

ПОИСК ЦИКЛИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ Н-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДОВ ХЕМОИНФОРМАТИКИ

Иванов И.М., Орлова А.Б., Неешпапа А.Д., Никифоров А.С., Чепур С.В.

*ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4,
e-mail: gniiivm_15@mil.ru*

Резюме. Н-холинорецептор мышечного типа представляет собой важную биологическую мишень при разработке терапевтических средств, в частности для лечения миастении и восстановления нервно-мышечного блока после применения миорелаксантов. С использованием модели Н-холинорецептора *Torpedo marmorata* проведен виртуальный скрининг библиотек циклических пептидов длиной до 8 аминокислот, содержащих одну SS-связь. Отобраны 7 образцов с предсказанными свойствами лигандов ортостерического сайта связывания ацетилхолина периферических Н-холинорецепторов с высокими показателями соответствия референтным соединениям по паттерну взаимодействия с мишенью. Среди синтезированных твердофазным методом образцов на модели экспериментальной миастении у крыс наибольшее лечебное действие отмечали у образца GRCWRCYW по критериям удержания животных на перевернутой решетке и по продолжительности бега на тротбане.

Ключевые слова: миастения, Н-холинорецептор, пептиды, твердофазный синтез, молекулярный докинг, хемоинформатика.

SEARCH FOR CYCLIC PEPTIDE LIGANDS OF PERIPHERAL N-CHOLINERGIC RECEPTORS USING CHEMOINFORMATICS METHODS

Ivanov I.M., Orlova A.B., Neeshpapa A.D., Nikiforov A.S., Chepur S.V.

FSBI «State Research Testing Institute of Military Medicine» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, Saint-Petersburg, Russia

Abstract. The muscle-type N-cholinergic receptor (NCR) is an important biological target in the development of therapeutic agents, in particular for the treatment of myasthenia gravis and the recovery of neuromuscular block after the use of muscle relaxants. Using the Torpedo marmorata NCR model, virtual screening of libraries of cyclic peptides up to 8 amino acids in length containing one SS bond was carried out. We selected 7 samples with predicted properties of ligands of the orthosteric acetylcholine binding site of peripheral N-cholinergic receptors with high rates of correspondence to reference compounds according to the pattern of interaction with the target. Among the samples synthesized by the solid-phase method on the model of experimental myasthenia gravis in rats, the greatest therapeutic effect was noted in the GRCWRCYW according to the criteria for keeping animals on an inverted grid and the duration of treadmill running.

Key words: myasthenia gravis, N-cholinergic receptor, peptides, solid-phase synthesis, molecular docking, chemoinformatics.

Введение.

Н-холинорецептор (НХР) мышечного типа представляет собой важную биологическую мишень при разработке терапевтических средств, в частности при поиске средств лечения миастении и восстановления нервно-мышечного блока после применения миорелаксантов. С точки зрения структурно-функциональной организации НХР и локализации сайтов связывания лигандов целесообразно выделить внеклеточную часть, трансмембранную часть и внутриклеточную часть макромолекулы.

Внеклеточная часть НХР представляет собой мишень для связывания ацетилхолина и его конкурентных агонистов и антагонистов, среди которых в качестве наиболее активных соединений следует указать структурные аналоги никотина, вещества с кураре-подобным действием, фосфорорганические соединения, инсектициды, нейротоксины змей и морских животных (конотоксины и бунгаротоксины).

Кроме того известны сайты связывания различных классов лигандов в области трансмембранного домена (канальные блокаторы, некоторые позитивные аллостерические модуляторы, местные анестетики) или на внутриклеточной части рецептора (рапсин, специфическая для мышечной ткани тирозинкиназа) [1], однако лиганды этих сайтов

малоспецифичны в отношении НХР и не обладают ярко выраженным биологическим эффектом.

За рубежом активно развивается направление, связанное с применением методов хемоинформатики при поиске новых селективных лигандов НХР среди представителей физиологически активных веществ (ФАВ) пептидной природы.

Применение методов хемоинформатики, в частности молекулярного моделирования и докинга, может способствовать повышению эффективности поиска новых селективных лигандов НХР среди представителей ФАВ пептидной природы. Методы *in silico* существенно дополняют этап лабораторного скрининга в части, касающейся предварительного отбора перспективных химических соединений для их последующего синтеза и исследования *in vitro* и *in vivo*.

Один из подходов к разработке новых ФАВ с применением методов хемоинформатики базируется на знаниях о молекулярной мишени в организме. Источником трехмерных структур мишеней выступают открытые базы данных, такие как Protein Data Bank, UniProt, Worldwide Protein Data Bank и тд. Наиболее используемым при поиске новых ФАВ на основе мишеней путем считается молекулярный докинг, т.е. стыковки мишени с лигандами в составе больших библиотек и отбора лигандов, наиболее соответствующих топологии активного центра мишени. Базы данных лигандов для докинга могут быть сформированы *de novo* путем генерации комбинаторных библиотек с применением специализированного ПО (в большей степени характерно для пептидных лигандов) или путем селекции из общедоступных баз лигандов простого химического строения (например, ZINC15).

В результате определяют набор так называемых соединений-кандидатов. Дальнейший отбор соединений-кандидатов для доклинического изучения *in vitro* и *in vivo* может проходить по пути предсказания их физико-химических и фармацевтических свойств, определяющих их применимость в лекарственных формах.

Мишень для докинга представляет собой специальным образом подготовленный набор данных в виде файла, который отражает точную трехмерную структуру расположения атомов и связей, полученную методами кристаллографического (или магнитно-резонансного) анализа белковой макромолекулы в комплексе с лигандом (или в свободном состоянии). Исходные данные получают либо рентгеноструктурным анализом кристаллизованной макромолекулы, либо ядерно-магнитной резонансной спектроскопией белков в растворенном состоянии. Итогом применения обоих методов становится получение 3-мерной структуры белка в высоком разрешении. Таким образом, мишень для докинга

отражает свойства конкретного белка, определенного подтипа, с установленным субъединичным составом. Набор мишеней для докинга ограничен доступными кристаллографическими данными, представленными в открытых базах данных.

В настоящее время доступно более пятидесяти программных пакетов для докинга белок-лиганд, например AutoDock Vina, Glide, FlexX, GOLD, DOCK и многие другие [2]. Среди них AutoDock Vina относят к числу наиболее популярных свободно распространяемых инструментов для докинга, отличающихся простотой в использовании и сопоставимой эффективностью с другими приложениям подобного класса.

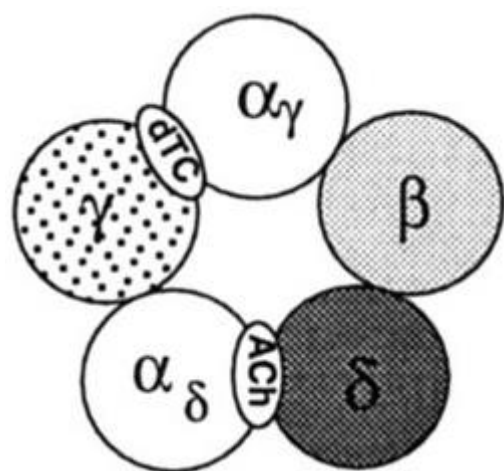
Обоснование областей связывания конкурентных агонистов/антагонистов лигандов НХР мышечного типа на основании анализа научной литературы.

НХР мышечного типа представляют собой трансмембранные белковые ионотропные рецепторы, состоящие их пяти субъединиц, расположенных симметрично вокруг центральной поры (ионного канала). Субъединичный состав НХР мышечного типа позвоночных представлен в эмбриональном состоянии композицией из $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , и δ -субъединиц в соотношении 2:1:1:1, и во взрослом состоянии - из $\alpha 1$, $\beta 1$, ϵ , и δ -субъединиц в соотношении 2:1:1:1 [3].

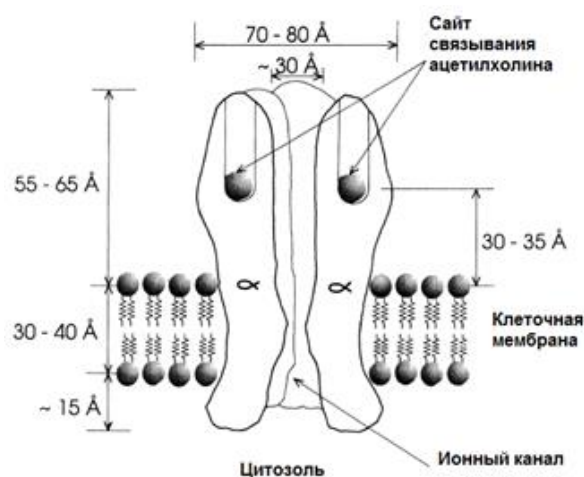
При планировании исследования *in silico* взаимодействия лигандов (с неизвестными фармакологическими свойствами) и при оценке результатов такого исследования важным является формирование представлений о топологической локализации предполагаемых сайтов связывания на рецепторе, а также о позициях аминокислотных остатков макромолекулы, участвующих во взаимодействии с лигандом.

Источником таких знаний являются известные комплексы, полученные методами рентгенструктурного анализа, а также литературные данные о структуре лиганд-связывающих карманов макромолекул, получаемые с применением методов точечного мутагенеза, ковалентно связывающихся либо меченных лигандов.

Области связывания ацетилхолина и конкурентных агонистов/антагонистов на НХР мышечного типа локализованы между α - γ и α - δ субъединицами и различаются по аффинности к лигандам. Данные электронной микроскопии и опытов с мечеными лигандами показывают, что сайты связывания ацетилхолина на НХР мышечного типа локализованы на удалении не 20-40 Å от центральной оси рецептора и высоте не менее 30-35 Å от клеточной мембраны (рисунок 1) [3].



А. Схема субъединичного состава НХР, отмечены области предпочтительного связывания d-тубокурарина (dTC) и ацетилхолина (ACh)



Б. Схема размещения НХР в клеточной мембране с указанием ориентировочных геометрических размеров и локализации сайтов связывания агонистов

Рисунок 1. – Схематическое изображение НХР с указанием двух сайтов связывания

Эксперименты по связыванию меченных лигандов в области альфа-субъединицы позволили выявить консервативные ароматические аминокислоты в позициях 93, 149, 190, и 198, которые в опытах метятся как агонистами, так и антагонистами [4, 5, 6, 7, 8] и рассматриваются как «ядро» сайта связывания. Ряд авторов расширяет понятие «ядра» сайта связывания агонистов, включая в него помимо ароматических аминокислот на α-субъединице, также одну на γ-субъединице (позиция 55) и одну неароматическую аминокислоту на α-субъединице (позиция 147) [9].

С применением методов точечного мутагенеза, применением ковалентно связывающихся и меченных лигандов, установлены позиции аминокислот на различных субъединицах НХР, участвующих во взаимодействии с ацетилхолином и конкурентными лигандами. Результаты анализа литературы представлены в таблице 1.

Таблица 1. - Позиции аминокислот субъединиц НХР рецептора мышечного типа, участвующих во взаимодействии с ацетилхолином и конкурентными агонистами/антагонистами [10,11]

Субъединица	Позиции аминокислот рецептора, участвующих во взаимодействии с ацетилхолином и конкурентными агонистами/антагонистами
Альфа	54, 86, 93, 92, 94, 117, 125, 149, 151, 152, 153, 154, 185, 186, 187, 190, 192, 193, 196, 198

Гамма	49, 55, 57, 108, 109, 111, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 161
Дельта	51, 57, 60, 61, 111, 113, 118, 119, 121, 163, 165, 180, 182
Эпсилон	58, 59

Помимо сайта связывания ацетилхолина и конкурентных лигандов в составе внеклеточной области НХР выделяют аминокислоты, которые не участвуют непосредственно в формировании сайта связывания, однако выполняют другие важные для правильной работы рецептора функции:

- сопряжения сайта связывания и открытия ионного канала;
- формирование сайтов связывания для позитивных аллостерических модуляторов работы НХР, таких как галантамин, физостигмин, кодеин – позиции 123 и 197 на α – субъединице [12];
- частоту спонтанного открытия канала без агонистов – позиции 97, 127 и 272 на α -субъединице [9];
- стабилизируют положение лиганда в сайте связывания – позиции 108, 116, 118 на γ -субъединице и 111, 119, 121 на δ -субъединице [11];
- определяют аффинность конформации «в покое» для агонистов и начальную фазу сопряжения связывания и открытия канала - позиции 147 и 153 на α -субъединице [9].

Очевидно, что при анализе результатов докинга выявление факта взаимодействия лигандов с указанными позициями аминокислот макромолекулы может рассматриваться в качестве одного из критериев отбора «хитов».

Цель исследования. С использованием модели периферического Н-холинорецептора провести скрининг *in silico* библиотек циклических пептидных лигандов для поиска новых соединений-кандидатов.

Материалы и методы. Генерацию библиотек лигандов, подготовку структур, молекулярный докинг и анализ его результатов проводили с помощью открытого программного обеспечения, оригинальных программных продуктов и информационных источников, размещенных в открытом доступе в сети Internet.

Использовали модель НХР *Torpedo marmorata*, уточненная структура которого, полученная методами кристаллографии с разрешением 4 Å, размещена в базе данных RCSB Protein Data Bank (PDB ID 2bg9). Рецептор в выбранной модели представлен в состоянии «покоя» в закрытом состоянии и не содержит лигандов в областях связывания.

Известно, что НХР характеризуется наличием двух ортостерических и несколько аллостерических сайтов связывания. Для исследования была выбран высокоаффинный сайт связывания ацетилхолина и конкурентных лигандов между α - γ субъединицами (цепи A,E

модели 2bg9, с центром $(x,y,z) = (40,75,135)$ Å и размерами по $(x,y,z) = (34,55,65)$ Å), далее - мишень «2bg9_AE». Использовали координаты в соответствии с системой координат модели 2bg9.

Подготовка файлов к проведению докинга включала следующие этапы:

- в случае наличия в составе файла нескольких конформационных вариантов рецептора выделение их в отдельные мишени;

- выделение области связывания лиганда, определение границ области поиска в области кармана связывания, подготовка конфигурационного файла для AutoDock Vina 1.2.3 (при помощи специализированного ПО [13]), уточнения позиций аминокислотных остатков макромолекулы, участвующих во взаимодействии с референтным лигандом и типов этих взаимодействий (при помощи ПО PLIP [14]);

- подготовка макромолекул с использованием набора утилит MGLTools 1.5.4. [15], и получение файла мишени в формате PDBQT.

Учитывая, что доступная модель НХР не содержала референтного лиганда в областях связывания, для формулирования референтного набора аминокислот проводили предварительный докинг с химическими соединениями, обладающими свойствами конкурентных блокаторов сайта связывания ацетилхолина. Их перечень включал: метилликаконитин, 13-десметил-спиролид, гимнодимин-А, дигидро-бета-эритроидин, пиннатоксин-А, пиннатоксин-Г. Наиболее частый паттерн аминокислотных остатков, взаимодействующий с указанными лигандами, был принят в качестве референтного (таблица 2).

Таблица 2. – Основные параметры мишеней на основе модели НХР

Наименование мишени	Референтный набор аминокислотных остатков мишени	Координаты центра (x;y;z) и размер области поиска (x;y;z), Å
2bg9_AE	36E , 38E ,55E, 108E , 118E, 167E, 93A,143A, 147A,148A,188A,195A	(40.0;75.0;135.0) (34.0;55.0;65.0)

Генерацию библиотек пептидных лигандов в формате SDF проводили с использованием ПО Bioware CycloPs [16].

Подготовку пептидных лигандов с последующим их сохранением в формате PDBQT проводили с использованием набора утилит MGLTools 1.5.4 [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. С учетом больших размеров библиотек пептидных лигандов использовали режим полугибкого докинга, при котором модель макромолекулы ригидна, а лиганд подвижен и способен изменять свою конформацию.

Проведение полугибкого докинга осуществляли посредством ПО AutoDock Vina 1.1.2 [17]. Докинг выполняли с учетом следующих настроек ПО Vina: exhaustiveness=8, num_modes =20, другие параметры – по умолчанию.

Результатом выполнения одного запуска полугибкого докинга с использованием ПО AutoDock Vina 1.1.2 является набор данных, характеризующий несколько моделей связывания («поз» докинга, binding models), обладающих минимальными значениями предсказанной энергии связывания (Affinity, kcal/mol). Количество «поз» докинга определяется параметрами «num_modes» (максимальное количество) и «energy_range», которые показывают диапазон энергии связывания (kcal/mol) между лучшим и худшим результатом, попадающим в набор результирующих данных одного запуска (параметр по умолчанию равен 3).

Учитывая, что параметр Affinity описывает только энергию связывания лиганда с мишенью и не характеризует особенности их взаимодействия, в частности вовлеченность определенных аминокислотных остатков мишени в связывание с лигандом, использование только этого показателя в качестве критерия для отбора пептидных лигандов приводит к большому количеству ложноположительных результатов («хитов»), в которые, как правило, попадают пептиды, содержащие большое количество ароматических и гетероциклических остатков (фенилаланин, тирозин, триптофан, триптофан, гистидин, пролин).

Эти обстоятельства затрудняли ранжирование результатов только по параметру аффинности (Affinity), поскольку программа для докинга обычно генерирует большое количество энергетически сравнимых ориентаций, для которых весьма сложен окончательный выбор. Для уменьшения числа ложноположительных результатов использовали дополнительные показатели, учитывающие позиции аминокислотных остатков макромолекулы, участвующих во взаимодействии с референтным и исследуемым лигандом. Данные об этих взаимодействиях получали при анализе комплексов мишень-лиганд, полученных после докинга набора референтных Н-холиноблокаторов с моделью НХР. Необходимость приведения большого набора данных к малому числу параметров, удобных для сравнения, потребовали расчета интегрального показателя, характеризующего сходство паттернов взаимодействия с мишенью у исследуемого и референтного лиганда.

В качестве оценочной функции для ранжирования результатов докинга циклопептидных лигандов использовали показатель «weighted_similarity», который рассчитывали по формуле (5):

$$\text{weighted_similarity} = \text{near} - 0,1 * \text{missed} \quad (1)$$

где:

- «near» – количество (в процентах относительно величины референтного набора аминокислот) совпадений в наборе аминокислотных остатков мишени при взаимодействии с исследуемым и референтным лигандом;

- «missed» - количество (в процентах относительно величины референтного набора аминокислот) взаимодействий исследуемого лиганда с мишенью, происходящие с аминокислотными остатками, не входящими в разрешенный набор.

При полном соответствии набора аминокислотных остатков исследуемого лиганда с референтным набором, показатель `weighted_similarity` равен 100%, при неполном – пропорционально меньше. При расчете данного показателя наибольший вес имеет факт связывания с критическими для ингибиторов аминокислотными остатками и дополнительно (с меньшим весом) величину оценки повышает факт связывания с другими остатками.

В результате одного докинга пары «мишень-лиганд» получали следующий набор данных:

- список наиболее вероятных «поз» докинга с соответствующим каждой позе показателем `Affinity`;
- минимальное значение `Affinity` среди всех поз в данном запуске (`Affinity.Min`);
- показатель `blocker_score` для той позы докинга, которая обладала минимальным значением `Affinity (weighted_similarity)`.

В качестве стартового набора структур для докинга с мишенью «2bg9_AE» была выбрана библиотека циклических пептидных лигандов CXXC (где X – это протеиногенные L-аминокислоты) с SS-связью, замыкающей цикл через два цистеиновых остатка, которую рассматривали в качестве модификаций, способной усилить биологическую активность исходных пептидных соединений. После докинга стартовой библиотеки и ранжирования результатов отбирали варианты с лучшими показателям `Affinity.Min` и `weighted_similarity` и на их основе строили библиотеки более высокого порядка путем наращивания цепи.

Отбор лучших лигандов (для формирования библиотек второго уровня вида YCXXCY), проводили на соответствие следующим критериям: `Affinity.Min` < -7.9 и `weighted_similarity` > 60%. При отборе пептидов в библиотеках второго уровня критериями было: `Affinity.Min` < -9 и `weighted_similarity` > 70%. При отборе соединений-кандидатов в библиотеках третьего уровня (вида ZYCXXCYZ) критериями было: `Affinity.Min` < -10 и `weighted_similarity` > 90%.

Синтез отобранных пептидов проводили твердофазным методом с использованием 2-хлортритилхлоридной смолы с последовательным наращиванием цепи по Fmoc/tBu-стратегии. В качестве конденсирующих агентов использовали 1-гидрокси-бензотриазол

(HOBt) и N, N'-диизопропилкарбодимид (DIC), а также аминокислоты фирмы «Iris Biotech» чистотой не менее 98 %. В результате синтеза были получены лиофилизированные субстанции чистотой не менее 95 %. Подтверждение структуры и чистоты наработанных образцов проводили методом высокоэффективной хроматографии с масс-селективным детектированием (Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, США).

Для проведения медико-биологических исследований синтезированных образцов применяли метод оценки тонуса мышц животных по времени удержания на перевернутой решетке (время теста ограничивали 15 сек), а также оценки продолжительности бега крыс на третбане (Exer 3/6 Columbus Instruments, США).

Результаты и их обсуждение.

По результатам докинга стартовой библиотеки циклопептидов CXXC было отобрано одиннадцать соединений, показатели которых в наибольшей степени близки к нативной форме. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. - Результаты докинга библиотеки циклопептидов CXXC с мишенью «2bg9_AE»

Пептидные лиганды	Показатели	
	Среднее значение соответствия референтным лигандам, %	Среднее значение аффинности, ккал/моль
CHRC	66,3	-8,3
CWAC	65,8	-7,9
CWRC	65,1	-9,0
CHQC	64,6	-8,9
CHWC	64,4	-8,1
CFVC	63,7	-8,0
CVRC	61,8	-8,0
CLWC	61,6	-8,1
CWHC	61,6	-8,9
CFRC	60,5	-8,3
CMVC	60,3	-8,0

На основе отобранных пептидов было сгенерировано одиннадцать библиотек второго уровня вида YCXXCY (где X и Y – протеиногенные L-аминокислоты) и выполнен их докинг с выбранной ранее мишенью. Стратегия отбора предполагала увеличение показателей blocker_score и Affinity.Min в библиотеках второго уровня. Результаты исследования представлены в таблице 4.

После докинга библиотеки YCXXCY был проведен отбор лучших лигандов (для формирования библиотек третьего уровня вида ZYCXXCYZ (где X, Y и Z – протеиногенные L-аминокислоты). На основе отобранных пептидов было сгенерировано двенадцать библиотек третьего уровня ZYCXXCYZ и выполнен их докинг с выбранной ранее мишенью.

Стратегия отбора предполагала увеличение показателей blocker_score и Affinity.Min. Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 4. - Результаты докинга библиотек второго уровня циклопептидов YCXXCY с мишенью «2bg9_AE»

Пептидные лиганды	Показатели	
	Среднее значение соответствия референтным лигандам, %	Среднее значение аффинности, ккал/моль
PCHRCF	75,2	-9,7
RCVRCW	74,6	-9,0
KCHRCW	74,0	-9,3
ICFRCW	73,8	-9,1
RCWRCY	73,5	-9,2
HCWRCA	72,2	-9,8
WCHWCE	71,8	-9,1
WCWACR	71,8	-9,0
NCWRCY	71,7	-9,3
HCWACR	70,2	-9,0
TCFRCF	70,0	-9,0
HCWRCV	70,0	-9,0

Таблица 5. - Результаты докинга библиотек третьего уровня циклопептидов ZYCXCYZ с мишенью «2bg9_AE»

Пептидные лиганды	Среднее значение соответствия референтным лигандам, %	Среднее значение аффинности, ккал/моль
YPCCHRCFW	93,3	-10,7
VHCWRCVW	93,3	-10,1
WTCFRCFP	91,7	-10,5
FRCVRCWW	91,7	-10,8
HWCWACRH	91,7	-10,8
FWCHWCER	90,0	-10,2
GRCWRCYW	90,0	-10,4

Были отобраны лучшие соединения-кандидаты, характеризовавшиеся высокими показателями предсказанного сродства с мишенью и паттерном нековалентного взаимодействия с активным центром мишени, сходным с референтным лигандом. Эти соединения были выбраны для синтеза и последующей медико-биологической оценки их эффектов.

Исследование биологических эффектов наработанных пептидов проводили в опытах на крысах. У животных моделировали экспериментальную миастению (состояние, сопровождающееся слабостью мышц) путем внутривенного (в/в) введения миорелаксанта рокурония в дозе 0,5 мг/кг. После введения миорелаксанта у животных снижался мышечный тонус, нарушалась возможность к перемещениям. Выраженность снижения мышечного

тонуса оценивали визуально по времени удержания на перевернутой решетке. Исследуемые пептиды вводили в/в в дозе 1 мг/кг через 30 мин после миорелаксанта и оценивали время удержания (в сек) и продолжительность бега на третбане (в мин). В норме большинство животных удерживались на решетке не менее 15 сек, а продолжительность бега на третбане у них составляла более 30 мин. Результаты медико-биологических исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6. - Результаты оценки влияния исследуемых пептидов на время удержания на решетке (в сек) и продолжительность бега на третбане (в мин) на модели экспериментальной миастении у крыс ($M \pm m$, $n=10$)

Группа	Показатели	
	Удержание на решетке, сек	Продолжительность бега, мин
Контроль	15,0 $\pm$ 0,5	32,0 $\pm$ 4,5
Миорелаксант	4,3 $\pm$ 2,2	3,5 $\pm$ 3,8
YPCHRCFW	4,6 $\pm$ 1,8	3,2 $\pm$ 2,4
VHCWRCVW	5,4 $\pm$ 1,6	4,0 $\pm$ 3,7
WTCFRFCF	1,1 $\pm$ 0,8*	-
FRCVRCWW	1,4 $\pm$ 0,6*	-
HWCWACRH	12,2 $\pm$ 1,9*	22,2 $\pm$ 1,5*
FWCHWCER	13,1 $\pm$ 0,8*	23,4 $\pm$ 2,4*
GRCWRCYW	15,0 $\pm$ 0,5*	30,0 $\pm$ 3,2*
Примечание - * - различия с группой «миорелаксант» статистически значимы при $p < 0,05$		

Отмечали, что после применения миорелаксанта у животных снижался общий мышечный тонус, что отражалось в уменьшении времени удержания на решетке (до 4,3 $\pm$ 2,2 сек) и статистически значимо уменьшалась способность к выполнению физической нагрузки (продолжительность бега снижалась до 3,5 $\pm$ 3,8 мин по сравнению 32,0 $\pm$ 4,5 мин в контроле). Два исследованных образца YPCHRCFW и VHCWRCVW практически не оказывали влияния на проявления эффектов миорелаксанта, в то время как два других образца WTCFRFCF и FRCVRCWW способствовали утяжелению проявлений миастении: животные удерживались на решетке не более 1-2 сек, утрачивали способность к самостоятельному перемещению и не могли выполнять физическую нагрузку на третбане. По-видимому, два последних образца обладали свойствами миорелаксантов (блокаторов НХР). При оценке образцов HWCWACRH, FWCHWCER и GRCWRCYW выявляли лечебный эффект, который проявлялся в нормализации общего состояния животных и восстановлении их способности выполнять физическую нагрузку. По-видимому, биологическое действие этих образцов было связано с активацией НХР. Наибольшее лечебное действие отмечали у образца GRCWRCYW, после введения которого на модели

экспериментальной миастении, вызванной миорелаксантом, выявляли полное восстановление мышечного тонуса и нормализацию показателя физической работоспособности в тесте «бег на третбане».

Заключение.

С использованием модели HXP Torpedo marmorata из базы данных Protein Data Bank проведен виртуальный скрининг библиотек циклических пептидов длиной 4-8 аминокислот, содержащих одну SS-связь. Путем последовательного отбора соединений-кандидатов и построения на их основе библиотек более высокого порядка путем наращивания цепи на N- и C-конце пептида получены 7 образцов с предсказанными свойствами лигандов ортостерического сайта связывания ацетилхолина периферических Н-холинорецепторов с высокими показателями соответствия референтным соединениям по паттерну взаимодействия с мишенью. Синтезированные образцы методом твердофазного синтеза были исследованы в опытах на крысах на модели экспериментальной миастении, вызванной внутривенным введением миорелаксанта рокурония. Наибольшее лечебное действие отмечали у образца GRCWRCYW, после введения которого выявляли полное восстановление мышечного тонуса и нормализацию показателя физической работоспособности в тесте «бег на третбане».

Литература.

1. Iturriaga-Vásquez P., Alzate-Morales J., Bermudez I., et al. Multiple binding sites in the nicotinic acetylcholine receptors: An opportunity for polypharmacology. *Pharmacological Research*. 2015; 101: 9-17.
2. Jaghoori M.M., Bleijlevens B., Olabarriaga S. D. 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening. *Journal of computer-aided molecular design*. 2016; 30(3): 237-249.
3. Karlin A., Akabas M.H. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron*. 1995; 15(6): 1231-1244.
4. Dennis M., Giraudat J., Kotzyba-Hibert F, et al. Amino acids of the Torpedo marmorata acetylcholine receptor. alpha. subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site. *Biochemistry*. 1988; 27(7): 2346-2357.
5. Abramson S.N., Li Y., Culver P., Taylor P. An analog of lophotoxin reacts covalently with Tyr190 in the α -subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264(21): 12666-12672.
6. Galzi J.L., Revah F., Black D., et al. Identification of a novel amino acid alpha-tyrosine 93 within the cholinergic ligands-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligands-binding sites. *Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265(18): 10430-10437.
7. Cohen J.B., Sharp S.D., Liu W.S. Structure of the agonist-binding site of the nicotinic acetylcholine receptor.[3H] acetylcholine mustard identifies residues in the cation-binding subsite. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266(34): 23354-23364.
8. Middleton R.E., Cohen J.B. Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor:[3H] nicotine as an agonist photoaffinity label. *Biochemistry*. 1991; 30(28): 6987-6997.
9. Purohit P., Auerbach A. Glycine hinges with opposing actions at the acetylcholine receptor-channel transmitter binding site. *Molecular pharmacology*. 2011; 79(3): 351-359.
10. Sullivan D.A., Cohen J.B. Mapping the agonist binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: orientation requirements for activation by covalent agonist. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(17): 12651-12660.
11. Mallipeddi P.L., Pedersen S.E., Briggs J.M. Interactions of acetylcholine binding site residues contributing to nicotinic acetylcholine receptor gating: Role of residues Y93, Y190, K145 and D200. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2013; 44: 145-154.

12. Luttmann E., Ludwig J., Höffle-Maas A., et al. Structural model for the binding sites of allosterically potentiating ligands on nicotinic acetylcholine receptors. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*. 2009; 4(11): 1874-1882.
13. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022612627 Российская Федерация. Программа для создания конфигурационного файла для проведения молекулярного докинга в программах на основе Autodock Vina: № 2022612269: заявл. 18.02.2022: опубл. 28.02.2022 / Верецагин В. В., Иванов И. М., Никифоров А. С., Голосов Р. Д. / Заявитель ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации.
14. Salentin S., Schreiber S., Haupt V.J., et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*. 2015; 43(W1): W443-W447.
15. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009; 30(16): 2785-2791.
16. Duffy F.J., Verniere M., Devocelle M., et al. CycloPs: generating virtual libraries of cyclized and constrained peptides including nonnatural amino acids. *Journal of chemical information and modeling*. 2011; 51(4): 829-836.
17. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*. 2010; 31(2): 455-461.