

УДК 615.214.24:577.25:544.272

Параметры галогеновой связи как детерминанты лиганд-лигандных взаимодействий гипокретина с Суварексантом и его галоген-аналогами

Лахвич Ф. Ф., Терлецкая В. А.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Определены параметры влияния галогеновой связи (влияние свободной энергии связывания, константы ингибирования, площади взаимодействия от угла, длины и энергии галогеновой связи) на афинность *Суворексанта* и его структурных аналогов к гипокретину.

Ключевые слова: галогеновая связь, гипокретин, лиганд-лигандные взаимодействия, молекулярный докинг, снотворные средства, *Суворексант* и его аналоги.

Введение. Бессонница является наиболее распространенным нарушением сна в мире. По данным Национального фонда сна США, 48 % населения сообщают о временной бессоннице, 22 % страдают бессонницей каждую ночь в течение длительного времени. В соответствии с Международной классификацией расстройств сна бессонница характеризуется нарушенным сном, приводящим к ухудшению жизнедеятельности днем (усталость, снижение памяти, плохая успеваемость, раздражительность, дневная сонливость и склонность к ошибкам). К нарушенному сну относят затрудненное засыпание, раннее утреннее пробуждение, плохой сон.

Для лечения бессонницы проводится когнитивно-поведенческая и фармакологическая терапия. В качестве лекарственных средства используются агонисты бензодиазепиновых рецепторов, седативные лекарственные средства и агонисты мелатониновых рецепторов. Во время применения препаратов из данной группы высок риск развития толерантности, зависимости и нежелательных побочных эффектов психического характера.

Хотя первичная бессонница и классифицируется как расстройство сна, она является следствием физиологической гиперактивности во время сна и бодрствования. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось (ГГНО) играет фундаментальную роль в реакции на стресс. Повышенный уровень кортизола при бессоннице интерпретируется как отражение стресса, вызванного ночным бодрствованием. Увеличение продукции адренокортикотропного гормона (АКТГ) и кортизола индуцируется высвобождением кортикотропин-рилизинг-гормона из паравентрикулярного ядра гипоталамуса.

В конце XX в. было указано, что в цикле сон — бодрствование орексины являются нейротрансмиттерами, способствующими пробуждению [1]. Нейроны, продуцирующие орексиновые рецепторы А и В, находятся в латеральном гипоталамусе. Они широко иннервируют ЦНС, особенно области, известные своей ролью в стимуляции возбуждения — голубое пятно, туберомаммилярное ядро, передний мозг, кору больших полушарий и спинной мозг. Активность орексинергических нейронов зависит от степени бодрствования: она высока при активном бодрствовании и уменьшается во время спокойного бодрствования и сна.

Орексины проявляют свое действие посредством взаимодействия с двумя G-белковыми рецепторами, называемыми OX_1R и OX_2R . Эти рецепторы обладают различным сродством к орексинам: в то время как OX_A связывается с обоими рецепторами, OX_B селективно связывается с OX_2R [2].

Отличие в распределении орексиновых рецепторов и в аффинности к ним позволяют предположить, что OX_1R и OX_2R играют различную роль в поддержании бодрствования. Трансгендерные мыши, у которых отсутствует один из рецепторов, демонстрируют различные степени нарушения сна. У мышей, лишённых OX_1R , не наблюдается каких-либо явных поведенческих изменений, у мышей без OX_2R проявляются некоторые особенности нарколепсии [3]. У мышей без обоих рецепторов обнаружены наиболее глубокие нарушения: нарколепсия с катаплексией [4]. Это указывает на синергизм OX_1R и OX_2R в поддержании бодрствования.

Если принять во внимание, что активация орексинергической системы способствует бодрствованию, антагонисты орексиновых рецепторов могут предложить очень эффективную терапевтическую альтернативу при бессоннице.

Антагонисты орексиновых/гипокретининовых рецепторов являются новым фармакологическим средством лечения бессонницы. Орексинергическая/гипокретинергическая система тесно связана с циклом сон — бодрствование из-за ее роли в стимуляции и поддержании возбуждения [5]. Кроме того, было показано, что антагонизм к орексиновым рецепторам вызывает сонливость у разных видов [6]. В клинических испытаниях антагонисты орексиновых рецепторов показали хорошие результаты: испытуемые сообщили об улучшении качества сна с небольшим количеством побочных эффектов.

Изучаемые в настоящее время антагонисты орексиновых рецепторов подразделяют на одиночные антагонисты (ОАОР) и двойные антагонисты (ДАОР).

SB-334867 был первым ЛС группы ОАОР, предназначенным для селективного антагонизма OX_1R (рисунок 1). Снотворное действие SB-334867 было слабовыраженным, однако была показана эффективность для лечения наркомании, ожирения и панических расстройств [7].

Другие селективные антагонисты OX_1R из группы ОАОР включают SB-408124, SB-674042 и новейший АК-335827. Ни один из них не обладает выраженным снотворным действием [8].

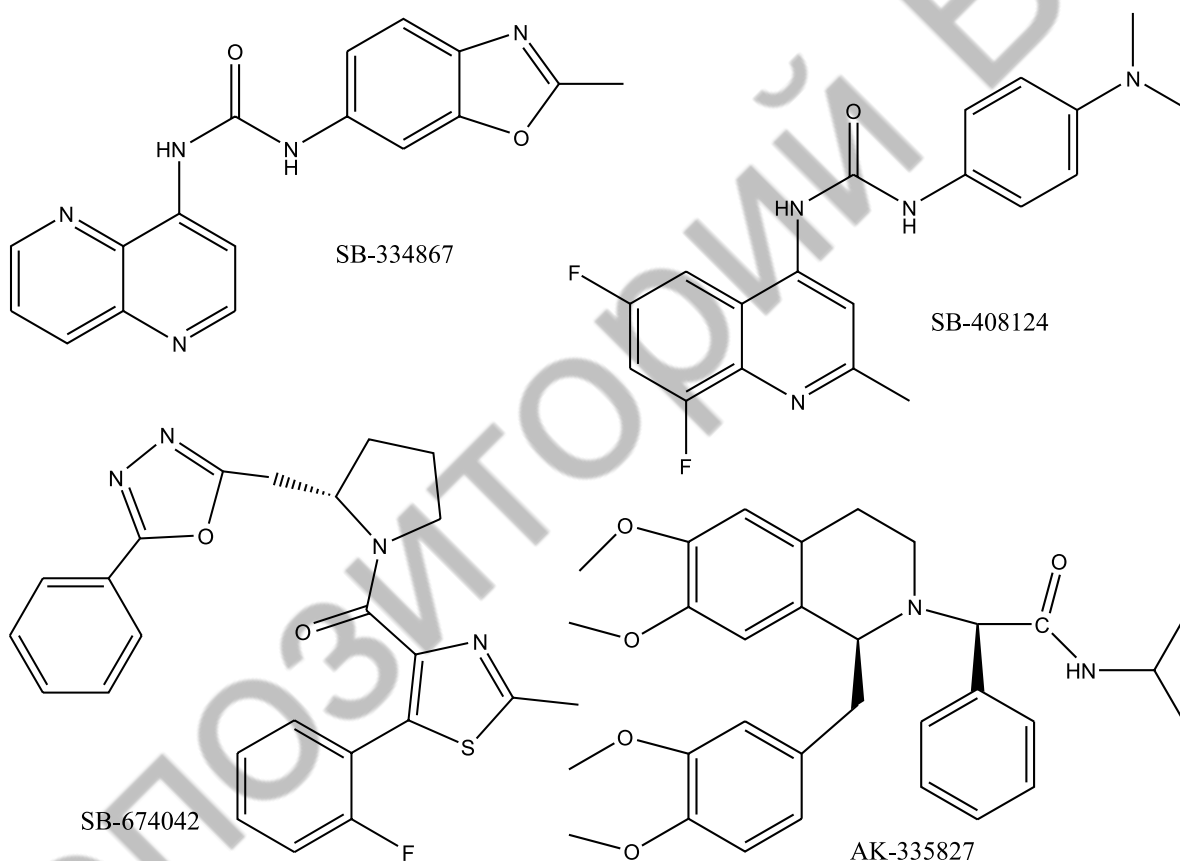
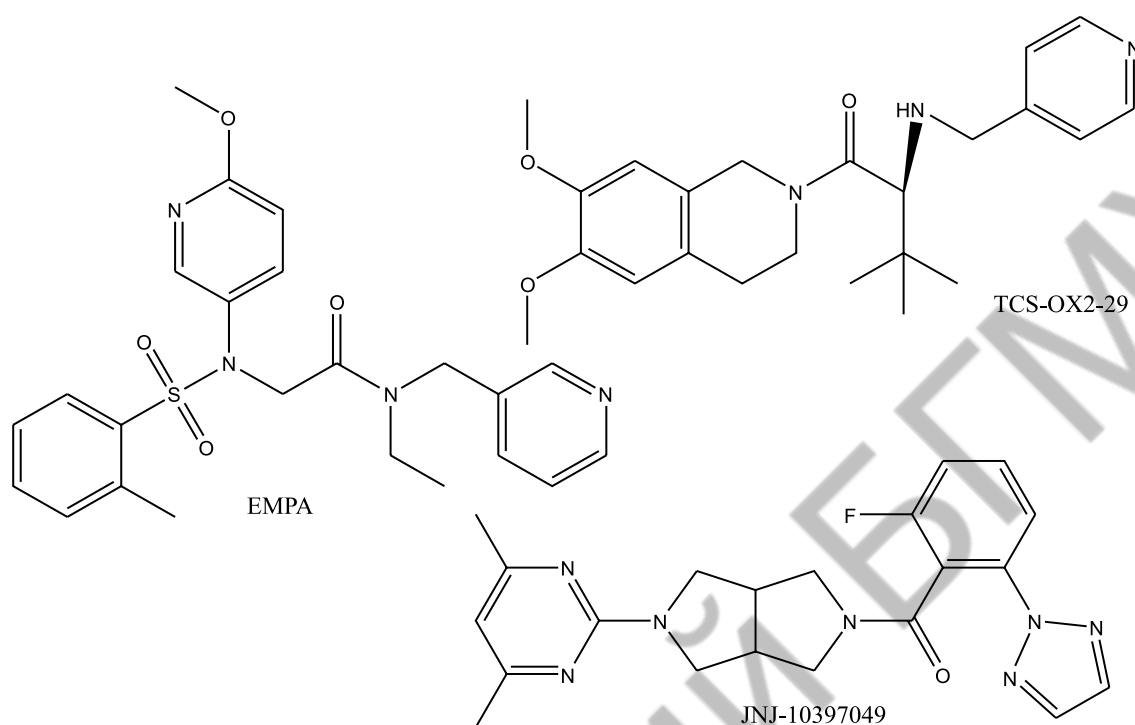


Рисунок 1 — Селективные антагонисты OX_1R

Так, OX_2R экспрессируются как в паравентрикулярном, так и в туберомамиллярном ядре. ПВЯ является частью ГНО, чрезмерная активация которой является одним из факторов первичной бессонницы. Блокировка орексинергических стимулов к паравентрикулярному ядру (ПВЯ) может привести к появлению соответствующего лекарственного действия. Кроме того, туберомамиллярное ядро (ТМЯ), гистаминергическое ядро, обладает возбуждающим действием. Ингибирование ТМЯ может способствовать засыпанию.

Ниже представлены формулы веществ (рисунок 2), которые были изучены в качестве потенциальных OX_2R -антагонистов для лечения бессонницы, можно выделить ЕМРА, ТСS- OX_2 -29 и JNJ-10397049. Антагонисты данного типа показали более выраженный снотворный эффект по сравнению с антагонистами OX_1R .

Рисунок 2 — Селективные антагонисты OX₁R

Наибольший снотворный эффект показал субстрат JNJ-10397049, испытание которого на лабораторных животных показало увеличение продолжительности сна на 42% с сохранением соотношения быстрого и медленного сна. Кроме того, показано, что это соединение уменьшает высвобождение гистамина в голубом пятне [9].

Логично предположить, что антагонизм к обоим орексиновым рецепторам вызовет наибольший снотворный эффект, поэтому в настоящее время большинство исследований направлено на разработку ДАОР. ДАОР являются единственной группой ЛС, которые одобрены и/или проходят клинические испытания как ЛС для лечения бессонницы.

В 2014 г. в США для лечения бессонницы был одобрен Суворексант (МК-4305) (рисунок 3). ЛС в дозе 10 мг увеличивает продолжительность сна, наиболее частые побочные эффекты — сонливость, головокружение, головная боль. В 2019 г. в США для лечения бессонницы был одобрен еще один ДАОР Лемборексант.

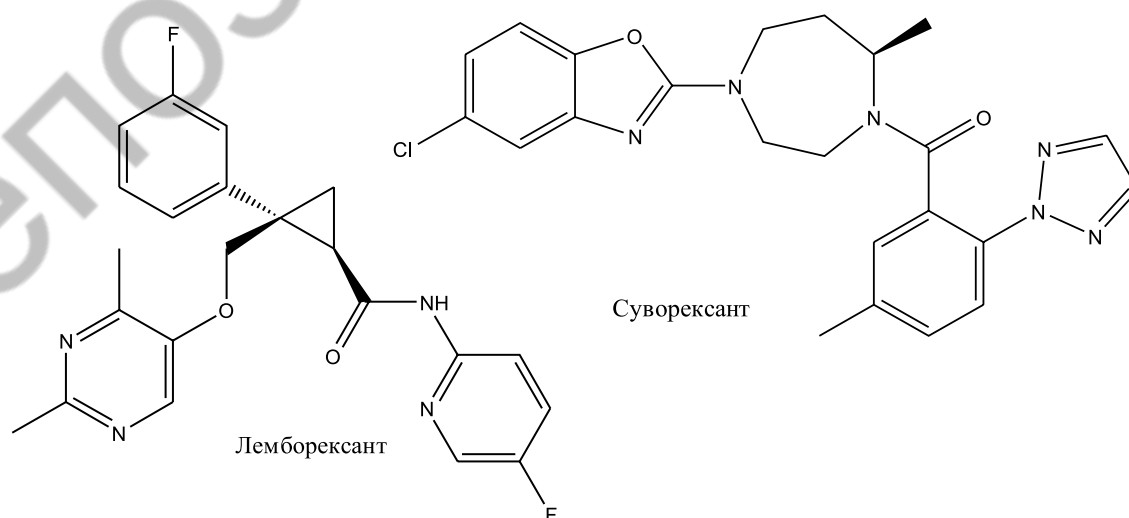


Рисунок 3 — Одобрены к применению ДАОР

АСТ-078573 (Алморексант) является наиболее широко изученным ДАОР и одним из первых, вошедших в 3 фазу клинических испытаний (рисунок 4). Препарат увеличивал продолжительность сна с небольшим количеством побочных эффектов [10]. Однако по неизвестным причинам в 2011 г. испытания были приостановлены.

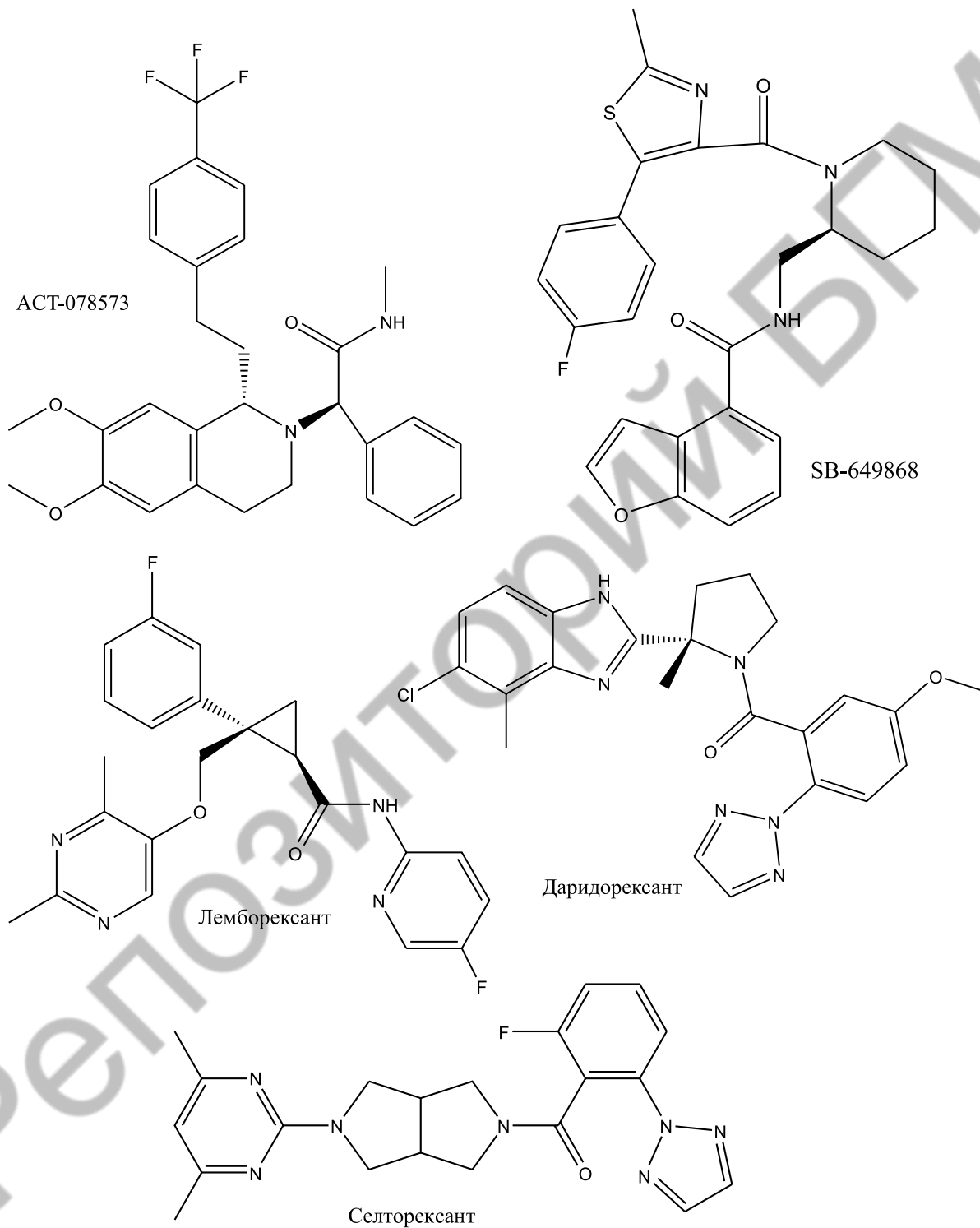


Рисунок 4 — ДАОР на стадии клинических испытаний

На рисунке 4 представлены также другие ДАОР, которые находятся на различных стадиях клинических испытаний. Так, SB-649868 показал в доклинических и клинических испытаниях очень

высокую активность: увеличивает продолжительность сна, подавляет ночные пробуждения [11]. В настоящее время проходят различные стадии клинических испытаний Филорексант (МК 6096), Даридорексант (АСТ-541468), Селторексант (JNJ-42847922).

Одним из потенциальных преимуществ ДАОР перед классическим лечением бессонницы, такими как бензодиазепины, является сон, близкий к физиологическому. Например, в то время как ДАОР усиливают медленную фазу сна, доказано, что бензодиазепины ее подавляют [12]. Кроме того, антагонисты орексина имеют меньше побочных эффектов, их характер носит легкий и транзиторный характер (жалобы на непродолжительную головную боль и головокружение).

Как отмечалось ранее, Суворексант на сегодня является наиболее распространённым в клинической практике ДАОР. Ранее было установлено, что галогеновая связь в ряде случаев оказывает существенное влияние на эффективность связывания ряда веществ. Нами была поставлена задача проверить эффективность связывания суворексанта и его галоген-аналогов с гипокретинном как причину проявления антагонистической активности относительно орексиновых рецепторов.

Материалы и методы. Дизайн структур выполнен с помощью химических программ ChemOffice. Пространственная структура нейропептида гипокретина 2 (орексина В) загружена из Protein Data Bank. Количественная оценка взаимодействия лиганд-лиганд проведена *in silico* (dockingserver.com) с использованием полуэмпирического метода расчетов квантовой химии PM6, метода геометрической оптимизации MMFF94 и метода расчета заряда Gasteiger при значении pH 7,0 и 7,4 [13]. Статистическая оценка результатов проведена с помощью общепринятых методов математической статистики. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

К атомам лиганда были добавлены частичные заряды Гастейгера. неполярные атомы водорода были объединены, и были определены вращающиеся связи. Моделирование стыковки проводилось с использованием генетического алгоритма Ламарка (LGA) и метода локального поиска Solis & Wets. Исходное положение, ориентация и кручение молекул лиганда были установлены случайным образом. Все вращающиеся торсионы были выпущены во время стыковки.

Результаты и их обсуждение. Был проведён молекулярный докинг снотворного лекарственного средства Суворексант и его структурных аналогов, в которых Cl замещен на I, Br или F, с орексинами. Анализ связывания с обоими нейропептидами обусловлен тем, что наилучший снотворный эффект в клинических испытаниях показали соединения, в равной мере связывающиеся с обоими рецепторами, т. е. не демонстрирующие большей аффинности к одному из них. Докинг проведен для pH 7,0 (pH клетки) и 7,4 (pH артериальной крови). Анализу подвергались свободная энергия связывания, вклад галогеновой связи в нее (в процентах), константа ингибирования и площадь поверхности связывания. Для анализа причин изменения этих параметров регистрировалась также длина галогеновой связи, угол связи с SER18 и зависимость энергии галогеновой связи от используемого галогенпроизводного.

Анализ связывания с орексином В при pH 7,0. Наименьшую ΔG показал оргиниальный Суворексант ($\Delta G_{cp} = -4,59$ ккал/моль; $\Delta G_{min} = -5,47$ ккал/моль; $\Delta G_{max} = -4,33$ ккал/моль), наибольшую — его I-производное ($\Delta G_{cp} = -4,17$ ккал/моль; $\Delta G_{min} = -4,61$ ккал/моль; $\Delta G_{max} = -3,77$ ккал/моль) (рисунок 5). Наибольшая площадь взаимодействия с рецептором отмечена у оргиниального Суворексанта ($S_{cp} = 610,66$ А², $S_{max} = 668,82$ А²; $S_{min} = 517,09$ А²), наименьшая — у его I-производного ($S_{cp} = 570,19$ А², $S_{max} = 614,18$ А², $S_{min} = 512,35$ А²) (рисунок 8). Минимальная константа ингибирования зарегистрирована у Br-производного ($K_{cp} = 459,27$ нмоль, $K_{min} = 289,07$ нмоль, $K_{max} = 875,04$ нмоль), максимальная — у I-производного ($K_{cp} = 991,34$ нмоль, $K_{min} = 419,20$ нмоль, $K_{max} = 1750,00$ нмоль) (рисунок 7, таблица 1).

Таблица 1 — Параметры для Суворексанта и его аналогов при pH 7,0 (OX-1)

Соединение	ΔG_{cp} , ккал/моль	$\Delta G_{гал}$, ккал/моль	K_i , нмоль	S_{cp} , А ²
F-Суворексант	-4,20*	-0,65	934,50*	590,28*
Суворексант	-4,59	-0,78	553,37	610,66
Br-Суворексант	-4,58	0*	459,27	573,21*
I-Суворексант	-4,17*	0*	991,34*	570,19*

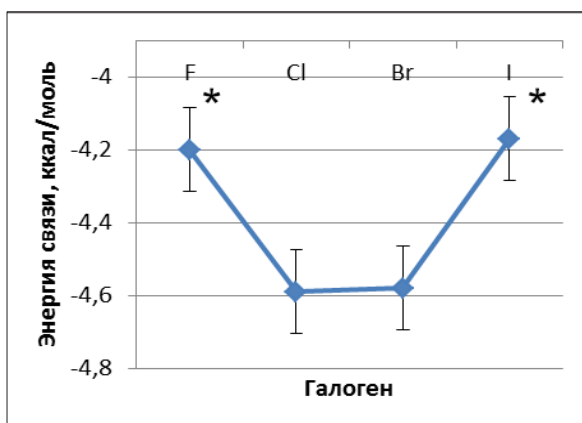


Рисунок 5 — Зависимость ΔG от природы галогена

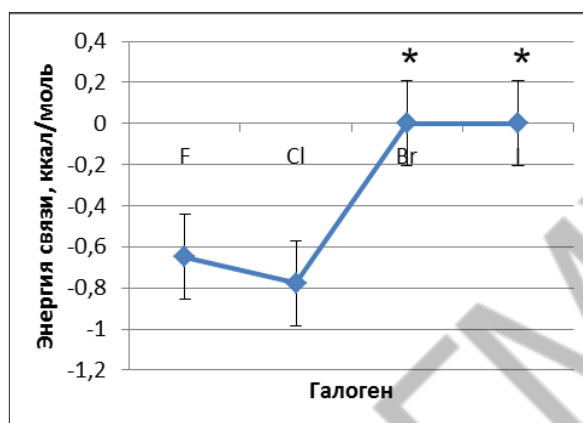


Рисунок 6 — Зависимость ΔG галогенной связи от природы галогена

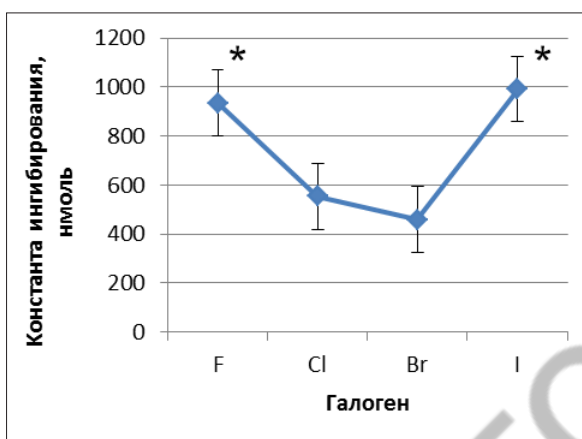


Рисунок 7 — Зависимость K_i от природы галогена

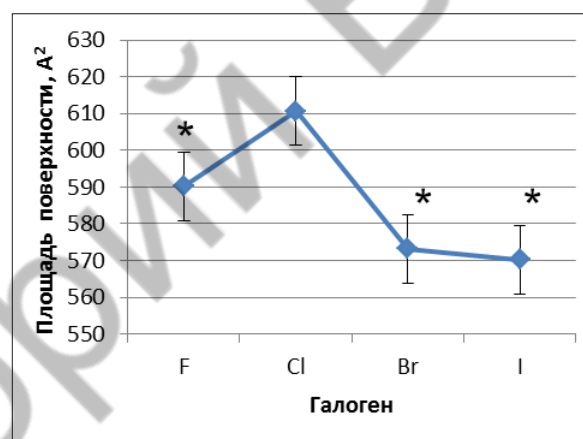


Рисунок 8 — Зависимость S_{cp} от природы галогена

Эти данные коррелируют с энергией галогеновой связи (см. таблицу 1, рисунок 6). Наименьшая G галогеновой связи характерна для Суворексанта ($\Delta G = -0,77$ ккал/моль) и F-Суворексанта ($\Delta G = -0,65$ ккал/моль, различия с Суворексантом статистически незначимы, $p < 0,05$). При этом у F- и Cl-Суворексанта отмечен наибольший вклад галогеновой связи в общую ΔG (12 и 13% соответственно, различия статистически незначимы, $p < 0,05$, рисунки 9, 10). Эти молекулы демонстрируют близкое процентное соотношение связей, однако для Br- и I-производных ситуация кардинально меняется.

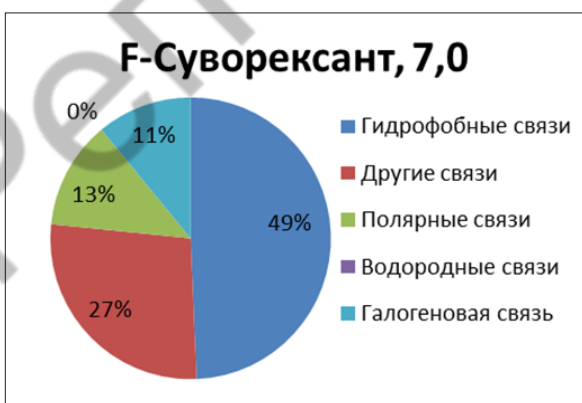


Рисунок 9 — Вклад различных связей в общую ΔG

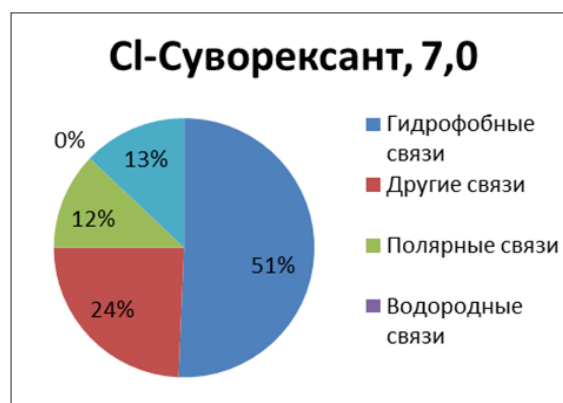


Рисунок 10 — Вклад различных связей в общую ΔG

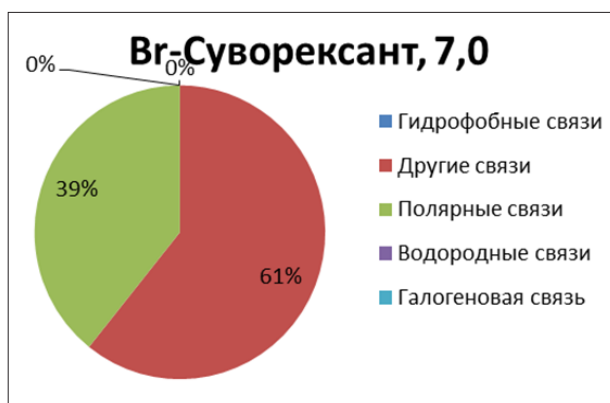


Рисунок 11 — Вклад различных связей в общую ΔG

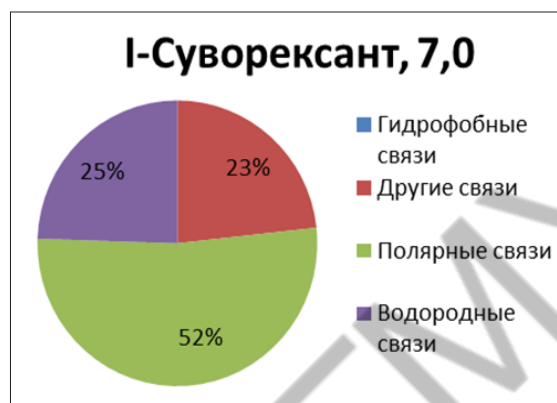


Рисунок 12 — Вклад различных связей в общую ΔG

У Br- и I-производных галогеновая связь не образовалась, при этом данные структурные аналоги демонстрируют худшие параметры связывания (рисунки 11, 12). Атомы I и Br обладают большей поляризуемостью, чем F и Cl, соответственно, имеют большую σ -hole и должны образовать прочную галогеновую связь. Для выяснения причин странного поведения аналогов проанализировали расстояние до SER18 и угол галогеновой связи с данной аминокислотой.

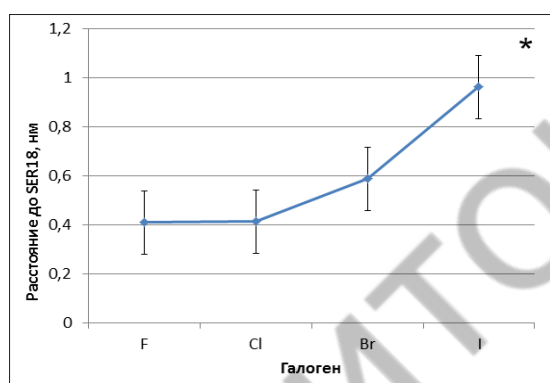


Рисунок 13 — Зависимость расстояния до SER18 от природы галогена

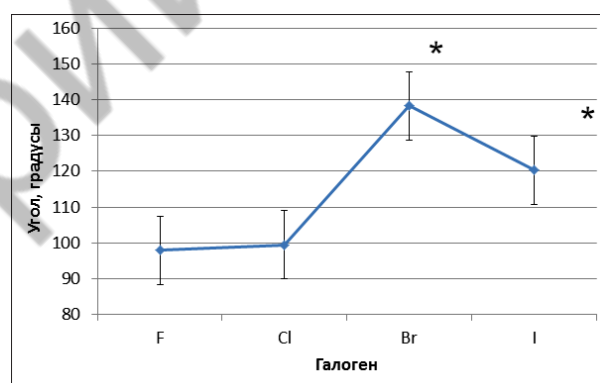


Рисунок 14 — Зависимость угла галогеновой связи от природы галогена

Для образования прочной галогеновой связи (рисунки 13, 14) необходимо наименьшее расстояние до аминокислоты и угол 0° [14]. Минимальное расстояние до SER18 зафиксировано у F-производного и Суворексанта (0,41 нм), максимальное — у I-производного (0,96 нм, различия с Суворексантом статистически значимы, $p < 0,05$), у Br-производного отмечена тенденция к увеличению расстояния до аминокислоты (0,59 нм). Наиболее близкий к 0° угол у F-производного и Суворексанта ($97,90^\circ$ и $99,40^\circ$ соответственно, различия статистически незначимы), у Br- и I-производных — статистически значимые различия с Суворексантом ($138,20^\circ$ и $120,30^\circ$ соответственно). Таким образом, преимущества I и Br, обусловленные поляризуемостью атомов, нивелируются неблагоприятным для образования галогеновой связи расположением обоих лигандов.

Анализ связывания с орексином В при pH 7,4. Наименьшую ΔG показал оригинальный Суворексант ($\Delta G_{cp} = -4,58$ ккал/моль; $\Delta G_{min} = -5,44$ ккал/моль; $\Delta G_{max} = -3,80$ ккал/моль), наибольшую — его F-производное ($\Delta G_{cp} = -4,24$ ккал/моль; $\Delta G_{min} = -4,57$ ккал/моль; $\Delta G_{max} = -3,86$ ккал/моль). Наибольшая площадь взаимодействия с рецептором отмечена у оригинального Суворексанта ($S_{cp} = 606,07$ А²; $S_{max} = 633,05$ А²; $S_{min} = 565,68$ А²), наименьшая — у его F-производного ($S_{cp} = 580,53$ А²; $S_{max} = 641,23$ А²; $S_{min} = 521,37$ А²). Минимальная константа ингибирования зарегистрирована у Суворексанта ($K_{cp} = 587,23$ нмоль; $K_{min} = 103,11$ нмоль; $K_{max} = 1630,00$ нмоль), максимальная — у F-производного ($K_{cp} = 825,22$ нмоль; $K_{min} = 445,48$ нмоль; $K_{max} = 1470,00$ нмоль) (рисунки 15–18).

Таблица 2 — Параметры для Суворексанта и его аналогов при pH 7,4 (OX-1)

Соединение	$\Delta G_{\text{ср}}$, ккал/моль	$\Delta G_{\text{гал}}$, ккал/моль	K_i , нмоль	$S_{\text{ср}}$, Å ²
F-Суворексант	-4,24*	-0,46*	825,22*	580,53*
Суворексант	-4,58	-0,93	587,23	606,07
Br-Суворексант	-4,56*	-0,13*	593,17	582,31*
I-Суворексант	-4,25*	0*	816,69*	587,62*

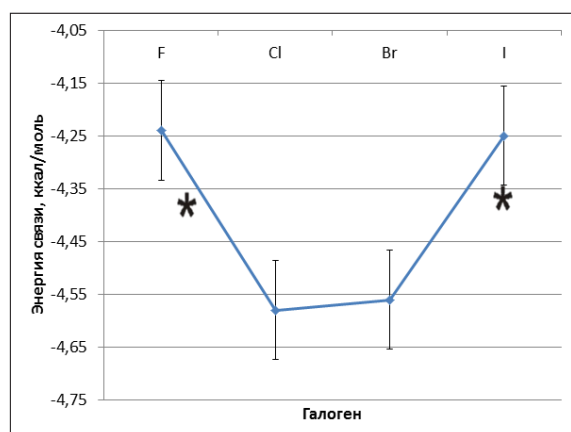


Рисунок 15 — Зависимость ΔG от природы галогена

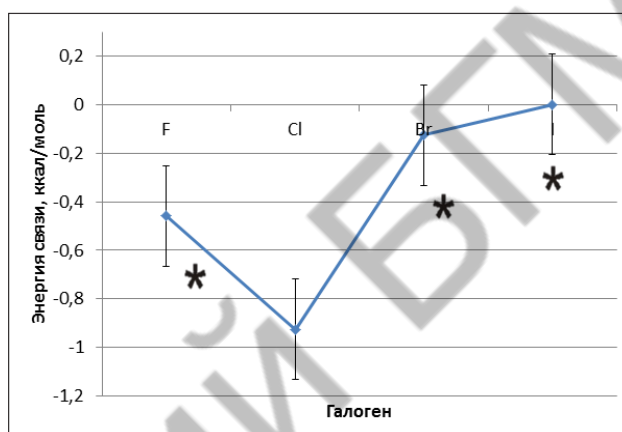


Рисунок 16 — Зависимость ΔG галогеновой связи от природы галогена

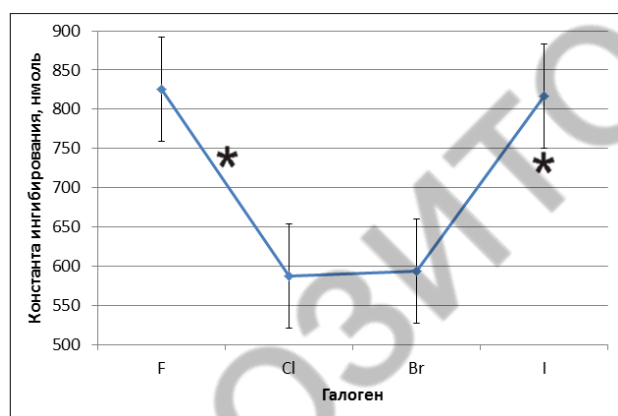


Рисунок 17— Зависимость K_i от природы галогена

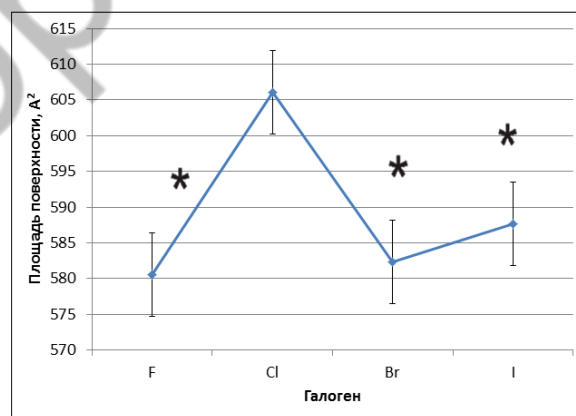


Рисунок 18 — Зависимость $S_{\text{ср}}$ от природы галогена

Таким образом, наиболее благоприятные параметры (наименьшая ΔG , наибольшая $S_{\text{ср}}$, наименьшая K_i), как и при pH 7,0, характерны для оригинального Суворексанта. Эти данные коррелируют с вкладом (см. рисунок 19) и энергией галогеновой связи (см. таблицу 2).

Наименьшая ΔG галогеновой связи, характерная для Суворексанта ($\Delta G = -0,93$ ккал/моль), F-Суворексант демонстрирует худшие результаты ($\Delta G = -0,46$ ккал/моль), Br-производное при pH 7,4, в отличие от pH 7,0, образует галогеновую связь, однако с небольшой энергией результаты ($\Delta G = -0,13$ ккал/моль). У I-производного галогеновая связь не образовалась, при этом данные структурные аналоги демонстрируют наихудшие параметры связывания. Атомы I и Br обладают большей поляризуемостью, чем F и Cl соответственно, имеют большую σ -hole и должны образовать прочную галогеновую связь. Для выяснения причин странного поведения аналогов проанализировали расстояние до SER18 и угол галогеновой связи с данной аминокислотой.

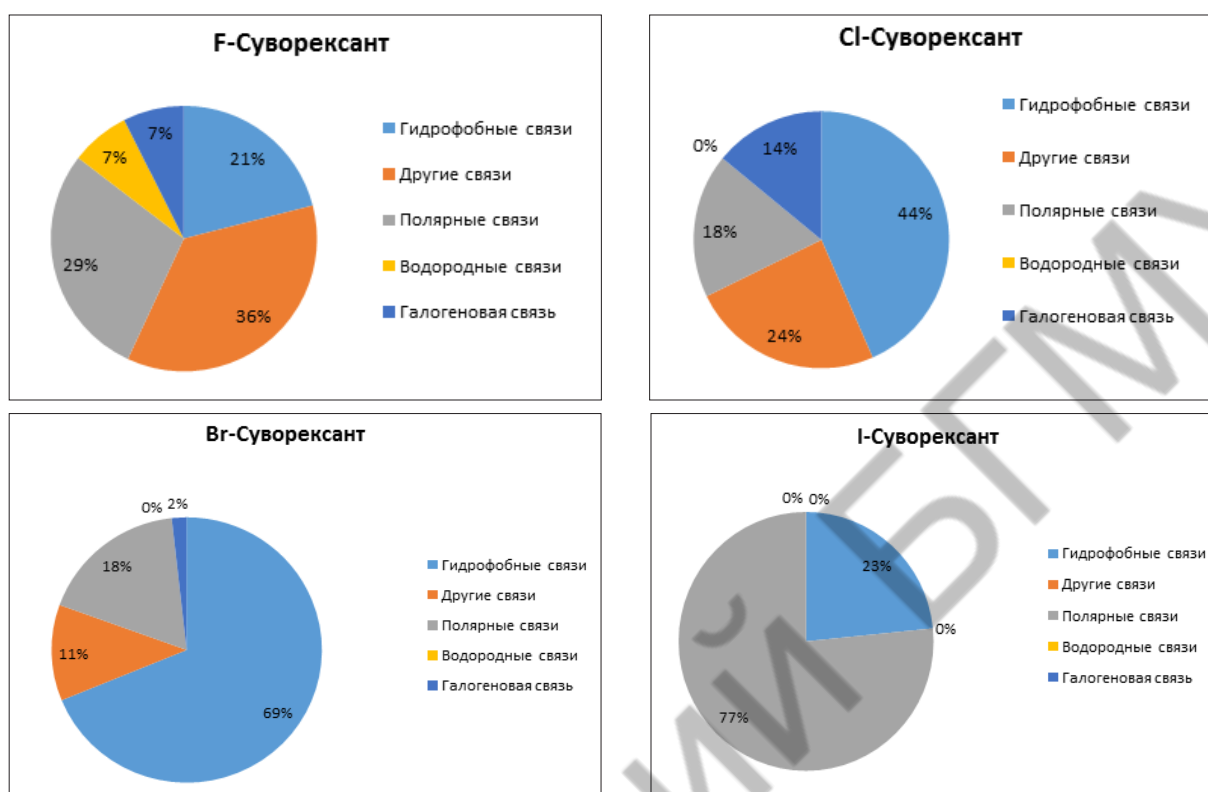
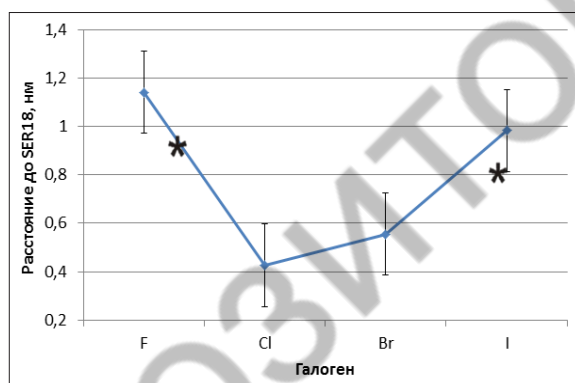
Рисунок 19 — Вклад различных связей Суворексанта и его аналогов в общую ΔG 

Рисунок 20 — Зависимость расстояния до SER18 от природы галогена

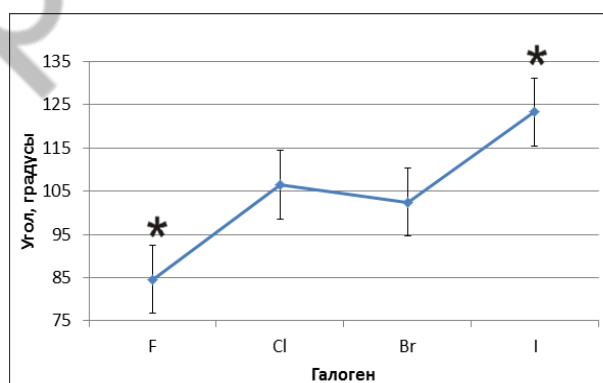


Рисунок 21 — Зависимость угла галогеновой связи от природы галогена

Как упоминалось ранее, для образования галогеновой связи с минимальной ΔG необходимо небольшое расстояние до аминокислоты и угол близкий к 0° . Минимальное расстояние до SER18 зафиксировано у Суворексанта (0,43 нм) и Br-Суворексанта (0,56 нм, различия с Суворексанта статистически незначимы, $p < 0,05$), максимальное — у F-Суворексанта (1,14 нм). Несмотря на внушительное расстояние, F-Суворексанта образует галогеновую связь, но не с SER18, как при pH 7,0, а с GLY9 ($l = 0,21$ нм) и GLN8 ($l = 0,54$ нм). Наиболее близкий к 0° угол демонстрируют F-Суворексанта (84,60°), а также Суворексанта и Br-Суворексанта (106,50° и 102,50° соответственно, различия статистически незначимы $p < 0,05$) (рисунки 20, 21). Показательно, что благоприятный для связывания угол с SER18 у F-суворексанта все же не ведет к образованию галогеновой связи из-за большого расстояния. Расчеты при pH 7,0 показали, что в дополнение к высокой поляризуемости для образования галогеновой связи необходимы оптимальное расстояние и угол связывания. Расчеты при pH 7,4 продемонстрировали, что перечисленные факторы должны обнаруживаться все вместе.

Заключение. В ходе исследования было установлено, что наименьшей ΔG связи, минимальной константой ингибирования и наибольшей площадью поверхности взаимодействия обладает молекула хлор-Суворексанта. Данная структура имела наиболее благоприятные условия для образования галогеновой связи (угол близкий к 0° , минимальное расстояние и высокую поляризуемость атома хлора). При анализе других структур отмечена прямая зависимость между энергией галогеновой связи и аффинности «суворексантного» лиганда к нейропептиду. Результаты молекулярного докинга при рН 7,0 и 7,4 статистически значимых различий не обнаружили. Результаты проведенных исследований о закономерностях и параметрах образования галогеновой связи повышают эффективность рационального драг-дизайна в поиске новых ЛС, в том числе с учетом действия антагониста по принципу лиганд-лигандного взаимодействия.

Литература

1. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity / L. de Lecea [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1998. — Vol. 95. — P. 322–327.
2. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior / T. Sakura [et al.] // Cell. — 1998. — Vol. 92. — P. 573–585.
3. Ectopic overexpression of orexin alters sleep/wakefulness states and muscle tone regulation during REM sleep in mice / J. T. Willie [et al.] // J. Mol. Neurosci. — Vol. 43. — P. 155–161.
4. Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish. / D. A. Prober [et al.] // J. Neurosci. — 2006. — Vol. 26. — P. 356–361.
5. The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats. / D. C. Piper [et al.] // Eur. J. Neurosci. — 2000. — P. 726–730.
6. Xi, M. Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. / M. Xi, F. R. Morales, M. H. Chase — 901, б.м.: Brain Res., 2001. — P. 259–264.
7. Smith, R. J. Orexin / hypocretin 1 receptor antagonist reduces heroin self-administration and cue-induced heroin seeking. / R. J. Smith, G. Aston-Jones // Eur. J. Neurosci. — Vol. 35. — P. 798–804.
8. Discovery and characterization of ACT-335827, an orally available, brain penetrant orexin receptor type 1 selective antagonist. / M. A. Steiner [et al.] // ChemMedChem. — Vol. 8. — P. 898–903.
9. Blockade of orexin-1 receptors attenuates orexin-2 receptor antagonism-induced sleep promotion in the rat. / C. Dugovic [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2009. — Vol. 330. — P. 142–151.
10. Orexin receptor antagonism, a new sleep-enabling paradigm: a proof-of-concept clinical trial / P. Hoever [et al.] // Clin. Pharmacol. Ther. — 2012. — Vol. 91. — P. 975–985.
11. The orexin antagonist SB-649868 promotes and maintains sleep in men with primary insomnia / P. Bettica [et al.] // Sleep. — Vol. 35. — P. 1097–1104.
12. Gaillard, J.-M. Effects of three Benzodiazepines (Nitrazepam, Flunitrazepam and Bromazepam) on sleep of normal subjects, studied with an automatic sleep scoring system. / J.-M. Gaillard, P. Schulz, R. Tissot // Pharmacopsychiatry. — 2009. — Vol. 7. — P. 207–217.
13. Bikadi, Z. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. / Z. Bikadi, E. J. Hazai // Cheminf. — 2009. — Vol. 1 (15).
14. Halogen bonding: the sigma-hole. / T. Clark [et al.] // Mol. Model. — 2007. — № 13. — P. 291–296.

Structure based drug-design in finding of capsaicinomimetics' antitumor medications

Todar T. Lakhvich, Victoryja A. Ciarleckaja

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The influence of the parameters of the halogen bond (free binding energy, the inhibition constant, the interaction area versus the angle, length and energy of the halogen bond) on the affinity of Suvorexant and its Halogen analogs to hypocretin agonist have been studied.

Keywords: halogen bond, hypocretin, ligand-ligand interactions, molecular docking, Suvorexant and analogues.

Поступила 26.11.2020