

В. Б. Ларіонов, М. Я. Головенко

Молекулярний докінг бенздіазепінів – алостеричних модуляторів ГАМК-рецептора

Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського
Національної академії наук України, м. Одеса

Ключові слова: похідні 1,4-бенздіазепіну, докінг, спектр фармакологічної дії, ГАМК-рецептор

Фармакологічна дія лікарських засобів обумовлена їхньою фізико-хімічною або хімічною взаємодією з біологічними мішенями (рецепторами, ферментами, переносниками тощо). Послідовність положення атомів, просторова конфігурація молекули, величина та розташування зарядів, рухливість її фрагментів одного відносно іншого визначають міцність зв'язку і, тим самим, силу та тривалість фармакологічної дії. Молекула лікарської речовини в більшості випадків має незначний розмір порівняно з біологічною мішенню, тому вона може з'єднуватися тільки з невеликим фрагментом макромолекули. У цьому разі має місце утворення координаційних, водневих, Ван-дер-Ваальсових зв'язків, комплексів з переносом заряду [1]. Ступінь та селективність зв'язування також безпосередньо пов'язані з реалізацією внутрішньої активності низькомолекулярних сполук. Саме тому навіть незначні зміни у структурі вихідної молекули можуть призводити до зменшення чи посилення, інверсії або повного нівелювання біологічних ефектів. Саме цей підхід використовується для створення нових фізіологічно-активних речовин – потенційних лікарських засобів [2].

В арсеналі сучасної клінічної фармакології нараховується декілька десятків представників похідних 1,4-бенздіазепіну, але в той самий час ведеться постійний пошук серед сполук цієї групи з новими біологічними властивостями. Класичними компонентами фармакологічного спектра похідних 1,4-бенздіазепіну є протисудомна, гіпнosedативна й анксиолітична дії та міорелаксація. Втім, пропексазепаму влас-

тивий значний болетамуючий та протисудомний ефекти з незначним проявом депримууючої дії [3]. На наш погляд, для пояснення отриманих експериментальних даних найреальнішим є використання підходів біоінформатики, зокрема, молекулярного докінгу. Цей підхід дає можливість моделювати рецептор-лігандну взаємодію та отримати інформацію щодо загальної енергії зв'язування (інтегральна кількісна характеристика утворення комплексу) та виявлення локалізації місць зв'язування окремими амінокислотами, що залучені до цього процесу. Зазначена інформація є важливою та цінною як для розуміння механізму дії вже відомих молекул, так і для подальшого конструювання структур з очікуваною біологічною активністю [4]. Зазвичай, при проведенні молекулярного докінгу використовують структури референтних сполук з відомими місцями зв'язування, на підставі чого є можливість валідувати отримані результати. Однак слід враховувати, що різні сполуки можуть мати різні місця зв'язування на макромолекулі, а загальний напрям цих процесів залежить від енергетичних, стеричних і конформаційних чинників [5–7].

Мета дослідження – оцінка рецепторно-лігандної взаємодії низки похідних 1,4-бенздіазепіну різного спектра фармакологічної дії на підставі даних молекулярного докінгу.

Матеріали та методи. Параметри молекулярного докінгу було розраховано за допомогою програми iGEMDOCK v2.1 [8, 9]. Біологічною мішенню був ГАМК_A-рецептор, кристалічну структуру якого (GABA(A)R-beta3 гомопентамер, 4COF) було отримано з бази даних біологічних макромолекул [(http://www.rcsb.org/)]. Фізико-хімічні влас-

тивості похідних 1,4-бенздіазепіну (площа полярної поверхні, показники ліпофільності (у системі октанол-вода, logP та октанол-фосфатний буфер, logD), величини молярної рефракції та константи іонізації отримані нами безпосередньо з баз даних та розраховані за допомогою програм ACD/Labs та MedChem Designer v. 2.0.0.34.

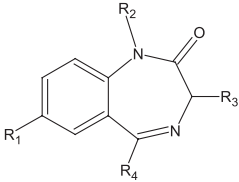
Розрахунок параметрів докінгу лігандів та рецептора проводили на підставі даних силового поля з використанням 80 генерацій (generations) гнучких конформацій ліганду (аналіз 300 станів у кожній генерації, population size). Найвірогідніше з енергетичної точки зору рішення отримано з 4 послідовних наближень. Автоматична детекція центра зв'язування визначена параметрами локалізації референтного ліганду (benzamidine) [10]. Радіус центра зв'язування збільшено до 30 Å. Кластеризацію результатів докінгу здійснювали за процедурою K-середніх після попередньої оцінки топографії локалізації зв'язування досліджуваних сполук за величиною загальної енергії.

Досліджувані сполуки класифіковані у вигляді деревоподібної структури (ієрархічна кластеризація), де відношення до кожної «гілки» відбувалося відповідно до топографічного залучення та енергії зв'язку окремих залишків амінокислот. Аналіз порожнин та взаємне положення амінокислотних залишків у активних центрах рецептора здійснювали за програмою Mole 2.13.9.6.

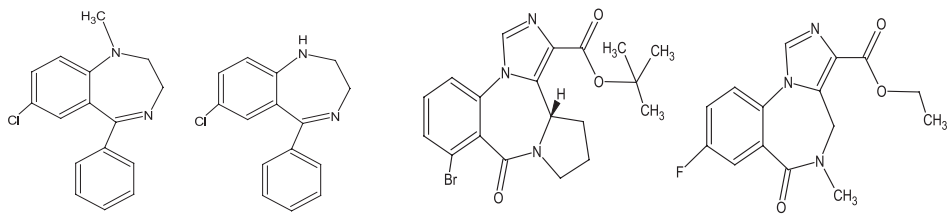
Результати та їх обговорення. Для процедури докінгу було обрано похідні 1,4-бенздіазепіну, що тривалий час використовуються в медичній практиці та є добре вивченими, а деякі з них мають активні метаболіти (табл. 1). Їхні структури різняться наявністю груп, які здатні до утворення різних типів зв'язків – електростатичних, водневих або Ван-дер-Ваальсових, оскільки їхні утворення з окремими групами центру зв'язування рецептора визначає силу й афінитет ліганду. Присутність полярних груп у молекулі не тільки змінює загальну величину площі полярної поверхні молекули (PSA), але й обумовлює загальну здатність молеку-

ли до електронної поляризуємості, тобто, набувати електричний дипольний момент в електричному полі, мірою якої є величина молекулярної (молярної) рефракції (MR) та характеристики ліпофільності сполук (розподіл у системі октанол-вода, logP за умов фізіологічного pH, logD, табл. 2). Вказані величини були розраховані за допомогою програм MedChem Designer та ACD/Labs. До сполук, що аналізували, було включено 3-алкоксипохідні – 3-пропілокси-7-бром-5(о-хлорфеніл)-1,4-бенздіазепін-2-он (пропексазепам) та 3-етокси-7-бром-5-феніл-1,4-бенздіазепін-2-он (етексазепам). Також було використано сполуку з естерним зв'язком у положенні 3 гетерокільця (левана) та референтну сполуку фенілбенздіазепінон, що має типову для похідних 1,4-бенздіазепіну структуру та в якій відсутні інші замісники, а також медазепам, що не має полярної кетонної групи в положенні «2» у гетероциклі. Загалом вибірка сполук охоплювала не тільки найрепрезентативніші фізико-хімічні параметри, але й основні компоненти фармакологічного спектра. Незважаючи на те, що всі похідні 1,4-бенздіазепіну в тій чи іншій мірі проявляють близьку активність, кожний з препаратів має свій спектр фармакологічної дії. Так, бромазепам має седативний та міорелаксантийний ефект, клоназепам характеризується переважно антиепілептичною дією, медазепам – проявляє заспокійливу та транквілізуючу дію, тоді як міорелаксантийний ефект майже відсутній, нітразепам та його метаболічний прекурсор – німетазепам мають здебільшого снодійну дію, діазепам також виявляє седативну, міорелаксантийну та амнестичну дію та використовується як референтна сполука в біологічних та фармакологічних дослідженнях, а у фармакологічному спектрі феназепам значною мірою представлені майже всі компоненти. Лоразепам також проявляє властивості, притаманні похідним цього класу, але є найнаркогеннішим бенздіазепіном зі швидким розвитком звикання та подальшого синдрому відміни. Заміщені по положенню «3» гетерокільця бенздіазепіни представлені леваною

Структури похідних 1,4-бенздіазепіну, що використані в дослідженні



	№	R1	R2	R3	R4
3-гідроксибромазепам	I	Br	H	OH	-піридин-2-іл
3-гідроксифеназепам	II	Br	H	OH	o-Cl-феніл
Бромазепам	III	Br	H	H	-піридин-2-іл
Деметилдіазепам	IV	Cl	H	H	Феніл (C ₆ H ₅)
Діазепам	V	Cl	CH ₃ -	H	Феніл (C ₆ H ₅)
Етоксазепам	VI	Br	H	-O-CH ₂ -CH ₃	Феніл (C ₆ H ₅)
Клоназепам	VII	-NO ₂	H	H	o-Cl-феніл
Левана	VIII	Br	H	-OCO-(CH ₂) ₂ -COOH	o-Cl-феніл
Лоразепам	IX	Cl	H	H	o-Cl-феніл
Німетазепам	X	-NO ₂	CH ₃ -	H	Феніл (C ₆ H ₅)
Нітразепам	XI	-NO ₂	H	H	Феніл (C ₆ H ₅)
Оксазепам	XII	Cl	H	-OH	Феніл (C ₆ H ₅)
Пропоксазепам	XIII	Br	H	-O-(CH ₂) ₂ -CH ₃	o-Cl-феніл
Феназепам	XIV	Br	H	H	o-Cl-феніл
Фенілбенздіазепінон	XV	H	H	H	Феніл (C ₆ H ₅)



Medazepam XVI Demethylmedazepam XVII Bretazenil XVIII Flumazenil XIX

(естерний зв'язок, що легко піддається гідролізу з утворенням активного 3-гідроксипохідного) та алкоксипохідними – етоксазепамом та пропоксазепамом (естерний зв'язок є стабільним до гідролітичного розщеплення під дією неспецифічних тканинних естераз), фармакологічний ефект яких переважно представлений знеболюючою дією. Бретазеніл є імідазопіролбенздіазепіном з високою афінністю до бенздіазепінових рецепторів (парціальний агоніст, що зв'язується з усіма α -субодинами бенздіазепінового рецептора), тоді як його близький аналог – флумазеніл є селективним антагоністом.

Окрім того, в експерименті використано структури, які утворюються за послідовної біотрансформації вихідної сполуки («феназепам – 3-гідроксифеназепам», «бромазепам – 3-гідроксибромазепам», «німетазепам – нітразепам», «медазепам – деметилмедазепам» та «діазепам – деметилдіазепам – оксазепам»).

Мірою здатності формування рецептор-лігандного комплексу є загальна енергія його утворення, яка для структур даної вибірки була в межах 75,8–112,5 ккал/моль. На підставі величини внесків кожної з взаємодій вони можуть бути віднесені відповідно до Ван-дер-Ваальсової (2,4–4,8 ккал/моль) взаємодії, водневого зв'язку (до 9,6 ккал/

Розраховані фізико-хімічні властивості похідних 1,4-бенздіазепіну

Назва		MR	PSA	LogP	logD	pK
3-гідроксибромазепам	I	76,40	74,58	1,274	1,274	-3,9 ± 0,2 2,0 ± 0,2 10,6 ± 0,7 12,3 ± 0,4
3-гідроксифеназепам	II	83,74	61,69	2,694	2,694	0,02 ± 0,50 10,8 ± 0,7 12,39 ± 0,40
Бретазеніл	XVIII	100,29	64,43	3,286	3,286	-2,6 ± 0,2 0,88 ± 0,20
Бромазепам	III	75,20	54,35	1,757	1,757	-3,9 ± 0,2 2,0 ± 0,2 11,4 ± 0,7
Деметилдіазепам	IV	74,92	41,46	2,751	2,751	3,4 ± 0,1 11,72 ± 0,70
Деметилмедазепам	XV		24,39	3,586	3,565	-2,35 ± 0,40 6,18 ± 0,10
Діазепам	V	79,09	15,6	3,570	3,570	-5,83 ± 0,40 3,4 ± 0,1
Етоксазепам	VI	88,43	50,69	3,005	3,005	3,01 ± 0,50 10,81 ± 0,70
Флумазеніл	XIX	77,59	64,55	-0,002	-0,002	-2,97 ± 0,20 0,81 ± 0,20
Клоназепам	VII	81,25	70,21	3,159	3,159	1,6 ± 0,3 11,2 ± 0,7
Левана	VIII	103,78	105,06	2,901	0,487	0,43 ± 0,50 4,25 ± 0,17 10,0 ± 0,7
Лоразепам	IX	80,92	61,69	2,596	2,596	0,03 ± 0,50 10,8 ± 0,7 12,4 ± 0,4
Медазепам	XVI	80,85	15,6	3,905	3,885	-0,43 ± 0,40 6,18 ± 0,10
Німетазепам	X	82,33	78,49	2,119	2,119	-9,34 ± 0,40 3,19 ± 0,10
Нітразепам	XI	76,64	70,21	2,671	2,671	3,19 ± 0,10 11,35 ± 0,70
Оксазепам	XII	76,20	64,85	3,073	1,591	1,68 ± 0,50 10,94 ± 0,70 12,45 ± 0,40
Феназепам	XIV	82,54	41,46	3,296	3,296	1,74 ± 0,25 11,58 ± 0,70
Фенілбенздіазепінон	XV	70,11	41,46	2,173	2,172	-4,8 ± 0,4 3,62 ± 0,50 12,7 ± 0,7
Пропоксазепам	XIII	97,76	50,69	3,962	3,962	1,2 ± 0,5 10,65 ± 0,70

моль) та електростатичної взаємодії. Втім, електростатична взаємодія виявлена лише для нітразепаму, як більш полярної молекули, та вона не перевищує 1,1 ккал/моль (табл. 3). Представленість водневого зв'язку для даних сполук також є різною та визначається від ~2 % до ~30 % від величини загальної енергії утворення. Найбільший внесок водневих зв'язків визначається серед сполук з полярними групами, які містять електронегативні елементи та рухомий атом водню (гідроксипохідні, нітропихідні) (табл. 3). Наявність електростатичних зв'язків здебільшого можлива між іонізованими сполуками, але з наведених величин констант іонізації (pK_a , табл. 2) помітно, що лише медазепам, його метаболіт – деметилмедазепам та левана здатні існувати в іонізованому вигляді за умов фізіологічного рН. Однак це позначається лише на здатності левани до утворення

водневих зв'язків (22,6 ккал/моль). Ймовірно, ця невідповідність обумовлена тим, що алгоритм розрахунку не враховує здатність сполук до іонізації та підвищення полярності молекул. Окремо слід зазначити, що розраховані величини ліпофільності для медазепаму та деметилмедазепаму є досить близькими (табл. 1), та лише для левани спостерігається значна різниця, що відповідає емпіричним даним, тому вплив можливої іонізації для зазначених молекул слід визнати незначним.

Найбільший внесок в утворення зв'язку між проаналізованими лігандами та рецептором здійснюється за рахунок Ван-дер-Ваальсових взаємодій (71–99 %), що є цілком очікуваним, беручи до уваги присутність ароматичних структур та здатних до поляризації атомів галогенів у похідних 1,4-бенздіазепіну.

Візуалізація та групування (кластеризація за локалізацією місця зв'язу-

Таблиця 3

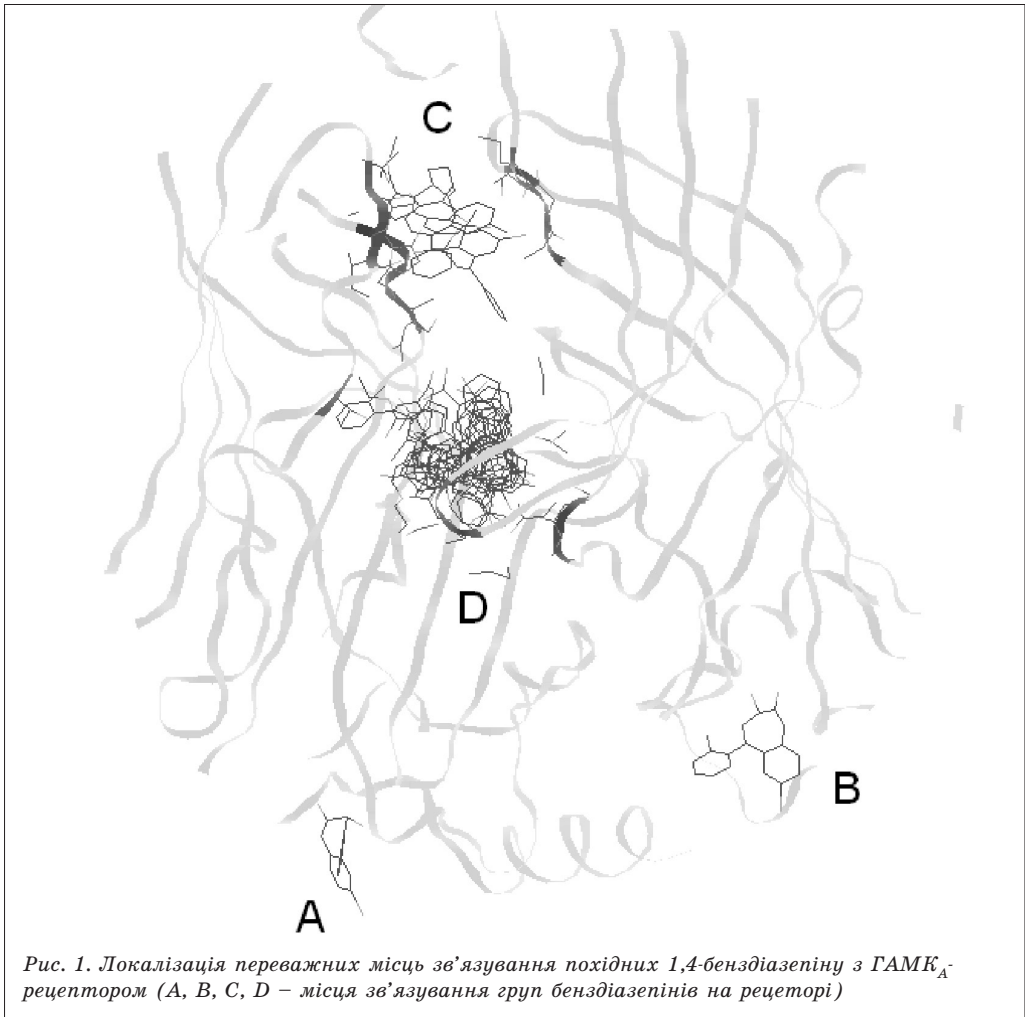
Розраховані величини загальної енергії зв'язування (водневих зв'язків, Ван-дер-Ваальсової та електростатичної взаємодії) похідних 1,4-бенздіазепіну с ГАМК_A-рецептором

Ліганд	Загальна енергія зв'язування, ккал/моль	Ван-дер-Ваальсова взаємодія		Водневі зв'язки	
		ккал/моль	%	ккал/моль	%
3-Гідроксибромазепам	-90,1	-70,8	78,6	-19,3	21,4
3-Гідроксифеназепам	-86,9	-66,4	76,4	-20,4	23,5
Бретазеніл	-86,2	-68,2	79,1	-17,9	20,8
Бромазепам	-92,7	-79,0	85,2	-13,7	14,8
Клоназепам	-97,9	-72,9	74,5	-24,9	25,4
Деметилдіазепам	-86,9	-85,6	98,5	-1,4	1,6
Деметилмедазепам	-88,8	-79,8	89,9	-9,1	10,2
Діазепам	-84,6	-75,4	89,1	-9,2	10,9
Етоксазепам	-81,6	-71,8	88,0	-9,9	12,1
Флумазеніл	-92,0	-68,1	74,0	-23,8	25,9
Левана	-80,0	-57,3	71,6	-22,6	28,3
Лоразепам	-91,0	-86,0	94,5	-5,0	5,5
Медазепам	-89,1	-82,1	92,1	-7,0	7,9
Німетазепам	-96,1	-92,1	95,8	-4,0	4,2
Нітразепам	-112,5	-77,6	69,0	-33,8	30,0
Оксазепам	-101,9	-80,6	79,1	-21,3	20,9
Феназепам	-90,4	-85,2	94,2	-5,3	5,9
Фенілбенздіазепінон	-88,9	-82,1	92,4	-6,8	7,6
Пропоксазепам	-75,8	-70,3	92,7	-5,6	7,4

вання) результатів докінгу похідних 1,4-бенздіазепіну дозволила виявити принаймні чотири місця зв'язування (рис. 1, групи А–D). Для переважної кількості сполук вибірки (14 структур, кластер D) ідентифіковано єдине місце зв'язування, хоча за розташуванням у просторі цієї порожнини сполуки значно різняться, тому емпірично неможливо визначити, які структурні елементи зумовлюють їхню відповідну орієнтацію відносно функціональних груп рецептора. Для частини молекул (бретазеніл, діазепам, оксазепам, кластер C), місце зв'язування локалізується на відстані близько 7–8 Å від першого центру. Виявлено, що 3-гідроксибромазепам та 3-гідроксифеназепам, незважаючи на близькість їхньої структури, мають окремі місця зв'язування (кластери А та В), які розраховані, виходячи

з геометричних характеристик та можливості утворення зв'язків між залишками амінокислот та функціональними групами сполук.

Для компонентів другого локального кластеру (бретазеніл, діазепам, етоксазепам) визначені 11 залишків амінокислот, що беруть участь у взаємодії (табл. 4), хоча, зважаючи на значну різницю в енергії зв'язків та різне положення лігандів у цій порожнині, можна зазначити, що вони не є специфічними для зв'язування залишків з цим сайтом. Більш того, ці сполуки мають різний фармакологічний спектр дії – сполука-лідер цього кластеру (бретазеніл) майже не викликає таких побічних дій, як амнезія та втрата координації руху, тоді як у фармакологічному спектрі діазепаму присутні міорелаксанти та амнестичні компоненти. Етоксазепам, що значно



**Компоненти третього кластеру взаємодії похідних
1,4-бенздіазепіну з ГАМК_A-рецепторним комплексом
(M – головний (main) ланцюг S – бічний (side) ланцюг)**

Сполука	Бретазеніл	Діазепам	Етоксазепам
Енергія, ккал/моль	-86,2	-84,6	-81,6
S-Lys-102	-3,5	-	-
S-Ser-46	-	-	-3,4
M-Ile-47	-7,0	-3,3	-3,5
M-Asp-48	-7,4	-2,4	-
S-Asp-48	-	-	-2,9
M-Glu-182	-	-3,5	-
M-Asn-54	-5,0	-2,0	-1,8
M-Asn-100	-	-	-4,7
S-Lys-102	-3,2	-0,3	-4,2
M-Ala-135	-1,0	-3,0	-4,8
M-Cys-136	-0,9	-4,2	-2,7
S-Met-137	-3,3	-7,5	-4,6
M-Ser-46	-0,3	-4,4	-4,9
M-Asp-48	-11,6	-6,4	-5,8
S-Asp-48	-2,6	-0,3	-5,6
M-Met-49	-8,3	-1,4	-0,8
S-Met-49	-4,3	-0,2	-
M-Val-50	-5,1	-	-
S-Arg-180	-	-0,7	-
M-Glu-182	-3,0	-8,4	-3,9
S-Pro-184	-5,8	-2,4	-

різняється від попередників, навпаки, характеризується переважно знеболюючою дією. Тому можливим є те, що зазначений сайт не є індивідуальним, а зв'язування з ним може мати неспецифічний характер.

Більшу увагу привертає до себе центр зв'язування, що є спільним для 14 сполук з вихідної вибірки (табл. 5). У формуванні зв'язків цього центру бере участь загалом 29 залишків амінокислот, хоча близько 80 % представників цього кластеру зв'язуються лише з 13–15 амінокислотними залишками.

Аналіз розташування цих залишків на рецепторі показав, що вони не групуються в безпосередній близькості, а формують два підцентри, що віддалені один від одного.

Перший підцентр представлений двома порожнинами, що мають форму

каналів з довжинами 13,23 та 13,56 Å відповідно. Він розташовується між двома субодинами пентамерного рецептора та, ймовірно, виконує модуляторну функцію щодо його афінитету до ГАМК. Другий підцентр зв'язування має порожнину об'ємом близько 647 Å³ та розташований на певній відстані від першого. Загалом вони формують єдину структуру, що відповідає за утворення зв'язків з похідними 1,4-бенздіазепіну. Привертає до себе увагу, що в обох підцентрах присутні залишки амінокислот з досить високою енергією зв'язування – у першому це фенілаланін (200-й амінокислотний залишок головного ланцюга рецептора), а у другому – тирозин (позиція 62). Показовим є те, що вони являють собою ароматичні структури, тому слід очікувати, що фіксація ліганду в цих підцентрах відбувається за

Компоненти четвертого кластеру взаємодії похідних 1,4-бенздіазепіну з ГАМК_A-рецепторним комплексом (M – головний (main) ланцюг, S – бічний (side) ланцюг, енергія взаємодії з амінокислотними залишками, ккал/моль)

Сполука	XI	XII	VII	X	III	XIX	IX	XIV	XVI	XV	XV	IV	VIII	XIII
Сумарна енергія взаємодії, ккал/моль	-112,5	-101,9	-97,9	-96,1	-92,7	-92	-91	-90,4	-89,1	-88,9	-88,8	-86,9	-80	-75,8
Залишок амінокислоти														
S-Tyr-97	-6,0	-5,5	-3,2		-3,5		-2,5	-1,8	-3,5	-3,5				
S-Glu-155	-6,0	-4,3			-3,5			-3,5	-3,5	-3,5				
M-Ser-156	-2,5	-2,5												
M-Tyr-157	-2,5	-3,7										-1,4		
M-Thr-202													-3,5	
S-Thr-202	-1,1	-3,5	-2,2		-2,3	-2,5							-3,9	
S-Tyr-205		-2,5	-8,9											
M-Asp-43														-3,5
S-Asp-43	-1,4		-3,2	-4,7	-3,5	-9,8							-1,8	
S-Tyr-62		-4,9					-2,5							
S-Gln-64		-3,5											-3,5	
S-Thr-176						-3,5							-1,8	
S-Arg-180	-5,4				-4,5								-6,8	
S-Tyr-97	-3,8	-3,9	1,2	-2,5	-2,5	-1,6	-2,8	-4,7	-5,5	-5,2	-1,7	-2,6		
S-Glu-155	-3,8	-4,1	-3,0	-3,6	-4,9	-2,3	-2,2	-4,7	-5,0	-4,9	3,7	-2,3		-0,2
M-Tyr-157	-1,9	-2,6	2,8	-1,8	-0,3	-1,3	4,8	-1,6	0,8	1,2	-5,7	-1,9		-0,9
S-Tyr-157	-2,3	-3,6	-4,0	-2,9	-7,4	-2,0	-1,3	-2,7	-5,9	-4,2	-7,8	-7,7		-1,0
M-Phe-200	-1,2	-1,1	-2,0	-1,3	-2,7	-1,9	-0,5	-1,2	-1,3	-1,8	-0,8	-0,2		-2,0
S-Phe-200	-21,7	-18,9	-2,3	-21,9	-17,4	-16,3	-14,3	-19,8	-19,5	-18,9	-12,0	-9,2	-12,9	-1,3
M-Ala-201	-3,6	-1,8	-3,8	-2,3	-3,3	-2,9	-1,6	-1,5	-1,3	-2,9	-1,7	-0,5	-7,3	-5,8
S-Thr-202	-3,8	-3,3	-1,4	-2,8	-1,8	-3,2	-4,7	-1,4	-4,2	-4,7	-3,8	-2,3	-2,5	-2,7
S-Tyr-205	-7,5	-9,0	-9,2	-5,9	-7,8	-3,4	-7,5	-5,8	-9,4	-7,5	-1,3	-4,5	-0,4	-2,1
M-Asp-43	-0,5	-0,3	-0,2	-0,8	-0,2	-0,5	-0,6	-1,2				-2,6	-0,3	-4,8
S-Asp-43	3,0	-2,7	-6,6	-8,6	-5,4	-4,7	-4,4	-7,7	-3,5	-3,2	-2,8	-8,6	-4,5	-5,8
S-Tyr-62	-15,6	-16,5	-14,2	-23,8	-16,3	-12,4	-19,9	-23,5	-21,9	-2,2	-13,8	-22,6		-7,4
S-Gln-64	-3,4	-2,6	-4,4	-4,2	-3,1	-3,7	-1,9	-2,5	-2,4	-3,7	-7,3	-5,4	-1,9	-8,6
S-Met-115		-0,7	-2,2	-0,7	-1,3		-5,3		-0,4		-2,4	-2,4		
S-Thr-176	-1,4	-1,7	-0,9	-1,9	-0,3	-1,6	-0,9	-1,3		-0,9		-1,1	-5,6	-5,9
S-Arg-180	-1,8	-0,6	-0,7	-0,8	-3,2		-0,2						-4,7	-2,4

рахунок π - π взаємодії. Також привертає увагу те, що пропоксазепам має відносно низьку енергію зв'язку з цими амінокислотними залишками (2,0 та 7,4 ккал/моль відповідно). Зазначений кластер похідних 1,4-бенздіазепіну вміщує сполуки з досить різними проявами компонентів фармакологічного спектра – від снодійної дії в нітразепаму та левани, до міорелаксантної та транквілізуючої у феназепаму та навіть майже провідної аналгетичної в пропоксазепаму. Не виключена можливість, що така закономірність обумовлена як силою зв'язку з певними амінокислотними залишками, так і кількістю цих зв'язків, що впливає на конформаційну стабільність рецептора та в подальшому визначає спрямованість фармакологічних ефектів в організмі.

Амінокислотні залишки, зокрема, тирозин у положенні 97 (Tyr-97) та глутамін у положенні 155 (Glu-155) характеризуються високою енергією утворення зв'язків з нітразепамом та оксазепамом. Відомо [11], що нітразепам має потужну снодійну дію, а оксазепам також використовується в разі порушень сну (при цьому його міорелаксантна та протисудомна дії виражені в меншому ступені). Оскільки для інших бенздіазепінів, для яких виявлена знижена здатність до зв'язування з цими залишками (бромазепам та феназепам), у фармакологічному спектрі присутня значна міорелаксантна дія, можна припустити, що ці амінокислотні залишки не відповідають за її розвиток.

Також аномально високі значення утворення зв'язку виявлені для амінокислотних залишків у другому підцентрі, три з яких (аспарагін головного ланцюга (Asp-43), гліцин (Gln-64) та треонін (Thr-176) бокового ланцюга) беруть участь у взаємодії з пропоксазепамом, а останній (Thr-176) також здійснює внесок у зв'язування левани. Щодо останнього, то, враховуючи здатність левани до іонізації та гідролізу в тканинах, ця величина не може бути показовою характеристикою фармакологічних властивостей. У той самий час для пропоксазепаму, який проявляє значну аналгетичну дію, зазначені амінокислотні залишки з високою вірогід-

ністю можуть корелювати з цим типом біологічної активності.

Виходячи з локалізації кількості та подібності амінокислотних залишків, що беруть участь у формуванні комплексу ліганд-рецептор, було виділено декілька підцентрів, що здатні утворювати водневий зв'язок за рахунок Gln-64, Asp-43 та Thr-202, а також ті, що відповідають за водневий зв'язок та π - π взаємодію (Tyr-205, Phe-200), або схильні до гідрофобної взаємодії (Ala-201). Другий підцентр є більш гетерогенним, на якому переважно фіксуються 3-гідроксифеназепам, 3-гідроксибромазепам з одного боку та вже зазначені бретазепіл, діазепам та етоксазепам. У формуванні зв'язків цього центру бере участь значна частина більш полярних амінокислотних залишків (Ile-47, Asn-54, Lys-102, Als-135, Ser-46, Gln-182), а також сірковмісні амінокислотні залишки (Cys-136 та Met-137). Ймовірно, він є більш вигідним з енергетичної точки зору для сполук, що здатні до поляризації, з одночасним обмеженням за розміром молекул (оскільки порожнина цього підцентру є меншою, ніж попереднього).

Незважаючи на те, що формування ліганд-рецепторного комплексу відбувається за рахунок різних міжмолекулярних зв'язків, водневий зв'язок та Ван-дер-Ваальсова взаємодія є найефективнішими для утримання бенздіазепінів у центрі рецептора. Вони утворюються між групами та атомами, що мають велику електронегативність або схильні до тимчасового зсуву електронної щільності та формування диполів.

З метою визначення впливу поляризації ліганду на можливість зв'язування було піддано аналізу такі фізико-хімічні властивості бенздіазепінів, як молекулярна рефракція (міра електронної поляризованості речовини) та величина площі полярної поверхні (яка є інтегральною мірою центрів з підвищеною або зниженою електронною густиною в проекції молекули). Так як величини ліпофільності ($\log P$ та $\log D$) сполук вибірки не зазнавали суттєвих змін, цей параметр не застосовували в аналізі. Втім, для молекулярної рефракції (рис. 1, А), що характеризує здатність

сполук до поляризованості, не знайдено певної кореляції між показниками енергії зв'язку, Ван-дер-Ваальсових чи водневих зв'язків. Можливим поясненням цього є те, що представлені структури (за винятком левани) у фізіологічному середовищі не здатні до утворення заряджених сполук (величини рKa та logD, табл. 1).

Для величини полярної поверхні (рис. 2, Б) також не виявлено суттєвої закономірності за співставлення як з загальною енергією взаємодії, так і з Ван-дер-Ваальсовою. Навпаки, була визначена певна залежність між площею полярної поверхні та загальним внеском водневих зв'язків.

Втім, сполуки у виборці класифікуються на дві групи (рис. 3), для однієї з яких спостерігається повільне зменшення енергії зв'язку (кут нахилу прямої $k = 0,0735$) з підвищенням площі полярної поверхні, а для іншої – значне підвищення енергії зв'язку (кут нахилу $0,6989$). Ймовірно, що ця закономірність пов'язана з існуванням двох підцентрів, які були виявлені при аналізі параметрів докінгу сполук цієї групи. Так, другий підцентр, що вміщує полярні амінокислоти, є високоафінним для лігандів, що мають полярні ділянки в молекулі, тоді як ароматичні структури першого підцентру зазнають негативного впливу при збільшенні полярності бенздіазепінів.

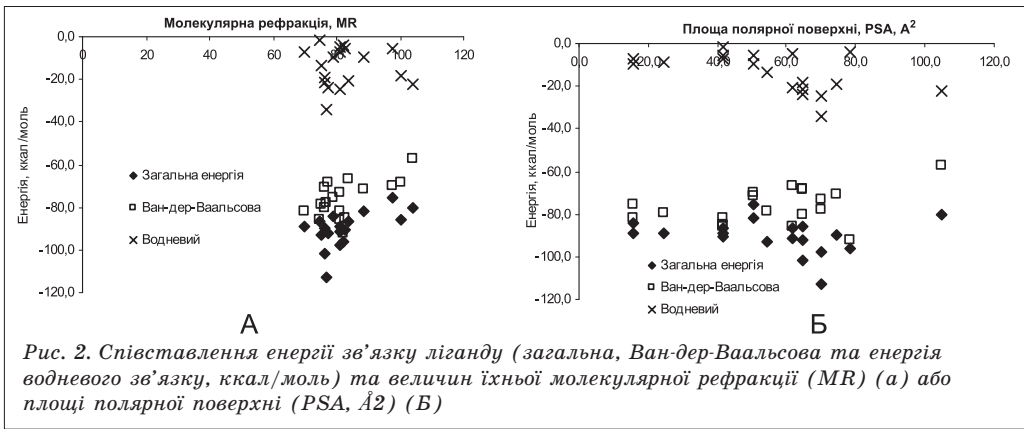


Рис. 2. Співставлення енергії зв'язку ліганду (загальна, Ван-дер-Ваальсова та енергія водневого зв'язку, ккал/моль) та величин їхньої молекулярної рефракції (MR) (а) або площі полярної поверхні (PSA, Å²) (Б)

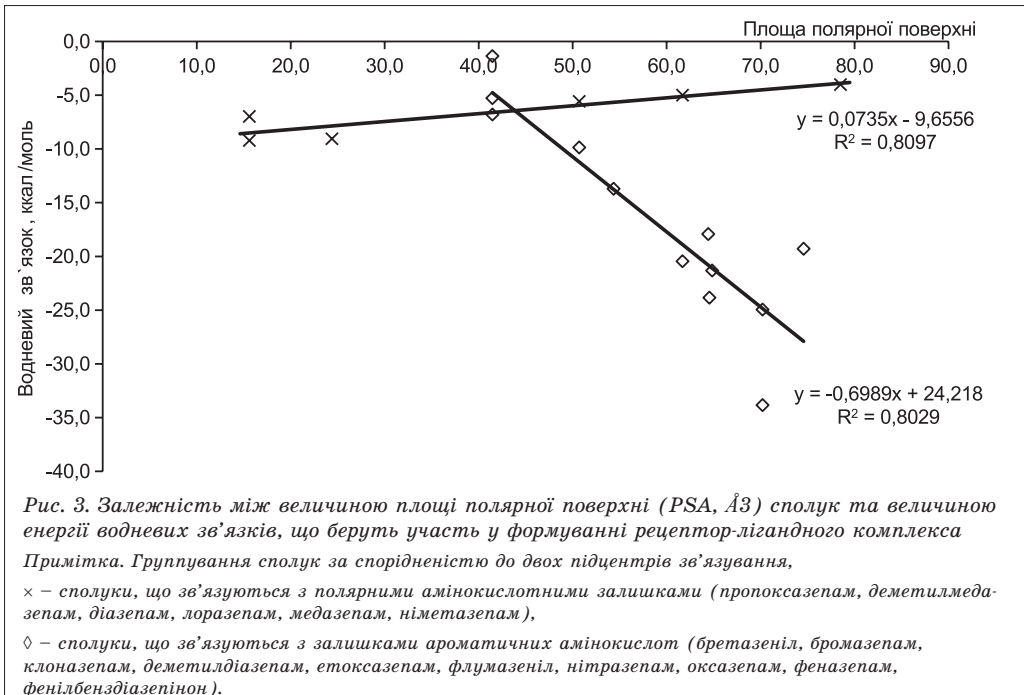


Рис. 3. Залежність між величиною площі полярної поверхні (PSA, Å²) сполук та величиною енергії водневих зв'язків, що беруть участь у формуванні рецептор-лігандного комплексу

Примітка. Групування сполук за спорідненістю до двох підцентрів зв'язування.

× – сполуки, що зв'язуються з полярними амінокислотними залишками (пропоксазепам, деметилмедазепам, діазепам, лоразепам, медазепам, німетазепам),

◇ – сполуки, що зв'язуються з залишками ароматичних амінокислот (бретазеніл, бромазепам, клоназепам, деметилдіазепам, етоксазепам, флумазеніл, нітразепам, оксазепам, феназепам, фенілбенздіазепінон).

З аналізу було виключено левану (рис. 3), оскільки, як було вказано, вона в значному ступені піддається гідролізу в тканинах організму з утворенням активного метаболіту, тому її взаємодія з рецептором не може бути однозначно інтерпретована.

Виходячи з вищенаведеного, можна зробити висновок, що навіть серед обраних представників похідних 1,4-бенздіазепіну спостерігається гетерогенність по локалізації місць зв'язування з ГАМК_A-рецептором у процедурі молекулярного докінгу, а здатність молекули до поляризації відіграє значно меншу роль, ніж величина площі полярної поверхні.

Висновки

1. За результатами молекулярного докінгу низки похідних 1,4-бенздіазепіну встановлено, що внесок водневого зв'язку у формування комплексу «ліганд-рецептор» знаходиться в межах від ~2 до ~30 % від величини загальної енергії зв'язку. Найбільша доля водневих зв'язків визначається серед сполук з полярними групами,

які містять електронегативні елементи та рухомий атом водню (гідрокси-похідні, нітропохідні).

2. Серед 19 вивчених лігандів 14 представників мають спільне місце зв'язування на макромолекулі. Аналіз розташування амінокислот на рецепторі показав, що вони формують два підцентри, віддалені один від одного. Аномально високі значення утворення зв'язку виявлені для амінокислот у другому підцентрі, три з яких (Asp-43 головного ланцюга, Gln-64 та Thr-176 бокового) беруть участь у взаємодії з пропоксазепамом. У другому підцентрі активними є більша кількість більш полярних амінокислотних залишків (Phe-47, Asn-54, Lys-102, Ala-135, Ser-46, Glu-182), а також сірковмісні (Cys-136 та Met-137). Для молекулярної рефракції не визначено певної кореляції з показниками енергії зв'язку, а за величиною площі полярної поверхні визначається розділення сполук на дві групи, що, ймовірно, пов'язане з існуванням двох підцентрів, виявлених за аналізу параметрів докінгу сполук цієї групи.

1. Williams M. Receptors as Drug Targets / M. Williams, R. Raddatz // Current Protocols in Pharmacology. – 2006. – V. 32 (1.1) – P. 1.1.1–1.1.18.
2. De Benedetti P. G. Ligand-receptor communication and drug design / P. G. De Benedetti, F. Fanelli // Cuerr Protein Pept Ski. – 2009. – № 10 (2). – P. 186-93.
3. Analgesic Effects of 3-substituted derivatives of 1,4-benzodiazepines and their possible mechanisms / V. I. Pavlovsky, O. V. Tsybalyuk, V. S. Martynyuk [et al.] // Neurophysiology. – 2013. – V. 45, № 5/6. – P. 427–432.
4. A critical assessment of docking programs and scoring functions / G. L. Warren, C. W. Andrews, A. M. Capelli [et al.] // J. Med Chem. – 2006. – V. 5, № 49 (20). – P. 5912–5931.
5. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery / X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui // Curr Comput Aided Drug Des. – 2011. – V. 7 (2). – P. 146–157.
6. Molecular docking and structure-based drug design strategies / L. G. Ferreira, R. N. Dos Santos, G. Oliva, A. D. Andricopulo // Molecules. – 2015. – V. 20 (7). – P. 13384–13421.
7. Grinter S. Z. Challenges, applications, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design / S. Z. Grinter, X. Zou // Molecules. – 2014. – V. 11, № 19 (7). – P. 10150–10176.
8. Yang J.-M. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking / J.-M. Yang, C.-C. Chen // Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. – 2004. – V. 55. – P. 288-304.
9. Consensus Scoring Criteria for Improving Enrichment in Virtual Screening / J.-M. Yang, Y.-F. Chen, T.-W. Shen [et al.] // J. Chem Inf Model. – 2005. – V. 45 (4). – P. 1134-46.
10. Miller P. S. Crystal structure of a human GABA_A receptor / P. S. Miller, R. Aricescu A. // Nature. – 2014. – V. 512 (7514). – P. 270–275.
11. Pharmacological profiles of benzodiazepinergic hypnotics and correlations with receptor subtypes / M. Yasui, A. Kato, T. Kanemasa [et al.] // Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. – 2005. – V. 25 (3). – P. 143–151.

В. Б. Ларіонов, М. Я. Головенко

Молекулярний докінг бенздіазепінів – алостеричних модуляторів ГАМК-рецептора

Мета дослідження – оцінка рецепторно-лігандної взаємодії низки похідних 1,4-бенздіазепіну різного спектра фармакологічної дії на підставі даних молекулярного докінгу.

Розрахунок параметрів молекулярного докінгу з рецептором (GABA(A)R-beta3 гомопентамер, 4COF) було здійснено з використанням програми iGEMDOCK v2.1. Аналіз порожнин та взаємне положення амінокислотних залишків в активних центрах здійснювали на базі програми Mole 2.13.9.6.

Встановлено, що внесок водневого зв'язку у формування комплексу ліганд-рецептор для використаних похідних 1,4-бенздіазепіну знаходиться в межах від ~2 до ~30 % від величини загальної енергії зв'язку. З 19 похідних 1,4-бенздіазепіну для 14 представників визначено спільне місце зв'язування. Аналіз розташування залишків амінокислот на рецепторі показав, що вони формують два підцентри, що віддалені один від одного: у першому – переважно активні залишки аспарагінової кислоти (Asp-43), глутаміну (Gln-64) й треоніну (Thr-176), у другому – активними є більша кількість більш полярних амінокислотних залишків (ізолейцин Ile-47, аспарагін Asn-54, лізин Lys-102, аланін Ala-135, серин Ser-46, гліцин Glu-182), а також сірковмісні амінокислотні залишки (цистеїн Cys-136 та метіонін Met-137). За величиною площі полярної поверхні визначається розділення сполук на дві групи, що, ймовірно, пов'язане з існуванням двох підцентрів, виявлених за аналізом параметрів докінгу сполук цієї групи.

Ключові слова: похідні 1,4-бенздіазепіну, докінг, спектр фармакологічної дії, ГАМК-рецептор

В. Б. Ларионов, Н. Я. Головенко

Молекулярний докінг бенздіазепінов – аллостерических модуляторів ГАМК-рецептора

Цель исследования – оценка рецепторно-лигандного взаимодействия ряда производных 1,4-бенздиазепина с разным спектром фармакологического действия на основании данных молекулярного докинга.

Расчет параметров молекулярного докинга с рецептором (GABA(A)R-beta3 гомопентамер, 4COF) был осуществлен с использованием программы iGEMDOCK v2.1. Анализ полостей и взаимного расположения аминнокислотных остатков осуществляли на базе программы Mole 2.13.9.6.

Установлено, что вклад водородных связей в формирование комплекса лиганд-рецептор для использованных производных 1,4-бенздиазепина находится в пределах от ~2 до ~30 % от величины общей энергии связи. Из 19 производных 1,4-бенздиазепина для 14 представителей определено одно общее место связывания. Анализ расположения остатков аминнокислот на рецепторе показал, что они формируют два подцентра, удаленных друг от друга: в первом – преимущественно активны остатки аспарагиновой кислоты (Asp-43), глутамина (Gln-64) и треонина (Thr-176), во втором – склонны к взаимодействию в большей степени полярные аминнокислотные остатки (серин Ser-46, глицин Glu-182, аспарагін Asn-54, лізин Lys-102, а также ізолейцин Ile-47 и аланін Ala-135), и серосодержащие аминнокислотные остатки (цистеин Cys-136 и метионин Met-137). По величине площади полярной поверхности установлено разделение соединений на две группы, что, вероятно, связано с существованием двух подцентров, выявленных при анализе параметров докинга представителей этой группы.

Ключевые слова: производные 1,4-бенздиазепина, докинг, спектр фармакологического действия, ГАМК-рецептор

V. B. Larionov, N. Ya. Golovenko

Molecular docking of benzodiazepines – GABA-receptor allosteric modulators

The aim of this work was a theoretical evaluation of the receptor-ligand interaction of some 1,4-benzodiazepine derivatives with different spectrum components of the pharmacological action using the molecular docking data.

Molecular docking parameters calculation with receptor (GABA_A R-beta3 homopentamer, 4COF) was performed using the program iGEMDOCK v2.1. The analysis of the cavities and amino acid residues locations was carried out on the basis of the program Mole 2.13.9.6.

It was found that the contribution of hydrogen bonds to the formation of the ligand-receptor complex for the 1,4-benzodiazepine derivatives is in the range from ~2 to ~30 % of the total energy of binding. From the 19 1,4-benzodiazepine derivatives for 14 compounds one common binding site has been identified. Analysis of the location of amino acid residues at the receptor revealed that they form two subcenters on a certain distance from each other – in the first one, the residues of asparaginic acid (Asp-43), glutamine (Gln-64) and threonine (Thr-176) are predominantly active, in the second subcenter – more polar amino acids (serine SER-46, glycine Glu-182, asparagine Asn-54, lysine Lys-102, isoleucine Ile-47 and alanine Ala-135), as well as sulfur-containing amino acid (cysteine Cys-136 and methionine Met-137). For the polar surface area division of the compounds into two groups has been found, which is probably due to the existence of two subcenters revealed in the analysis of the docking parameters of compounds of this group.

Key words: 1,4-benzodiazepine derivatives, docking, pharmacological action spectrum, GABA-receptor

Надійшла: 6 липня 2017 р.

Контактна особа: Ларионов В. Б., Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, буд. 86, Люстдорфська дорога, м. Одеса, 65080.