Поэтому **целью** данного исследования является изучение **аффинности Ривароксабана к глюкокиназе в аллостерическом центре**.

Материалы и методы

Информация о трехмерной структуре фермента глюкокиназа (код белка 4RCH [7]) получена с сайта Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). Для молекулярного докинга *in silico* использовался ряд специализированных программ: программного пакета ChemOffice, AutoDock Tools 1.5.7, программа OpenBabelGUI. Для визуализации и анализа полученных комплексов использовалась программа PyMOL, а также онлайн-серверы Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (<https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) и Protein-Plus (<https://proteins.plus>).

Создание структурных формул соединений выполнено с помощью пакета программ ChemOffice. AutoDock 4 использовался для подготовки лигандов к стыковке с рецептором, расчета сетки потенциалов и непосредственно лиганд-белковых взаимодействий. При стыковке с целью оптимизации процесса в Autodock использовался генетический алгоритм поиска глобального минимума Ламарка (LGA) с числом прогонов 200, размером популяции 300 для жесткого рецептора и гибкого лиганда. Взаимодействие лиганда и белка (аффинность) оценивалось при помощи характеристик, полученных в результате докинга: энергии связывания и константы ингибирования (K_i). В настоящей работе энергией связывания считали наименьшее значение изменения свободной энергии Гиббса при переходе комплекса лиганд-протеин из несвязанного состояния в связанное. Программа OpenBabelGUI использовалась в качестве конвертера форматов, требуемых AutoDock 4, PLIP и Protein-Plus. Поиск центров связывания, изучение характера взаимодействий лигандов с рецептором производился при помощи онлайн-серверов PLIP и Protein-Plus, а также программы PyMOL (центр связывания расматривался в пределах 4 ангстрем от лиганда).

Результаты и их обсуждение. Ривароксабан ((S)-5-хлор-N-((2-оксо-3-(4-(3-оксоморфолино)фенил)оксазолидин-5-ил)метил)-тиофен-2-карбоксамид) – это

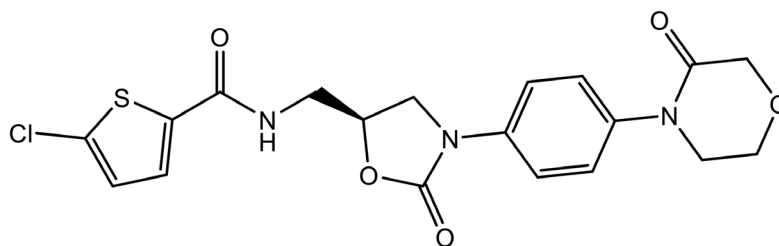


Рисунок 1. Структурная формула Ривароксабана

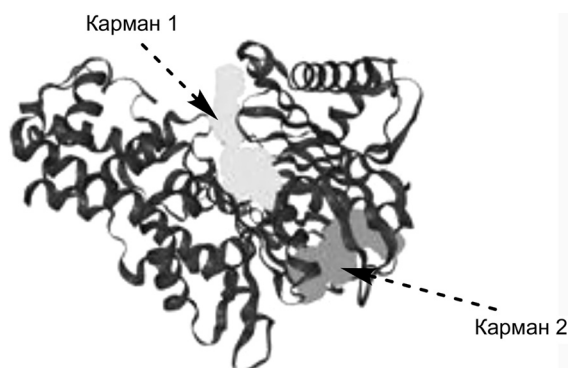


Рисунок 2. Центры связывания глюкокиназы, полученные при помощи онлайн-сервера Protein-Plus.

ЛС, используемое в качестве антикоагулянта. По химическому строению относится к производным оксазолидинона.

Пространственная структура глюкокиназы (4RCH) рассматривалась при помощи онлайн-средств визуализации для определения вероятных центров связывания. «Слепой» докинг Ривароксабана к протеину показал возможность взаимодействия лиганда в пределах двух карманов (рисунок 2); при этом было выделено 63 варианта стыковки из 200 пробегов.

В качестве референтных были взяты лиганды 1 (1-(3-((2-этилпиридин-3-ил)окси)-5-(пиридин-2-илтио)пиридин-2-ил)-3-метилмочевина) и 3 (2-амино-4-фтор-5-[(1-метил-1*h*-имидазол-2-ил)сульфанил]-*n*-(1,3-тиазол-2-ил)бензамид), являющиеся производными пиридилмочевины и бензамидотиазола соответственно (рисунок 3). Данные лиганды ранее изучались как потенциальные активаторы ГК [7, 8].

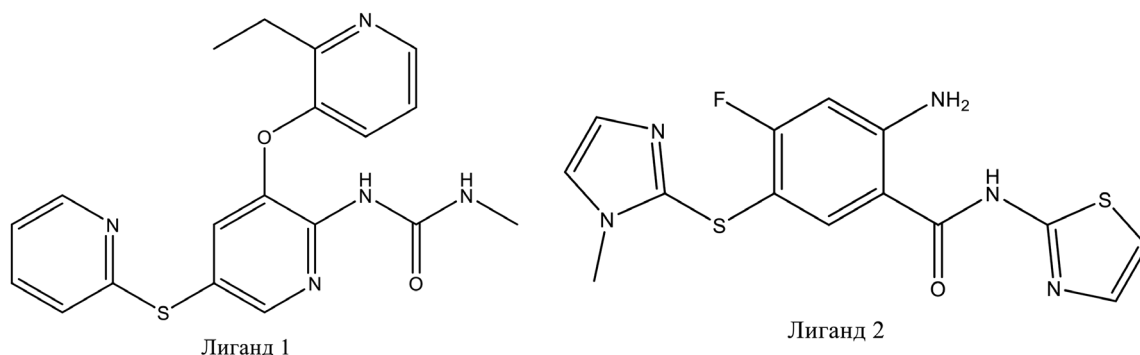


Рисунок 3. Структурные формулы лиганда 1 и лиганда 2

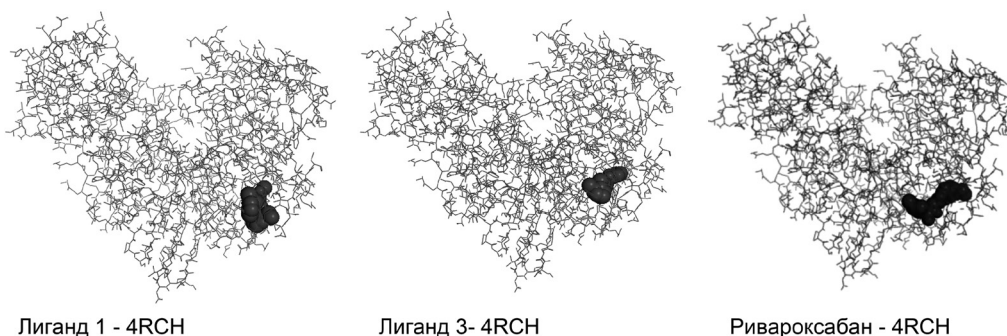


Рисунок 4. Структурные комплексы лигандов 1, 3 и Ривароксабана с протеином 4RCH

Минимальное значение энергии связывания Ривароксабана – 9,41 ккал/моль найдено для стыковки в пределах того же кармана (аллостерического центра), который определен методом рентгеноструктурного анализа для комплекса 4RCH и лигандов 1 и 2 [7, 8] и подтверждены нами *in silico* (энергия связывания – 7,89 ккал/моль и 8,19 соответственно).

Для Ривароксабана были выявлены также комплексы взаимодействия на входе в активный центр фермента (карман 1) с минимальной энергией связывания -7,83 ккал/моль. Однако в данной работе нами проанализировано взаимодействие Ривароксабана с остатками аминокислот (АК) кармана 2, который соответствует предполагаемому аллостерическому центру. Для дальнейшего анализа были выбраны кластеры с наибольшей аффинностью лиганда к протеину (менее -9 ккал/моль) и с числом пробегов не менее 4 (таблица 1).

Таблица 1. Показатели, характеризующие кластеры докинга Ривароксабана и глюкокиназы (4RCH) в области аллостерического центра

№	Минимальная Есвяз., ккал/моль	Ki, нМ	Средняя Есвяз., ккал/моль	Число пробегов в пределах кластера
1	-9,41	125,71	-8,93	4
2	-9,41	127,58	-8,67	12
3	-9,28	157,97	-8,76	7
4	-9,26	162,88	-8,89	12

Комплексы с минимальными энергиями были визуализированы и проанализированы в онлайн-сервисах PyMOL, PLIP и Protein-Plus. Информация о взаимодействиях между атомами лиганда и остатками

Таблица 2. Показатели, характеризующие взаимодействие атомов Ривароксабана и АК протеина комплекса с минимальной энергией кластеров 1, 2 в центре связывания 2

AA	Тип взаимодействия	Межатомное расстояние, Å	
		Комплекс 1	Комплекс 2
63 Arg	Гидрофобное	3,89	3,89
63 Arg	Водородная связь	-	2,09–3,02*
66 Pro	Гидрофобное	3,72	3,59
159 Ile	Гидрофобное	-	3,80
159 Ile	Водородная связь	2,85–3,52	2,89–3,05*
210 Met	Галогеновая связь	3,74	3,74
211 Ile	Гидрофобное	3,52	-
214 Tyr	π-стэкинг	-	4,28
214 Tyr	Гидрофобное	3,40	-
455 Val	Гидрофобное	3,74	-
456 Ala	Гидрофобное	3,21	-
456 Ala	Водородная связь	-	3,32–3,87

* для водородной связи расстояние – атом-Н – атом-донор электронов.

аминокислот АК протеина представлена в таблице 2 и на рисунке 5.

Следует отметить, что во всех проанализированных кластерах для Ривароксабана выделяется взаимодействие хлортиофенового фрагмента с Tyr 214. Это соответствует результатам всех предыдущих исследований по дизайну активаторов ГК различных классов. Так, в различных работах, показана аффинность к Tyr 214 фрагментов пиридина [7], имидазола [8], пиримидина [9]. Кластеры 1 и 2 имеют очень

близкую топологию взаимодействия с мишенью и при этом совпадают по значениям с минимальной энергией связывания (–9,41 ккал/моль).

Помимо указанного выше взаимодействия с Tyr 214, следует отметить взаимодействие с Arg 63 (более сильное для кластеров 1 и 2 и несколько меньше для кластеров–), которое также было подтверждено в исследованиях для других активаторов ГК. При этом, для энтропийно мажорного кластера 2 взаимодействие с Arg 63 становится наиболее значимым за счет образования дополнительной водородной связи. Подобные взаимодействия могут существенно менять топологию всего фермента и обеспечивать активацию ГК за счет блокирования каталитически неактивной супероткрытой конформации. Для всех кластеров характерны взаимодействия Ривароксабана с АК с углеводородными фрагментами (Ile, Val, Met и др.), что также отмечено для лиганда 2, изученного в работе [4]. При этом уменьшение доли других взаимодействий приводит к ожидаемому уменьшению энергии связывания.

Топология взаимодействия Ривароксабана в пределах изученных кластеров соответствует близким суперпозициям, которые легко могут трансформироваться за счет конформационных переходов лиганда. Близость топологии комплексов Ривароксабана с аллостерическим центром ГК и аналогичных комплексов для лигандов 1 и 2 [7–9], которые показали биологическую активность на 1–3 стадиях клинических испытаний, позволяют считать Ривароксабан перспективным кандидатом на валидизацию антидиабети-

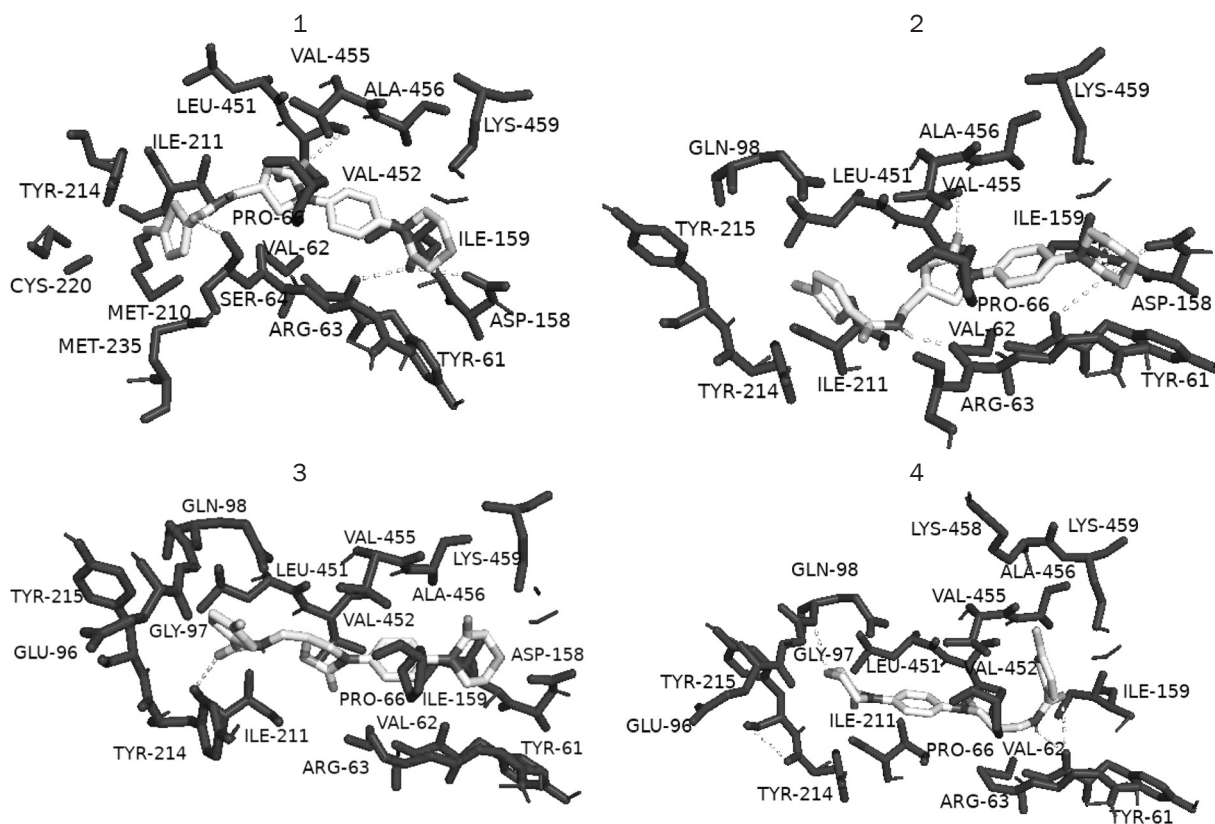


Рисунок 5. Комплексы Ривароксабана с протеином 4RCH с минимальной энергией кластеров 1–4 (Pymol)

ческой активности в моделях *in vivo* и в клинических испытаниях. При этом опыт длительного использования Ривароксабана как антикоагулянта у пациентов среднего и пожилого возраста и, в большинстве случаев, с сочетанной патологией, предполагает отсутствие значительных побочных эффектов, характерных для активаторов ГК других химических групп.

Литература

1. *Inzucchi, S. E.* Current Therapies for the Medical Management of Diabetes. *Obstet Gynecol.* / S. E. Inzucchi, S. K. Majumdar // *Obstetrics & Gynecol.* – 2016. – Vol. 127(4). – P. 780–794. – doi: 10.1097/AOG.0000000000001332.
2. *Lenzen, S. A.* fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289. – P. 12189–94.
3. *Del Guerra, S.* Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes / S. Del Guerra, R. Lupi, L. Marselli [et al.] // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 727–35.
4. *Yixin, Ren.* Glucokinase as an emerging anti-diabetes target and recent progress in the development of its agonists / Yixin Ren [et al.] // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* – 2022. – Vol. 37(1). – P. 606–615.
5. *Tsumura, Y.* TMG123, a novel glucokinase activator, exerts durable effects on hyperglycemia without increasing triglyceride in diabetic animal models / Y. Tsumura [et al.] // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12(2). – P. e0172252.
6. *Lakhvich, T. T.* In silico SAR studies of oxazolidinones as potential anti-tuberculosis drugs. *Advances in medicine and medical sciences: collection of Belarusian state medical university* / T. T. Lakhvich, M. I. Borava, V. M. Ryneiskaya. – 2022. – Vol. 12(2). – P. 200–205.
7. *Ronald, J. Hinklin.* Discovery of 2-Pyridylureas as Glucokinase Activators. *Journal of Medicinal Chemistry* / Ronald J. Hinklin [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 2014. – Vol. 57(19). – P. 8180–8186.
8. *Kamata, K.* Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase / K. Kamata, M. Mitsuya, T. Nishimura, J. Eiki // *Structure.* – 2004. – Vol. 12(3). – P. 429–38.

9. *Tsumura, Y.* Disruptions in hepatic glucose metabolism are involved in the diminished efficacy after chronic treatment with glucokinase activator / Y. Tsumura [et al.] // *PLoS ONE.* – 2022. – Vol. 17(3). – P. e0265761.

References

1. *Inzucchi, S. E.* Current Therapies for the Medical Management of Diabetes. *Obstet Gynecol.* / S. E. Inzucchi, S. K. Majumdar // *Obstetrics & Gynecol.* – 2016. – Vol. 127(4). – P. 780–794. – doi: 10.1097/AOG.0000000000001332.
2. *Lenzen, S. A.* fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289. – P. 12189–94.
3. *Del Guerra, S.* Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes / S. Del Guerra, R. Lupi, L. Marselli [et al.] // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 727–35.
4. *Yixin, Ren.* Glucokinase as an emerging anti-diabetes target and recent progress in the development of its agonists / Yixin Ren [et al.] // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* – 2022. – Vol. 37(1). – P. 606–615.
5. *Tsumura, Y.* TMG123, a novel glucokinase activator, exerts durable effects on hyperglycemia without increasing triglyceride in diabetic animal models / Y. Tsumura [et al.] // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12(2). – P. e0172252.
6. *Lakhvich, T. T.* In silico SAR studies of oxazolidinones as potential anti-tuberculosis drugs / Lakhvich T. T. Lakhvich, M. I. Borava, V. M. Ryneiskaya // *Advances in medicine and medical sciences: collection of Belarusian state medical university.* – 2022. – Vol. 12(2). – P. 200–205.
7. *Ronald, J. Hinklin.* Discovery of 2-Pyridylureas as Glucokinase Activators / Ronald J. Hinklin [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 2014. – Vol. 57(19). – P. 8180–8186.
8. *Kamata, K.* Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase / K. Kamata, M. Mitsuya, T. Nishimura, J. Eiki // *Structure.* – 2004. – Vol. 12(3). – P. 429–38.
9. *Tsumura, Y.* Disruptions in hepatic glucose metabolism are involved in the diminished efficacy after chronic treatment with glucokinase activator / Y. Tsumura [et al.] // *PLoS ONE.* – 2022. – Vol. 17(3). – P. e0265761.

Поступила 23.02.2023 г.