

ДИЗАЙН МУЛЬТИТАРГЕТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА НА ОСНОВЕ ИНГИБИТОРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

*Г.Ф. Махаева¹, С.В. Луцкина^{1,2}, Н.В Ковалева¹, Н.П. Болтнева¹,
Е.В. Рудакова¹, Е.В. Радченко^{1,3}, В.А. Палюлин^{1,3}, И.В. Серков¹, А.Н. Прошин¹,
С.О. Бачурин¹, R.J. Richardson⁴*

¹Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия;

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия;

³ Химический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия;

⁴Center of Computational Medicine and Bioinformatics, University of Michigan, Ann Arbor, MI USA

Болезнь Альцгеймера (БА) - нейродегенеративное заболевание, одна из наиболее распространенных форм деменций в пожилом возрасте (60-80% всех случаев).

БА характеризуется гибелью нервных клеток в головном мозге, что приводит к различным неврологическим расстройствам — снижению когнитивных функций и потере памяти, двигательным нарушениям, психо-эмоциональным расстройствам, и в конечном итоге - к полной деградации личности.

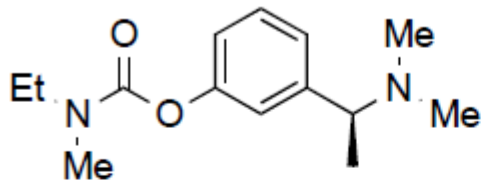
Это заболевание представляет в настоящее время серьезную социальную и медицинскую проблему в связи с прогрессирующим ростом числа больных, значительными экономическими потерями, связанными с уходом за пациентами и отсутствием эффективной терапии.

По данным ВОЗ количество пациентов с БА и близкими формами деменции в мире оценивается примерно в 30-35 млн. и удваивается примерно каждые 10 лет. Ожидается, что к 2030 году число больных БА достигнет 70 млн. человек.

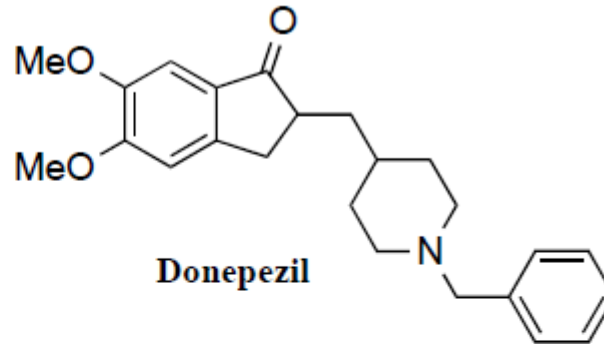
Эффективных средств терапии БА в настоящее время нет.

Ингибиторы холинэстераз в терапии БА

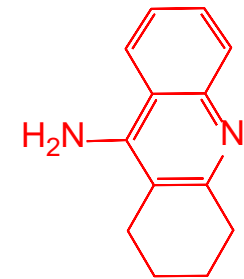
БА характеризуется холинергическим дефицитом, поэтому ингибиторы холинэстераз, увеличивающие концентрацию ацетилхолина в синапсе, являются в настоящее время основными препаратами, применяющимися на практике. Это Донепезил, Ривастигмин, Галантамин и антагонист NMDA рецепторов Мемантин



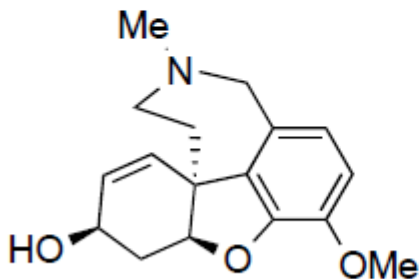
Rivastigmine



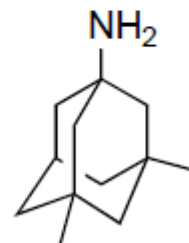
Donepezil



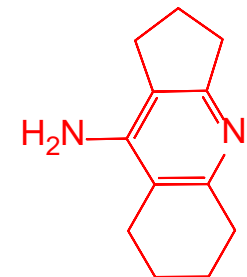
Tacrine



Galantamine

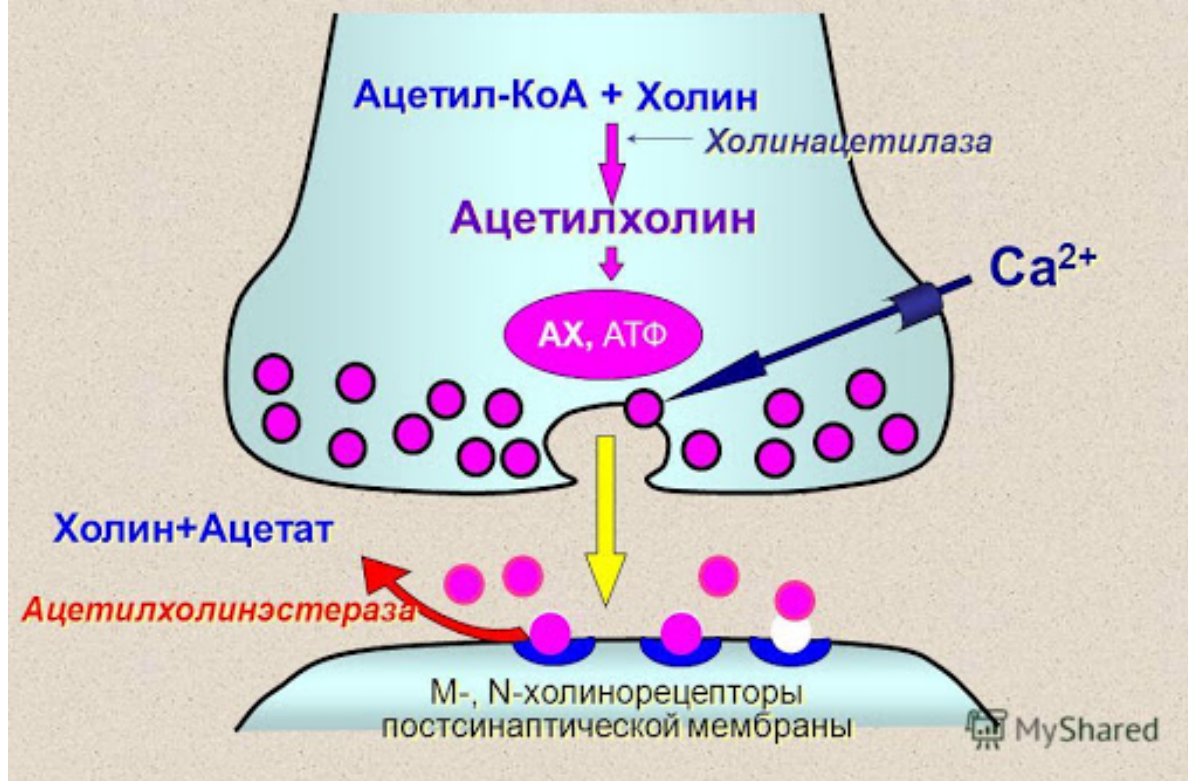


Memantine

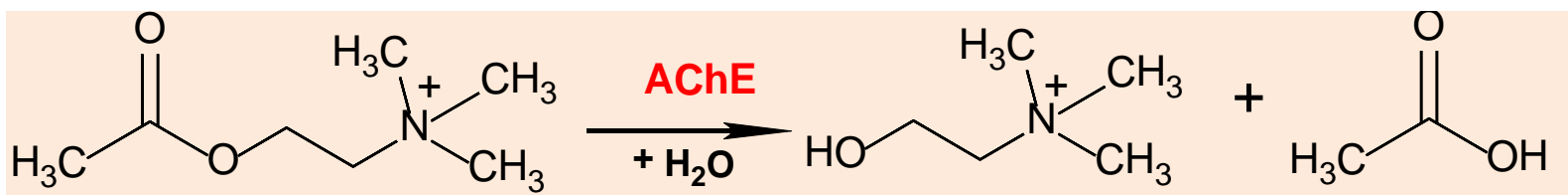


Amiridine

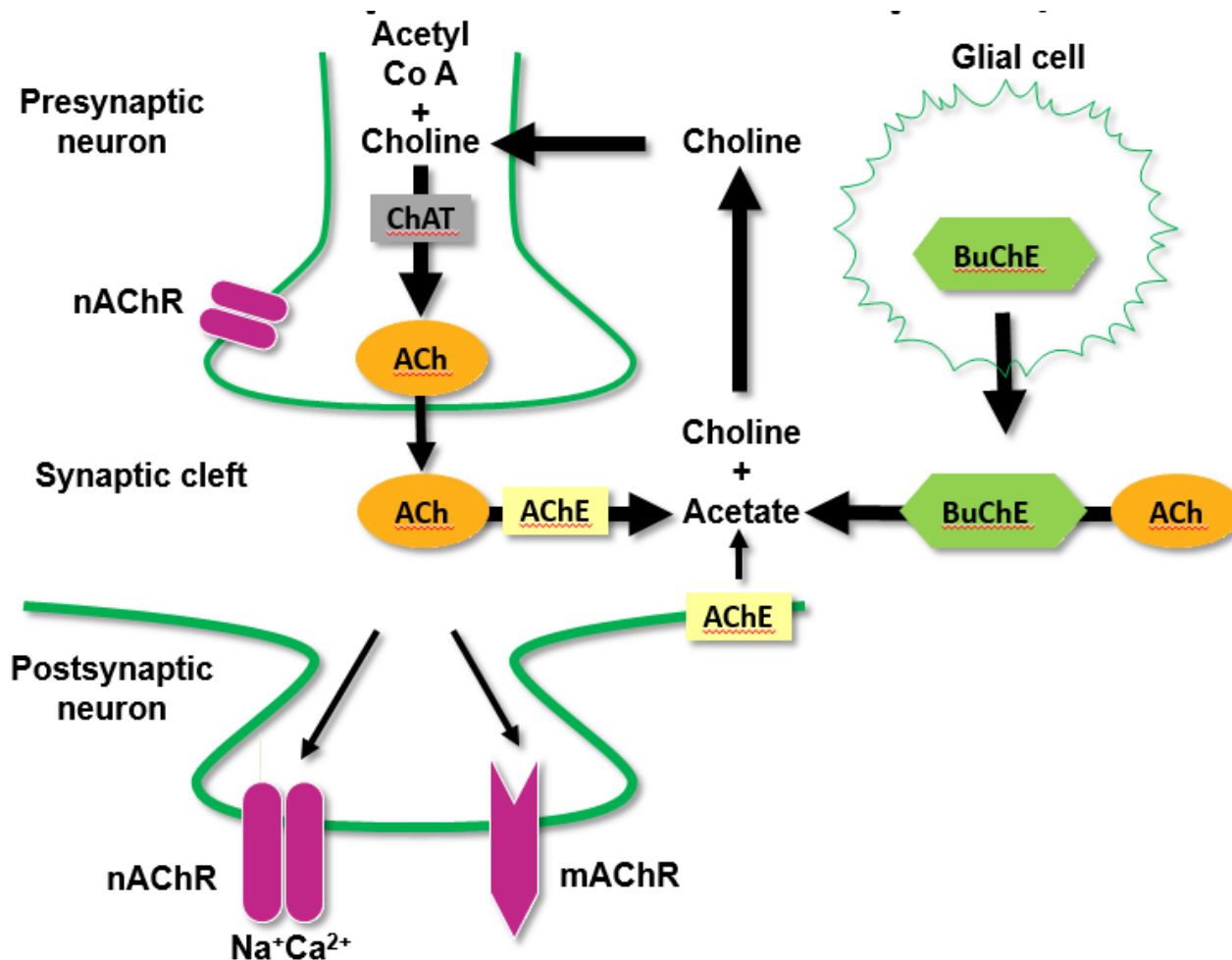
ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЙ СИНАПС



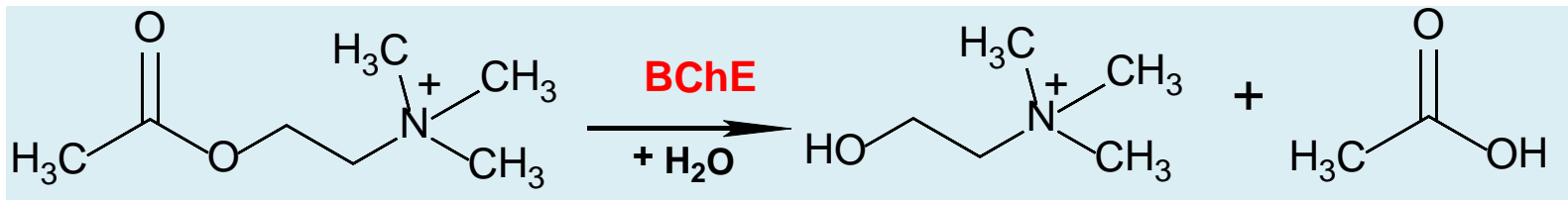
В здоровом мозге ацетилхолин преимущественно (80%) гидролизуется АХЭ, тогда как БХЭ играет вспомогательную роль



Участие БХЭ в холинергической нейротрансмиссии



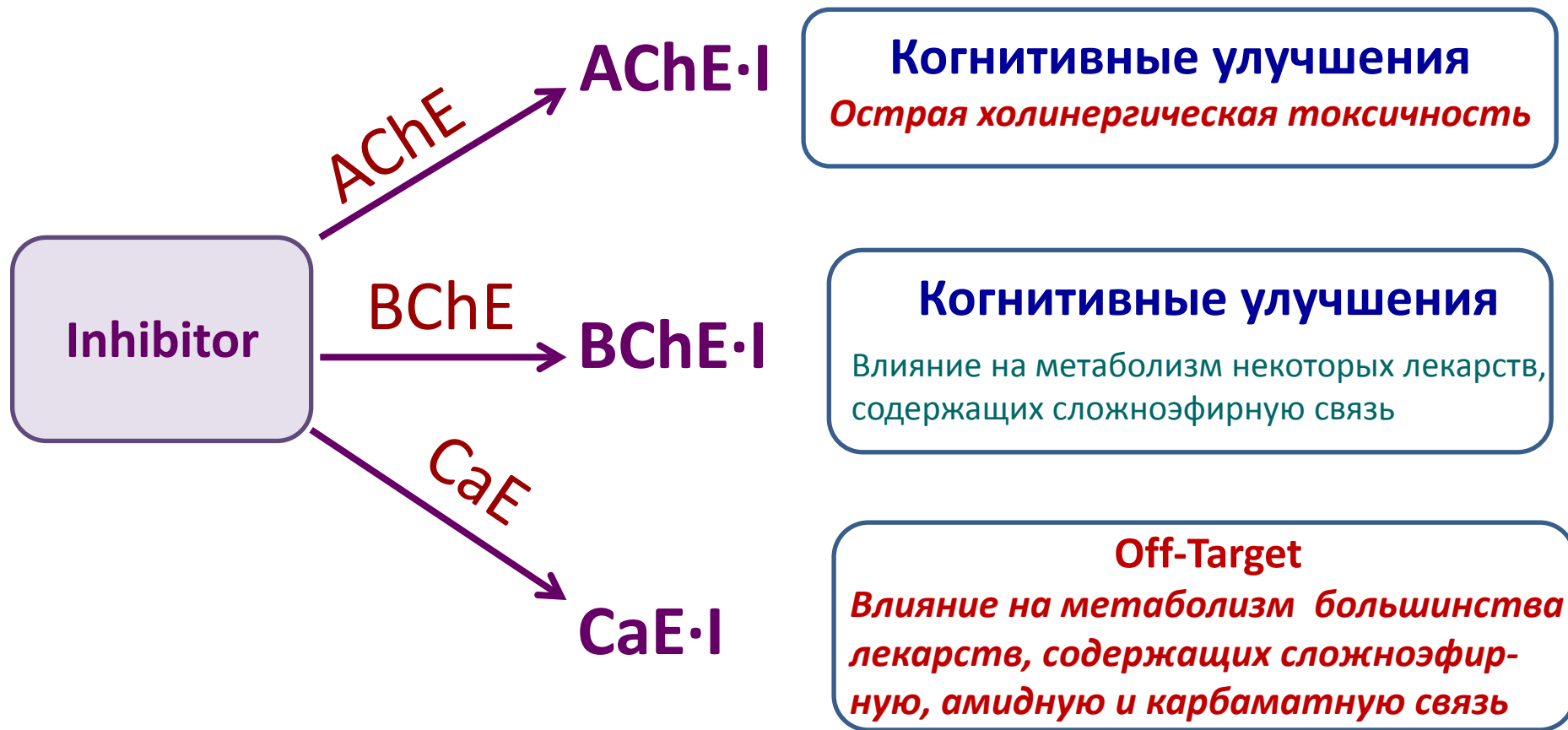
По мере прогрессирования БА активность АХЭ снижается, в то время как активность БХЭ постепенно увеличивается. На поздних стадиях АХ на 80% гидролизует БХЭ и соответственно возрастает роль БХЭ как терапевтической мишени для снижения холинергического дефицита.



Селективные ингибиторы БХЭ повышают уровень ацетилхолина в мозге, не оказывая при этом классических побочных эффектов характерных для ингибиторов АХЭ.

В связи с этим, современным направлением развития антихолинэстеразной терапии БА является как разработка селективных ингибиторов БХЭ, так и соединений, ингибирующих обе холинэстеразы – АХЭ и БХЭ, что повышает эффективность лечения.

Эстеразный профиль ингибиторов сериновых эстераз и их фармакологические эффекты



Сравнительная характеристика действия соединений на ключевые мишени холинергической нервной системы – АХЭ и БХЭ, ингибирование которых приводит к повышению концентрации нейромедиатора - АХ, и на и структурно близкий фермент КЭ, ингибирование которой может быть причиной нежелательных лекарственных взаимодействий.

Концепция эстеразного профиля разработана нами совместно с Е.В. Радченко и В.А. Палюлиным и позволяет с использованием метода МФТА конструировать соединения с заданным эстеразным профилем, а именно:

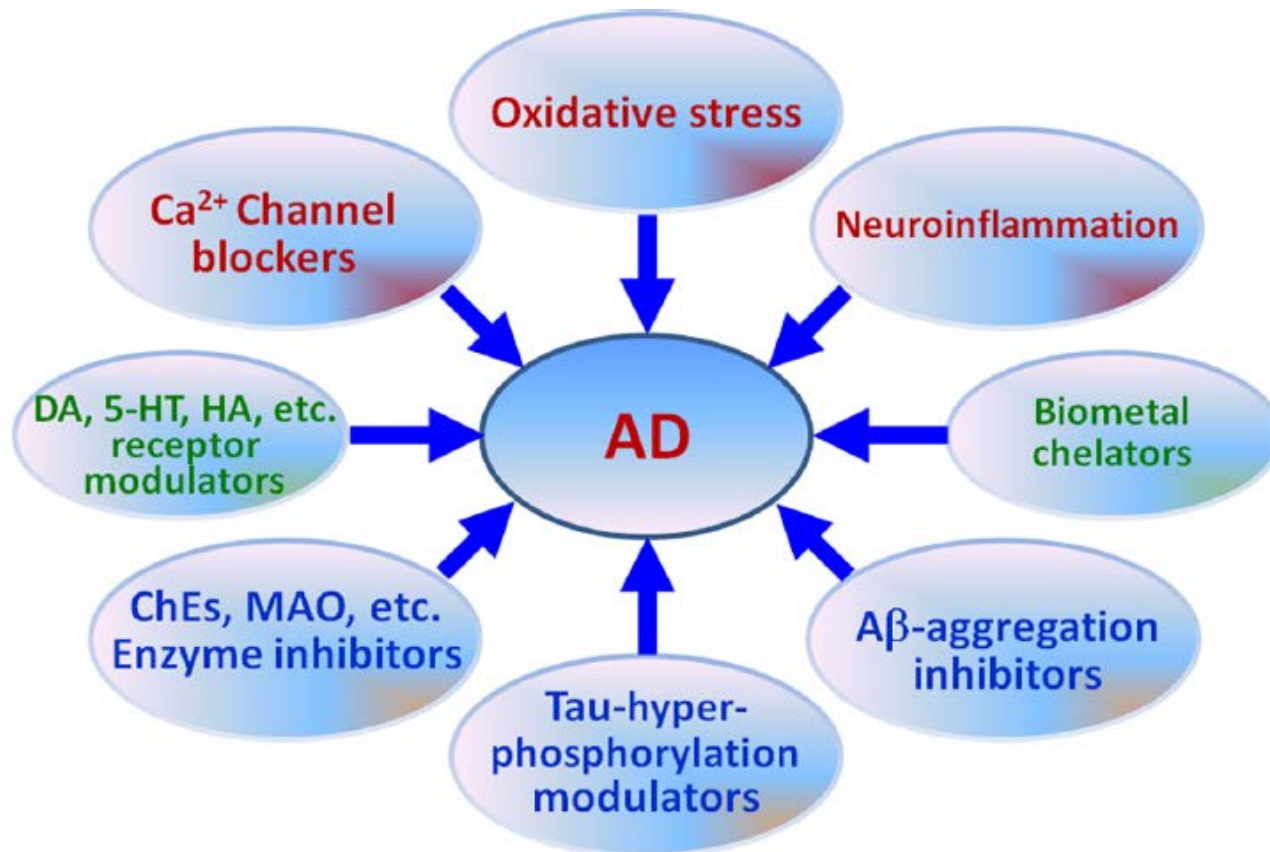
1) С отсутствием ингибирования КЭ

2) С преимущественным ингибированием БХЭ или АХЭ

1. Радченко Е.В., Мельников А.А., Махаева Г.Ф., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. (2012) Молекулярный дизайн O-фосфорилированных оксимов – селективных ингибиторов бутирилхолинэстеразы. *ДАН*, том 443, № 3, с. 382–386
2. Makhaeva G.F., Radchenko E.V., Baskin I.I., Palyulin V.A., Richardson R.J., and Zefirov N.S. (2012) Combined QSAR studies of inhibitor properties of O-phosphorylated oximes toward serine esterases involved in neurotoxicity, drug metabolism, and Alzheimer's disease *SAR QSAR Env. Res.* 23 (7-8), 627-647
3. Makhaeva G.F., Radchenko E.V., Palyulin V.A., Rudakova E.V., Aksinenko A.Yu., Sokolov V.B., Zefirov N.S., Richardson R.J. (2013) Organophosphorus compound esterase profiles as predictors of therapeutic and toxic effects. *Chem. Biol. Interact.*, V. 203, P. 231-237
4. Радченко Е.В., Махаева Г.Ф., Болтнева Н.П., Серебрякова О.Г., Серков И.В., Прошин А.Н., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. (2016) Молекулярный дизайн N,N-дизамещенных 2-аминотиазолинов – селективных ингибиторов карбоксилэстеразы. *Известия АН, Серия химическая*, № 2, с. 570-575.
5. Makhaeva G.F., Rudakova E.V., Serebryakova O.G., Aksinenko A.Yu., Bachurin S.O., Richardson R.J. (2016) Esterase profiles of organophosphorus compounds *in vitro* predict their behavior *in vivo*. *Chem. Biol. Interact.*, 259(Pt B), 332-342.

Однако использование ингибиторов ХЭ , в т.ч. в комбинации с мемантином, лишь частично компенсирует симптоматику заболевания - утраченные когнитивные функции, и не может остановить развитие собственно нейродегенеративного процесса

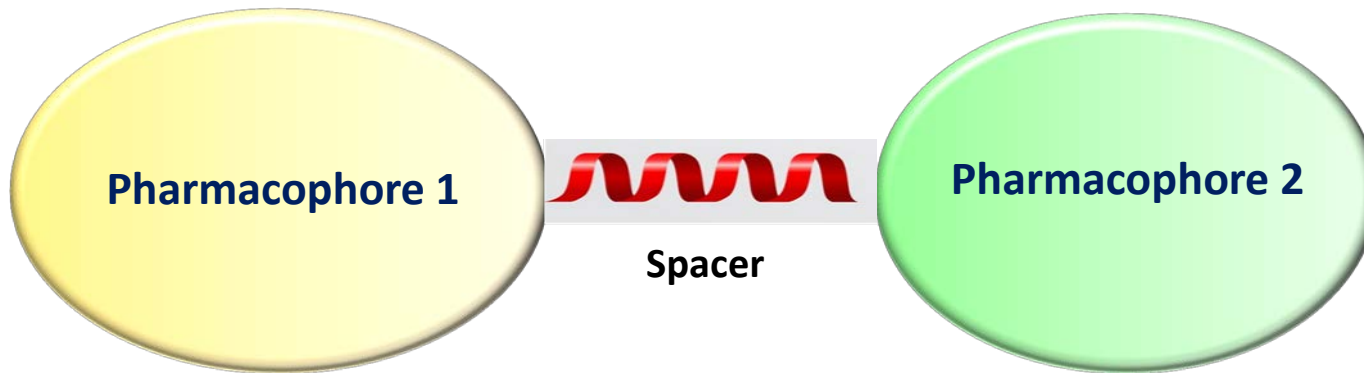
БА является комплексным, мультифакторным заболеванием и характеризуется нарушением работы нейромедиаторных систем, отложением аберрантных белков (бета-амиоида и тау-белка), развитием окислительного стресса, митохондриальной дисфункцией, потерей синапсов и гибелью нервных клеток, особенно холинергических нейронов.



Идеальная для терапии БА малая молекула должна модулировать все рецепторы или ферментативные системы, а также окислительный стресс, воспаление, дисгомеостаз Ca²⁺ и т. д., вовлеченные в патологию.

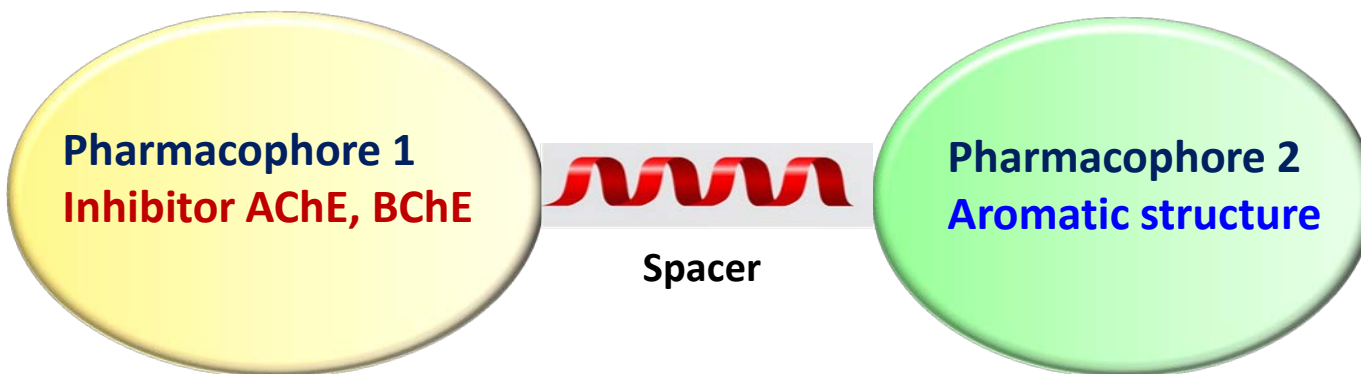
Современная перспективная стратегия повышения эффективности лечения комплексных мультифакторных заболеваний состоит в создании мультитаргетных препаратов, взаимодействующих с несколькими ответственными за патогенез мишенями.

Один из подходов опирается на создание гибридных структур – конъюгатов, содержащих два различных фармакофора, соединенных спейсером:



Современная перспективная стратегия повышения эффективности лечения комплексных мультифакторных заболеваний состоит в создании мультитаргетных препаратов, взаимодействующих с несколькими ответственными за патогенез мишенями.

Один из подходов опирается на создание гибридных структур – конъюгатов, содержащих два различных фармакофора, соединенных спейсером:

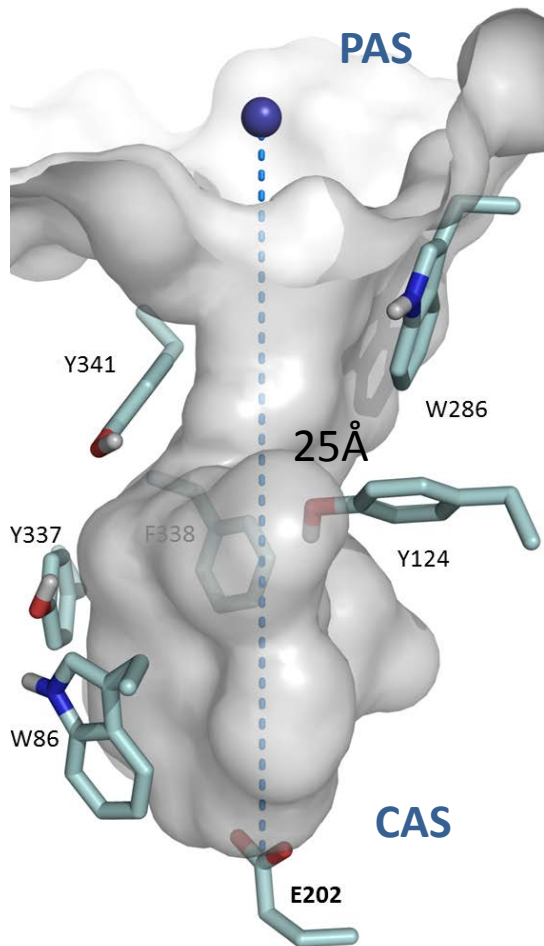


В качестве одного фармакофора часто используют известную молекулу анти-ХЭ препарата, а в качестве второго вводят фрагменты, придающие конъюгатам нейропротекторные и болезнь-модифицирующие свойства, в частности, антиагрегантные и/или антиоксидантные.

При этом молекула конъюгата может приобретать свойства, которыми не обладали исходные фармакофоры.

Агрегация и отложение пептидов бета-амилоида в мозге играет ключевую роль в возникновении и прогрессии БА, при этом нейротоксичными являются амилоидные бляшки или, более вероятно, их растворимые олигомеры.

АХЭ помимо классической функции гидролиза ацетилхолина обладает проагрегантными свойствами в отношении бета-амилоида через участие периферического анионного сайта (PAS), который взаимодействует с растворимыми пептидами бета-амилоида, промотируя их агрегацию, т.е. выполняет функции шаперона.



Канал, ведущий к каталитическому активному центру (CAS) АХЭ. У входа – PAS, на дне – CAS.

Создание ингибиторов АХЭ, связывающихся с CAS и PAS и таким образом нарушающих взаимодействие с PAS бета-амилоида и препятствующих его агрегации, является одним из перспективных направлений антиамилоидной стратегии терапии БА.

Ингибирование АХЭ также все больше связывают со снижением патологической агрегации бета-амилоида, хотя механизм пока не ясен.

Аминокислоты, формирующие канал АХЭ и БХЭ

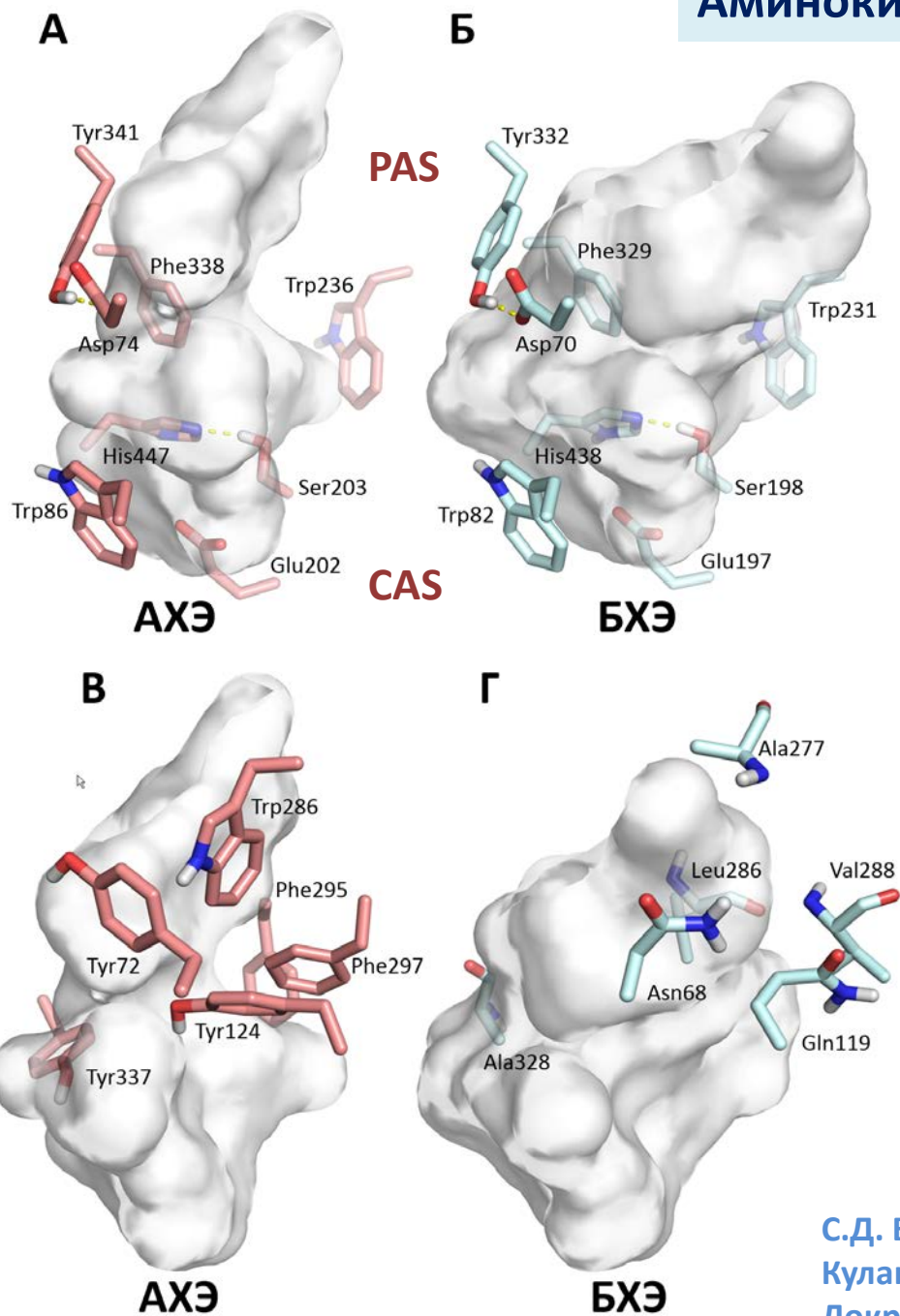
Аминокислотные последовательности АХЭ и БХЭ гомологичны на 53%, их структуры и каталитические механизмы также сходны, однако ферменты различаются по субстратной специфичности и сродству к различным ингибиторам, что объясняется различиями в строении каналов, ведущих к активным центрам ферментов

А и Б – аминокислоты, одинаковые у обоих ферментов, в том числе аминокислотные остатки активного сайта (CAS): каталитическая триада Ser203/198·His447/438·Glu334/325 (не показан) и π-катион-связывающий сайт Trp86/82·Glu202/197. Asp74/70 и Tyr341/332 формируют PAS

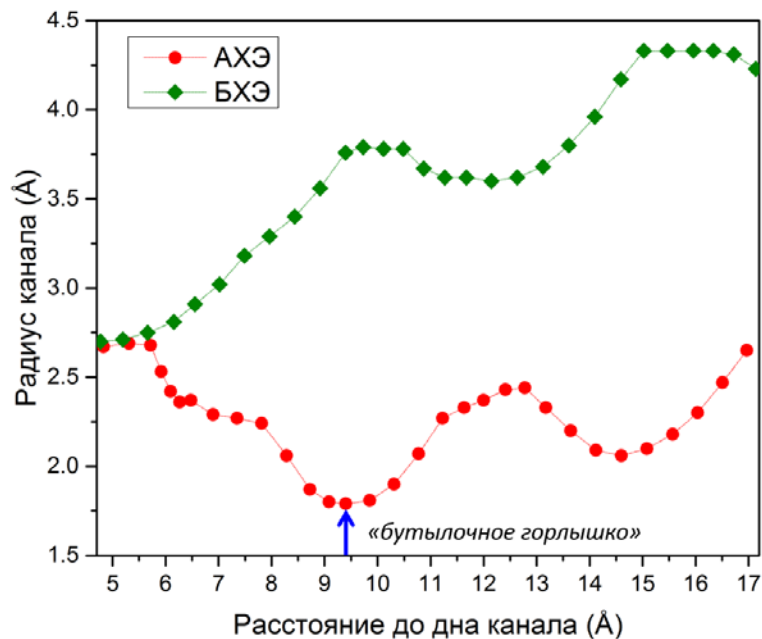
В и Г — основные аминокислоты, выстилающие канал, различающиеся у АХЭ и БХЭ. У АХЭ остатки Tyr337 и Tyr124 формируют т.н. «бутылочное горлышко», отсутствующие у БХЭ

6 из 14 ароматических остатков, которые выстилают канал активного центра АХЭ, заменены у БХЭ на меньшие по размеру алифатические аминокислоты, что делает активный центр БХЭ более объемным (500 Å) по сравнению с активным центром АХЭ (300 Å), и позволяет вмещать более широкий спектр субстратов и ингибиторов

С.Д. Варфоломеев, С.В. Луцкина, А.В. Немухин, А.М. Кулакова, Е.Д. Коц, Г.Ф. Махаева, Э. Делакур, О. Локридж, П. Массон, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2016, 1592



Изменение радиусов каналов АХЭ и БХЭ по мере удаления от дна канала (остаток Glu202/Glu197), оцененных при помощи программы Caver Analyst



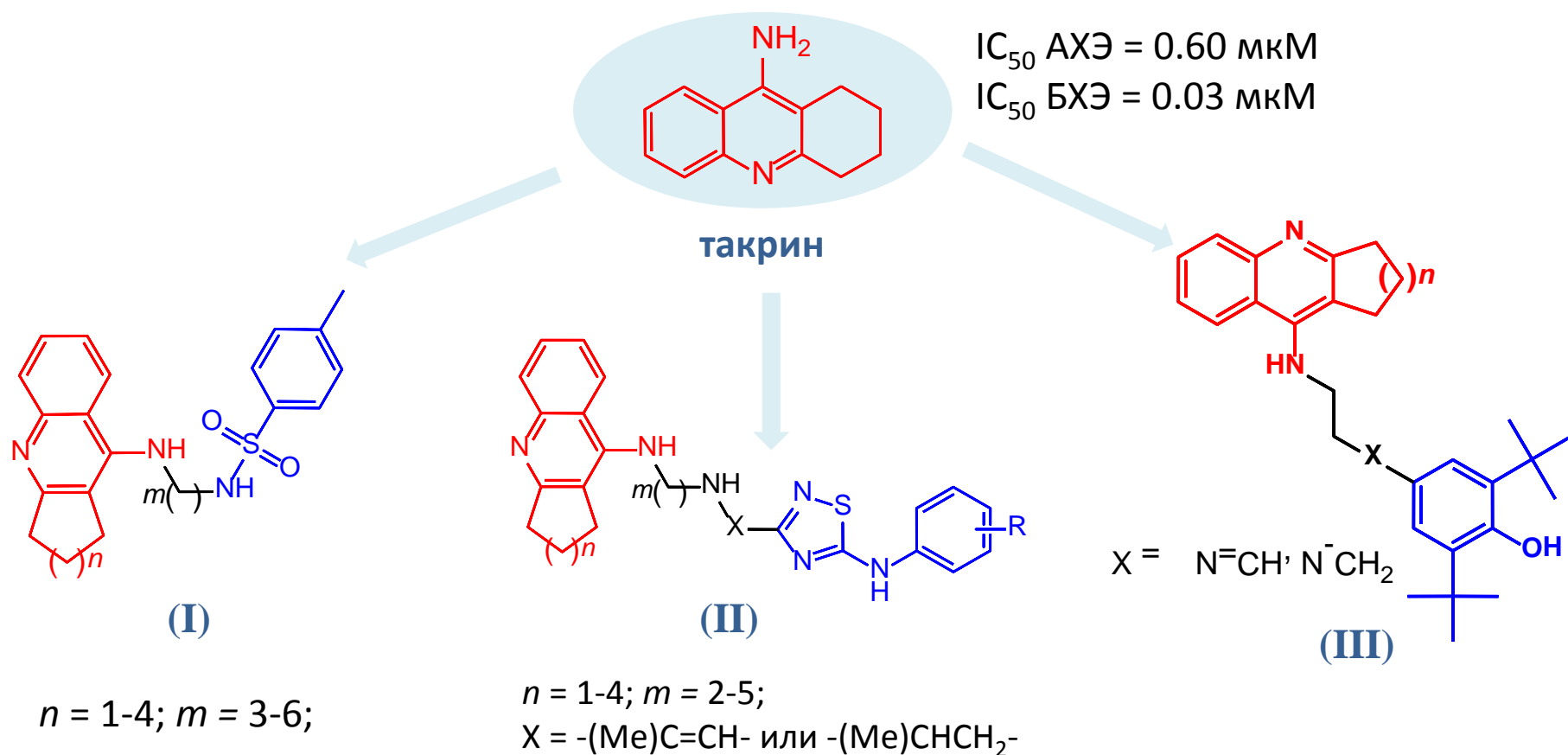
Махаева Г.Ф., Рудакова Е.В., Ковалева Н.В., Луцкина С.В., Болтнева Н.П., Прошин А.Н., Щегольков Е.В., Бургарт Я.В., Салоутин В.И. (2019) Ингибиторы холинэстераз и карбоксилэстераз как фармакологические агенты (обзор). *Известия АН, Сер. хим.* №5, с. 967-984

Что мы исследуем для новых гибридных соединений:

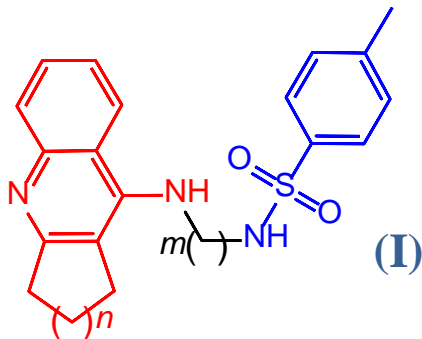
1. Эстеразный профиль - действие на ключевые мишени холинергической нервной системы – АХЭ и БХЭ на и структурно близкий фермент КЭ. + кинетика ингибирования.
2. Исследование вытеснения пропидия из PAS АХЭ как оценка потенциальной способности соединений блокировать АХЭ-индуцируемую агрегацию β -амилоида.
3. Исследование собственной антиоксидантной активности соединений.
4. Для анализа эстеразного профиля используются методы компьютерного моделирования, включая современные методы QSAR, методы молекулярного докинга и молекулярной динамики, дополненные, если требуется, высокоточными методами КМ/ММ
5. Используются компьютерные методы предсказания ADMET профиля соединений

Конъюгаты такрина и его гомологов с *p*-толил-сульфонамидом (I) производными 1,2,4-триадиола (II) и ВНТ (ионолом, III)

Высокое сродство такринового фрагмента к каталитическому сайту АХЭ широко используется для создания на его основе гибридных соединений – конъюгатов с широким спектром фармакологической активности.

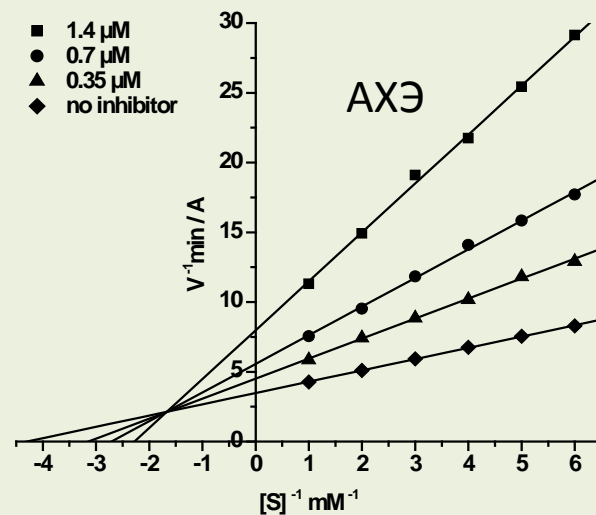


Конъюгаты такрина и его гомологов с *пара*-толил-сульфонамидом (I)



$n = 1-4$: алифатический цикл C5-C8
 $m = 3-5$: длина спейсера

- 1) Эффективные ингибиторы АХЭ и БХЭ, Оптимальный для ингибирования АХЭ размер алифатического цикла C-6 ($n=2$), а для ингибирования БХЭ - C6 и C7 ($n=3$);
- 2) Анти-АХЭ растет с увеличением длины спейсера m соединение-лидер (C6, $m=5$): IC_{50} АХЭ=0.13 μ M – в 5 раз лучше такрина; анти-БХЭ не меняется;
- 3) Ингибиторы АХЭ и БХЭ смешанного типа;
- 4) Вытесняют пропидий из PAS АХЭ (до 20% с увеличением m);
- 5) Не ингибируют КЭ;
- 6) Хороший ADMET профиль

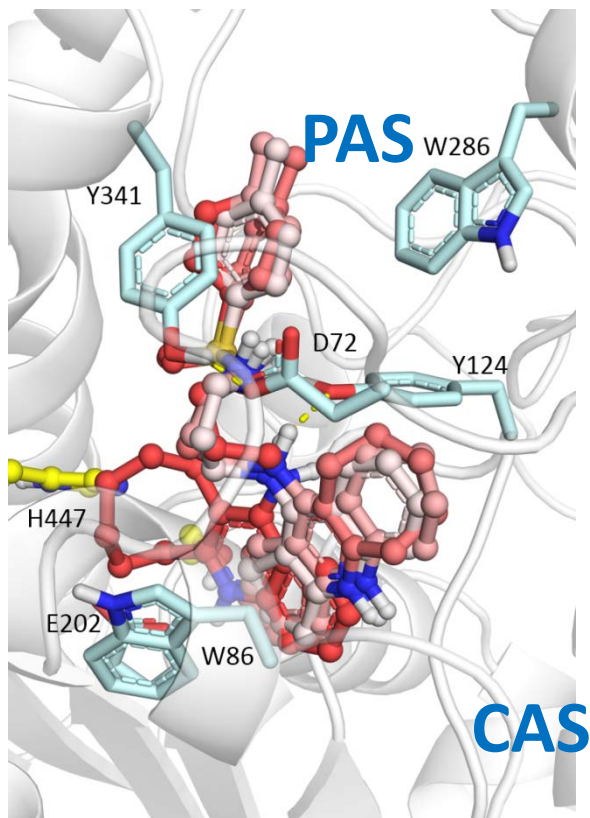


Результаты молекулярного докинга 1) подтверждают связывание гибридов с CAS и PAS АХЭ и 2) показывают, что различия в структуре активных центров АХЭ и БХЭ приводят к различным отношениям структура-ингибиторная активность для этих ферментов.

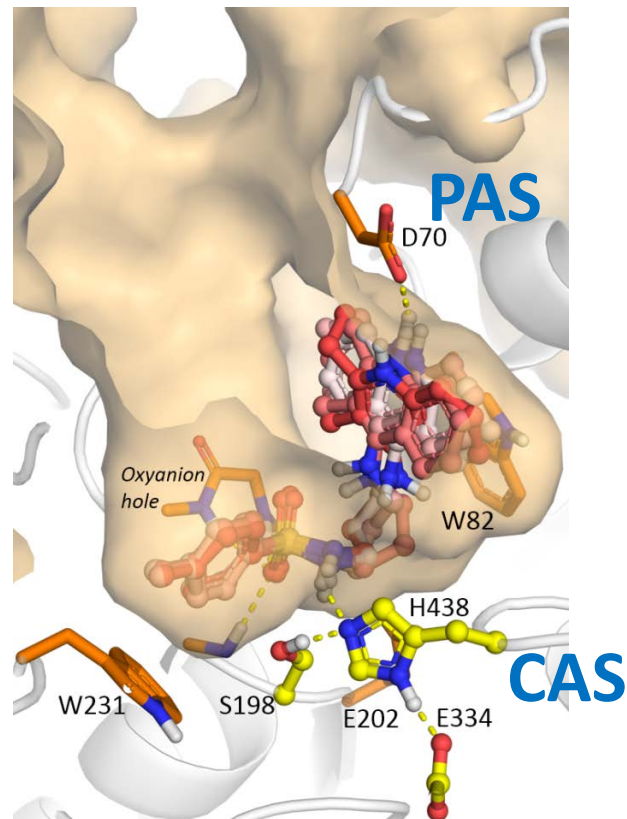
Молекулярный докинг конъюгатов I в АХЭ и БХЭ

Влияние размера алифатического кольца (для спейсера $m=3$)

АХЭ



БХЭ



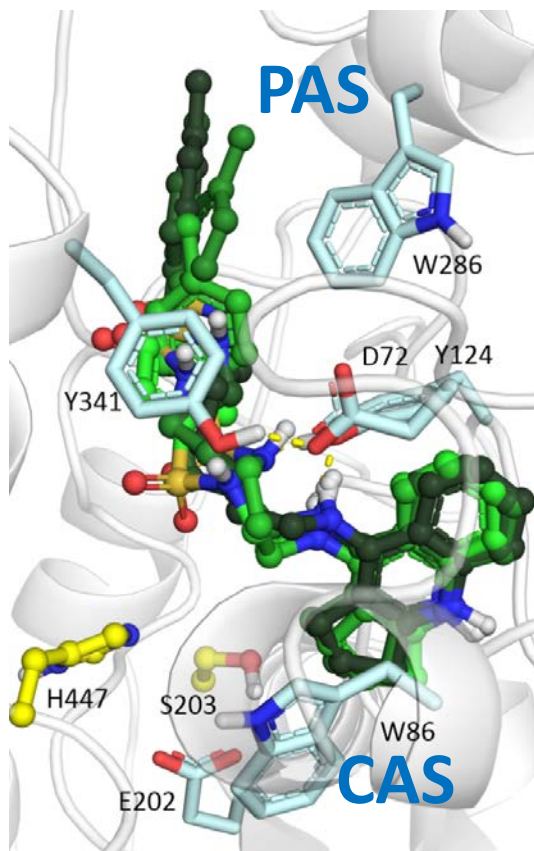
Dual binding-site ингибиторы АХЭ (ингибиторы, связывающиеся с двумя сайтами). Фрагмент такрина связывается в CAS, а фрагмент *p*-толилсульфонамида - с PAS (АХЭ PDB: 4EY7). Смещенное такриновое кольцо С8 приводит к потере водородной связи между протонированной аминогруппой такринового фрагмента и боковой цепью Tyr124

Сульфонамидная группа связывается с активным центром и образует водородные связи с каталитическими остатками и оксианионной полостью. Протонированная аминогруппа такринового фрагмента образует ионные взаимодействия с Asp70 в PAS. Влияние размера алифатического кольца менее выражено,

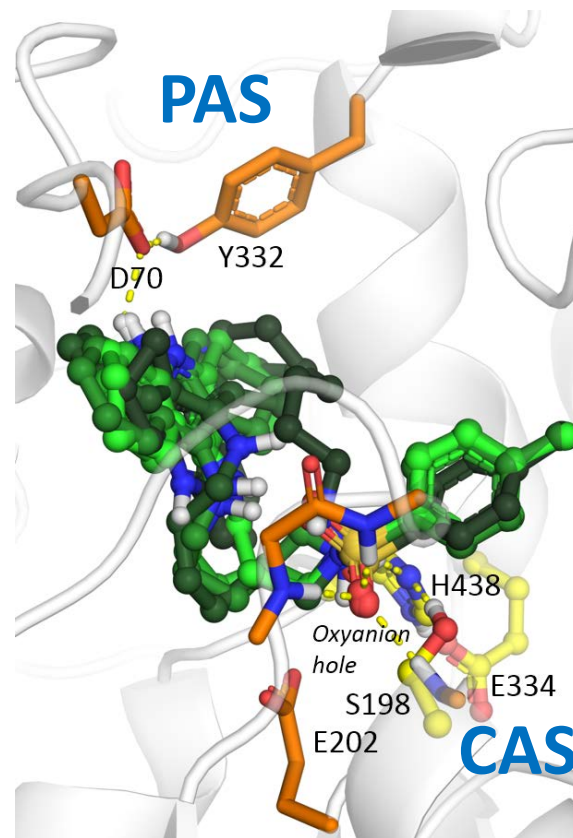
Молекулярный докинг конъюгатов I в АХЭ и БХЭ

Влияние размера спейсера (для алифатического кольца C5)

АХЭ



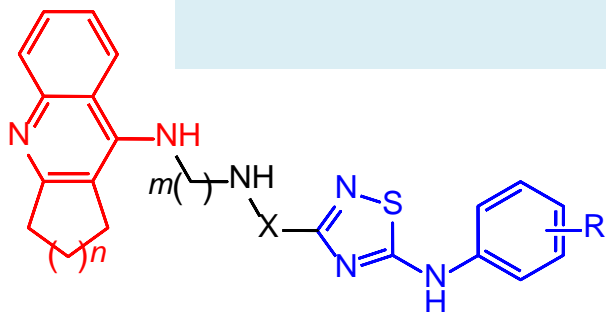
БХЭ



Расположены внутри канала АХЭ в вытянутой конформации. Более благоприятное заполнение PAS АХЭ соединениями с более длинным спейсером приводит к лучшему вытеснению пропидия и повышенной ингибирующей активности из-за гидрофобных взаимодействий

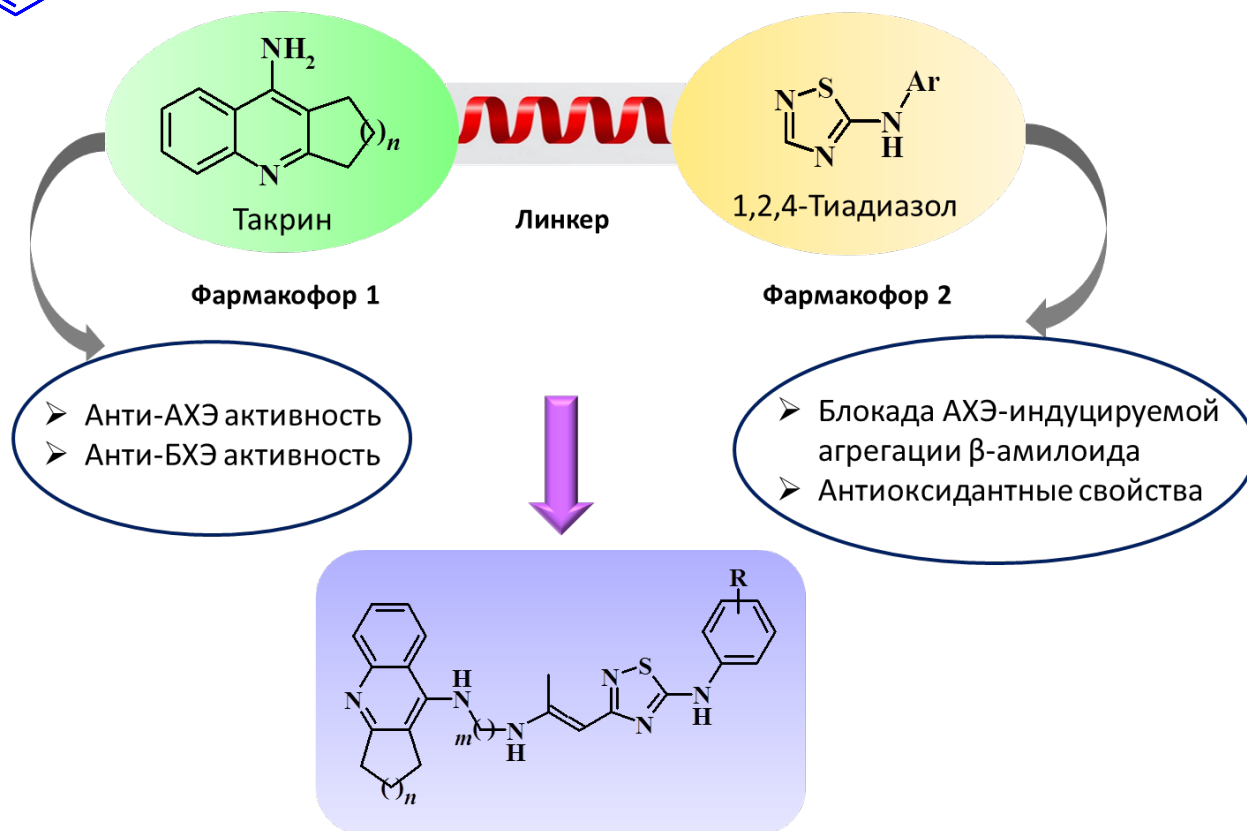
Изогнуты внутри более широкого канала БХЭ. Положение соединений внутри канала БХЭ практически не зависит от длины спейсера, что согласуется со слабым влиянием длины спейсера на ингибиторную активность.

Конъюгаты такрина и его гомологов производными 1,2,4-тиадиазола (II)



$n = 1-4; m = 2-5;$

$X = -(Me)C=CH-$ или $-(Me)CHCH_2-$



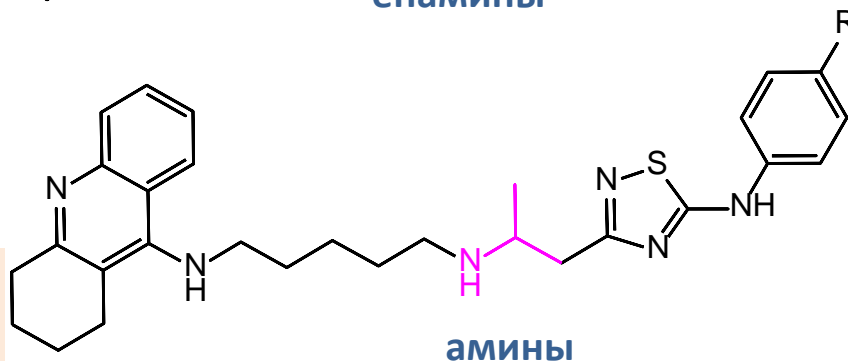
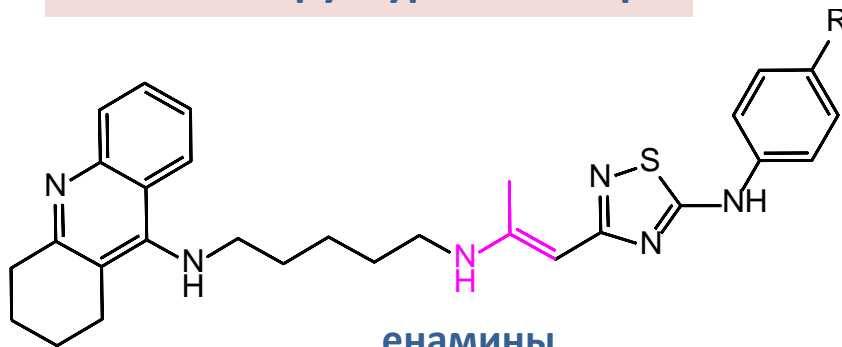
(II) Конъюгаты такрина и его гомологов с производными 1,2,4-тиадиазола

Влияние структуры спейсера

IC_{50} АХЭ = 1 - 4 μ M
 IC_{50} БХЭ = 0.07- 1 μ M

**Ингибиторы
АХЭ, БХЭ,
Слабое ингибирование
КЭ**

IC_{50} АХЭ = 0.4 – 0.6 μ M
 IC_{50} БХЭ = 0.004 – 0.01 μ M



Новые свойства

Антиоксиданты

АБТС-тест: TEAC = 1.2-1.6

Блокаторы АХЭ-
индуцируемой
агрегации β -амилоида
20 % (енамины)
35% (амины)%

Антиоксиданты

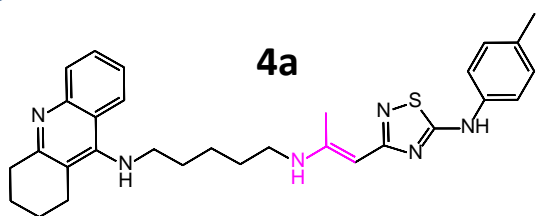
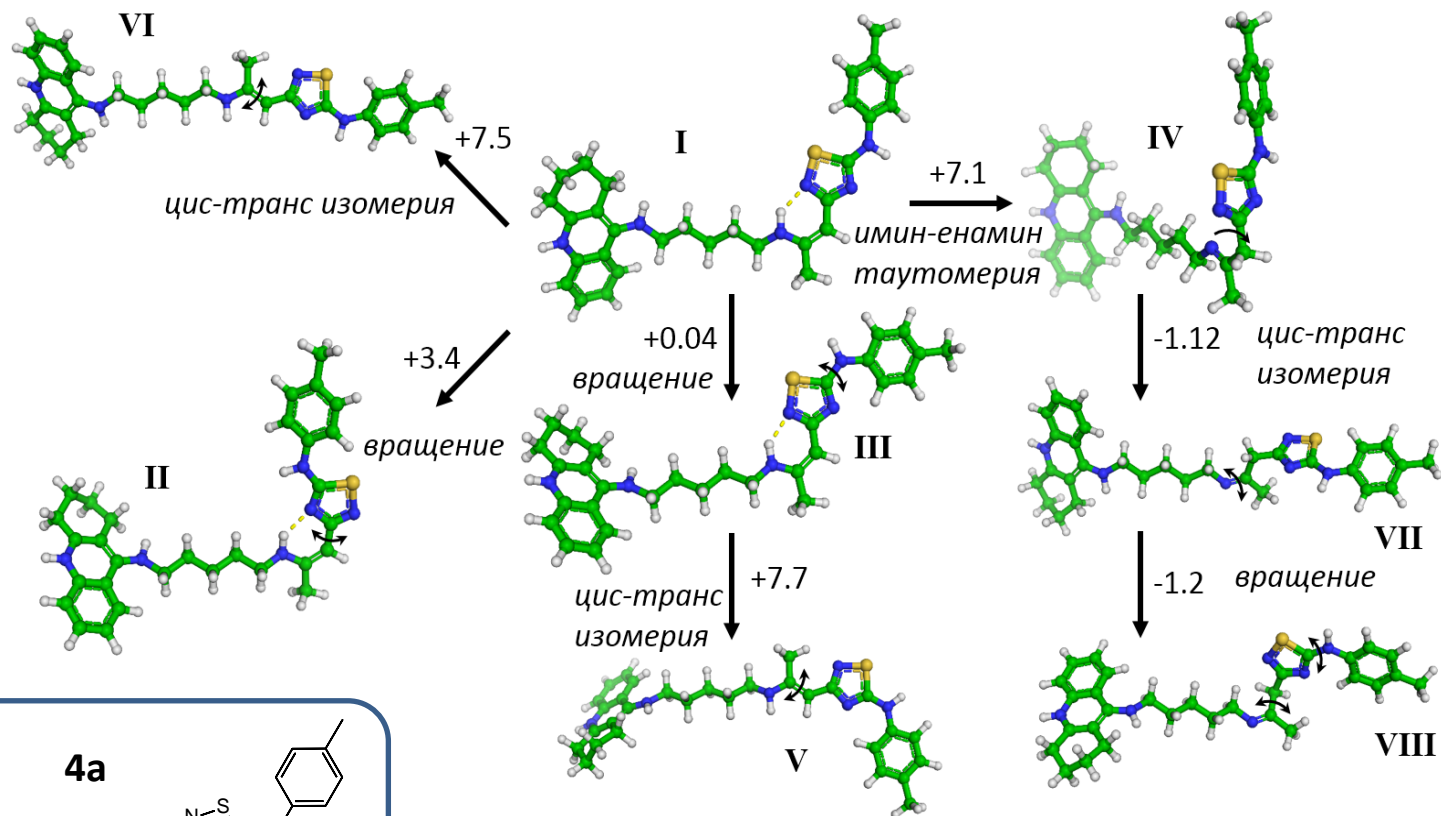
TEAC = 0.3-0.5

Конъюгаты с пропанаминовым спейсером более активны как ингибиторы холинэстераз, особенно БХЭ, сильнее вытесняли пропидий из PAS АХЭ и проявляли минимальную активность в отношении КЭ, т.е. обладали оптимальным эстеразным профилем. В то же время конъюгаты с пропанаминовым спейсером проявляли существенно более высокую антиоксидантную активность в тесте АБТС.

Расчетная оценка ADMET профиля показала, что конъюгаты с пропанаминовым спейсером имеют высокую проницаемость через гематоэнцефалический барьер, тогда как конъюгаты с пропанаминовым спейсером – среднюю. Все конъюгаты такрина с 1,2,4-тиадиазолом характеризуются хорошим всасыванием в кишечнике и имеют средний уровень кардиотоксичности.

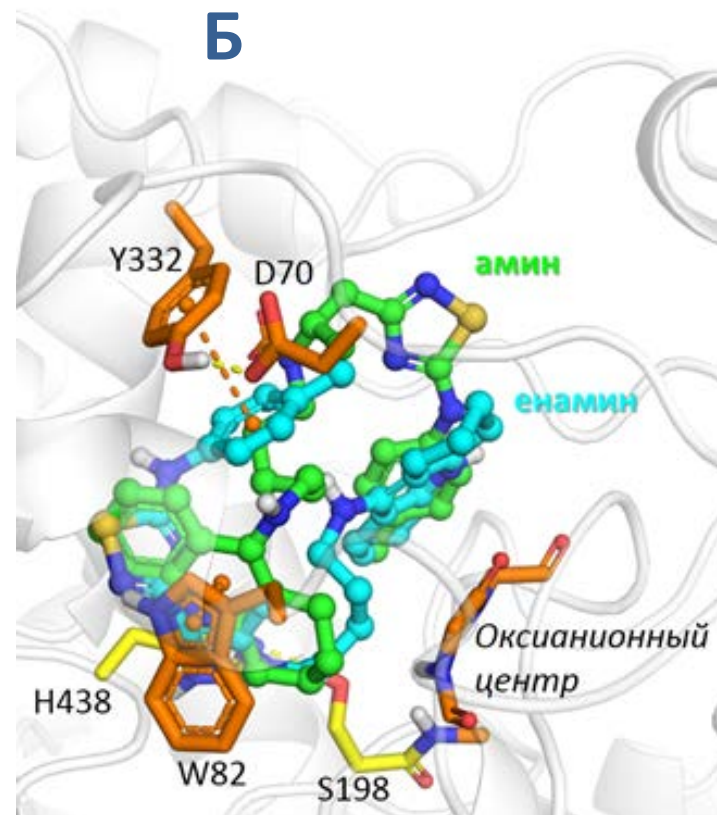
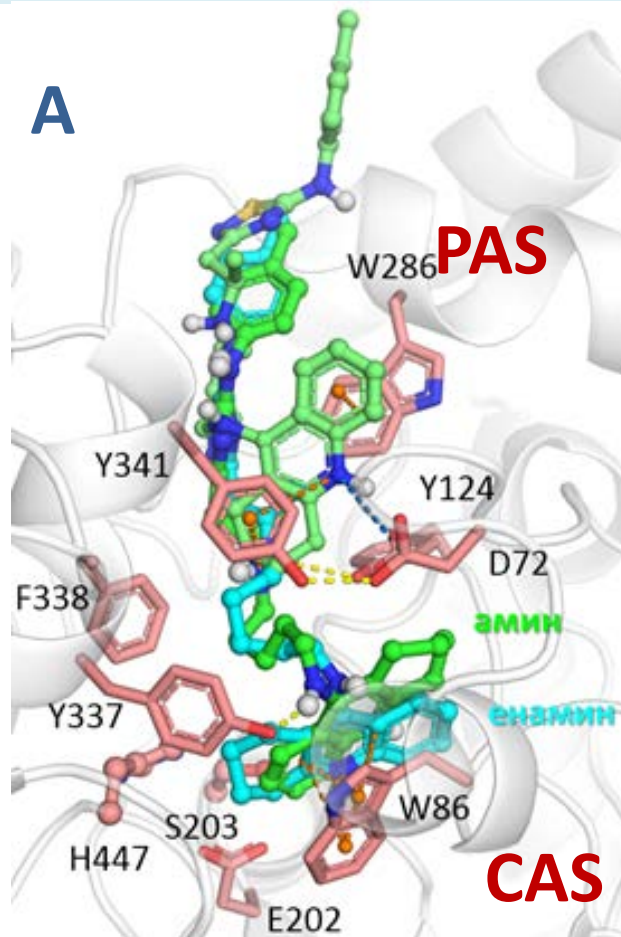
Makhaeva GF, Kovaleva NV, Boltneva NP, Lushchekina SV, Rudakova EV, Stupina TS, Terentiev AA, Serkov IV, Proshin AN, Radchenko EV, Palyulin VA, Bachurin SO, Richardson RJ. *Bioorg Chem.* 2020, 94:103387

Квантово-механические расчеты позволили выбрать наиболее стабильные конформации для конъюгатов с пропенаминовым фрагментом и показали, что доминирующей в растворе должна быть форма конъюгата с протонированным такриновым фрагментом.



Наиболее стабильные формы конъюгата **4a** по результатам КМ расчетов. Энергии указаны в ккал/моль. Протонирован только такриновый фрагмент.

Молекулярный докинг конъюгатов с енаминовым (4а) и аминовым (5а) спейсером в АХЭ (А) и БХЭ (Б).

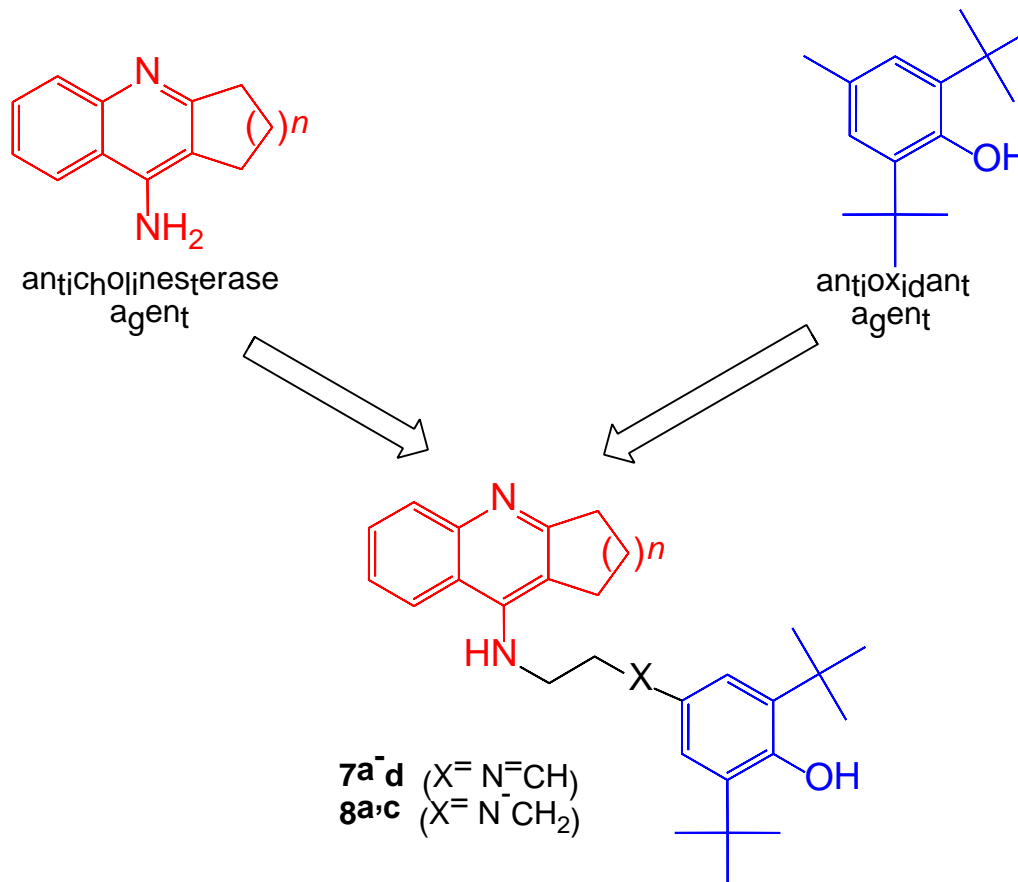


АХЭ - связывание двумя способами:
(1) такриновым фрагментом с CAS, триадиазольным - с PAS, (2) только с PAS, такриновым фрагментом. Из-за узости канала соединения находятся в нем в вытянутой конформации.

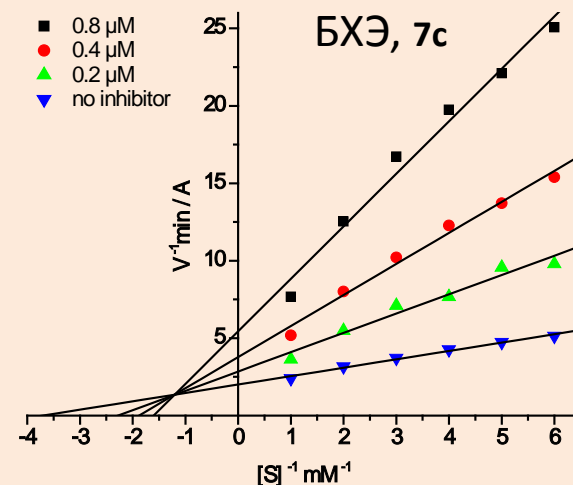
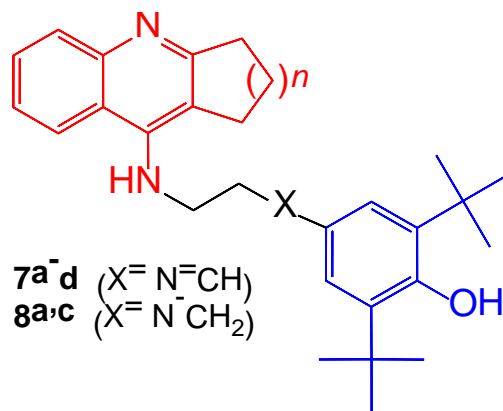
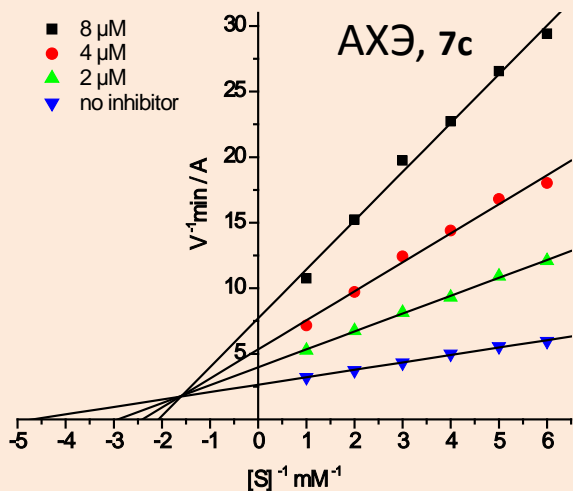
БХЭ - за счет большей ширины канала соединения очень хорошо связываются с CAS и находятся в нем в свернутой конформации, которая более благоприятна для более гибких соединений с аминовым фрагментом в₂₃ спейсере.

Конъюгаты такрина и его гомологов с бутилгидрокситолуолом (ионолом, ВНТ) - III

Синтезированы конъюгаты 4-амино-2,3-полиметиленихинолинов с ВНТ, в которых два фармакофора соединены с помощью иминной или аминной связи



Конъюгаты 4-амино-2,3-полиметиленихинолина и ВНТ как потенциальные мультитаргетные препараты



Высокая анти-АХЭ и анти-БХЭ активность с селективностью в отношении БХЭ:

7c: I_{50} АХЭ = 4 μM, I_{50} БХЭ = 0.4 μM;
 8c: I_{50} АХЭ = 1.9 μM, I_{50} БХЭ = 0.08 μM

Хорошее вытеснение пропидия из PAS АХЭ:

7a – 18%, 8a – 16% (конц. 20 μM, Донепезил - 10%)

Довольно слабое ингибирование КЭ

19-25% при 20μM

Хорошие предсказанные профили ADMET

LogBB 0.19-0.61; HIA 100%; низкая

Высокая антиоксидантная активность

В тесте ABTS:

(7) TEAC = 0.9 – 1.1, (8) 1.4 (ВНТ – 0.98)

В тесте FRAP:

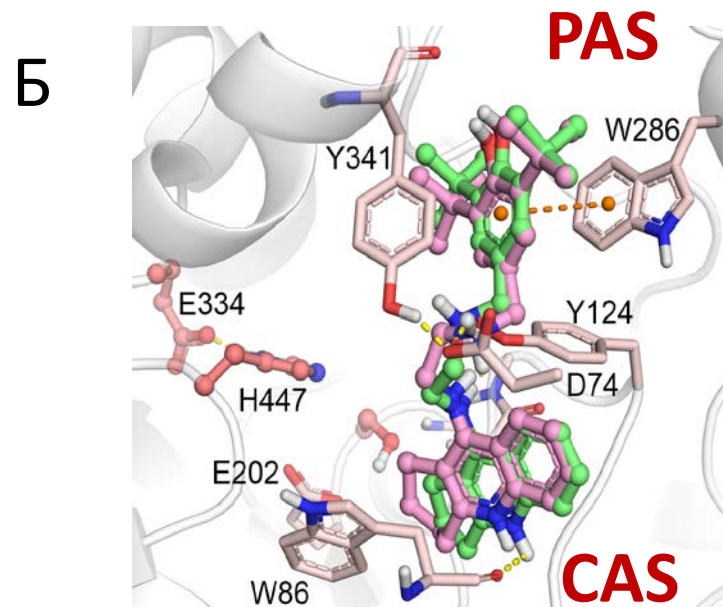
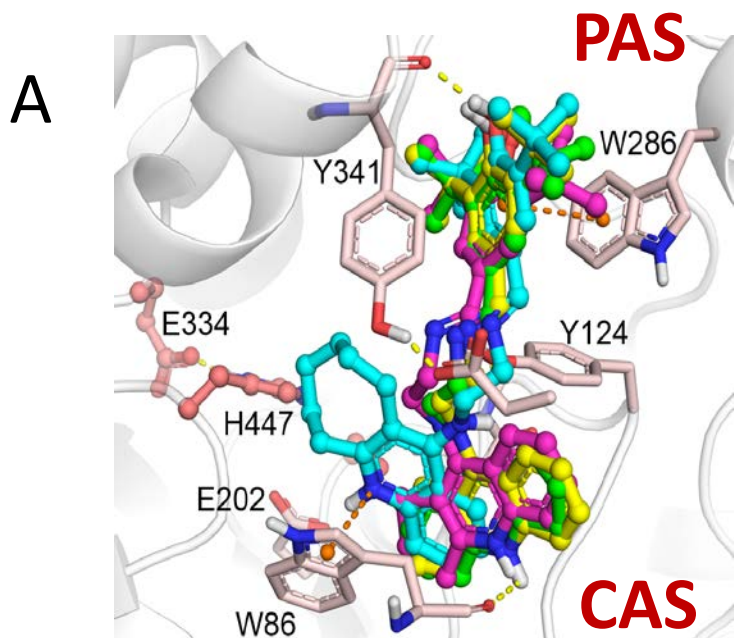
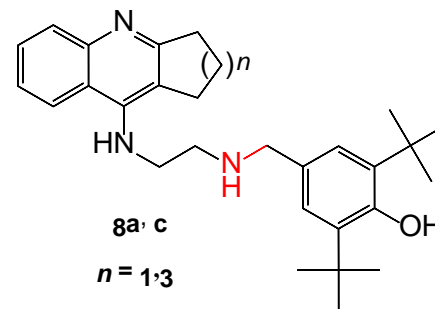
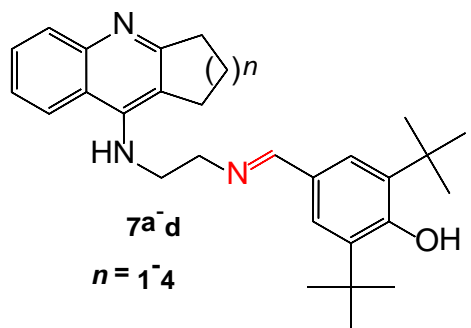
(7) TE = 0.51-0.57, (8) 0.77-0.80 (ВНТ – 1.76)

Хемилюминесцентный анализ:

Ингибирование люминесценции люминола 91-98%

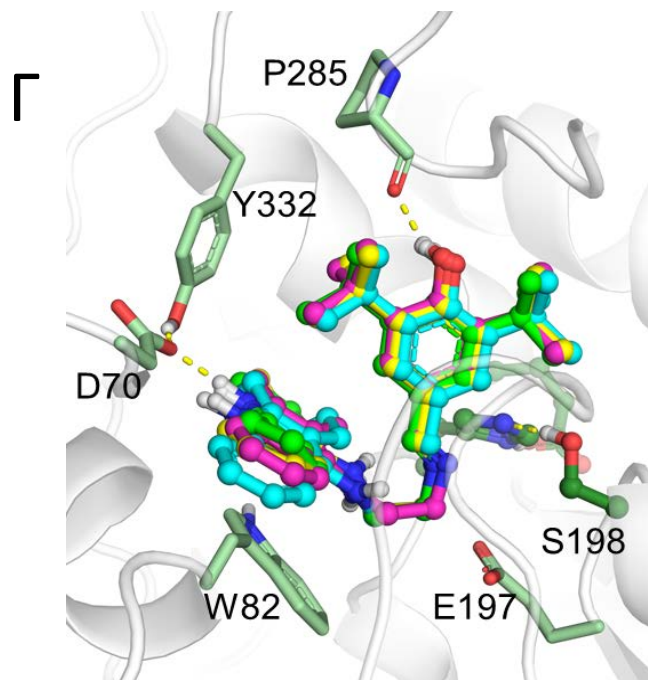
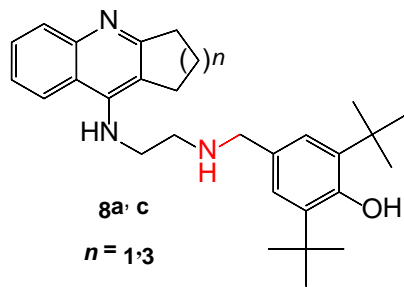
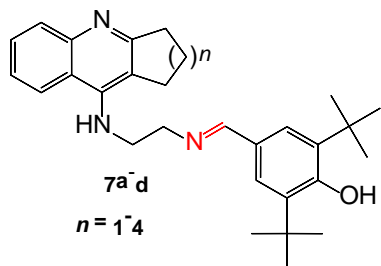
ПОЛ: I_{50} = 7-19 μM (ВНТ - 7 μM)

Молекулярный докинг конъюгатов с иминовым (7a-d) и аминовым (8a,c) спейсером в АХЭ



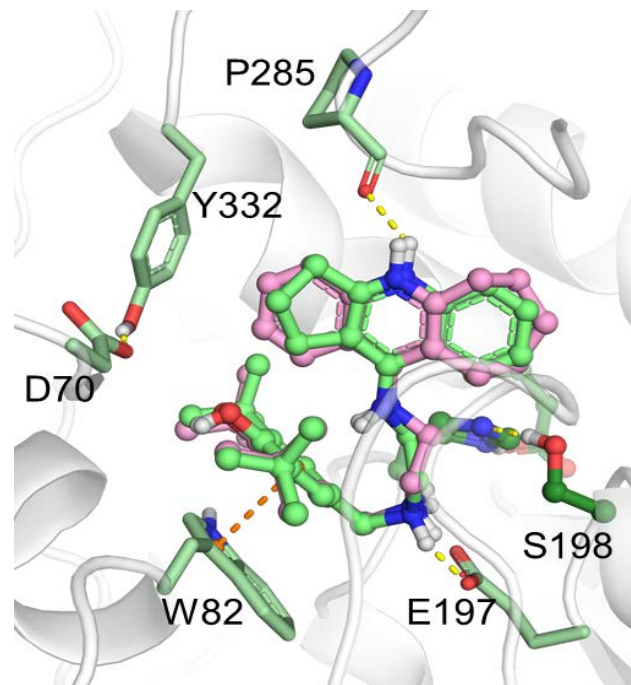
Аминовые аналоги **8** соединений **7** с панели **А** показаны более бледными оттенками аналогичных цветов. Все конъюгаты связываются «такриновым» фрагментом в CAS, а фрагмент ВНТ прочно связывается в PAS.

Молекулярный докинг конъюгатов с иминовым (7a-d) и аминовым (8a,c) спейсером в БХЭ



μM

Д

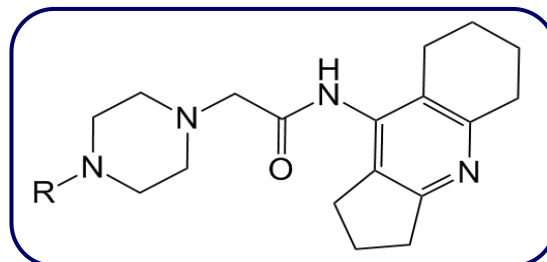
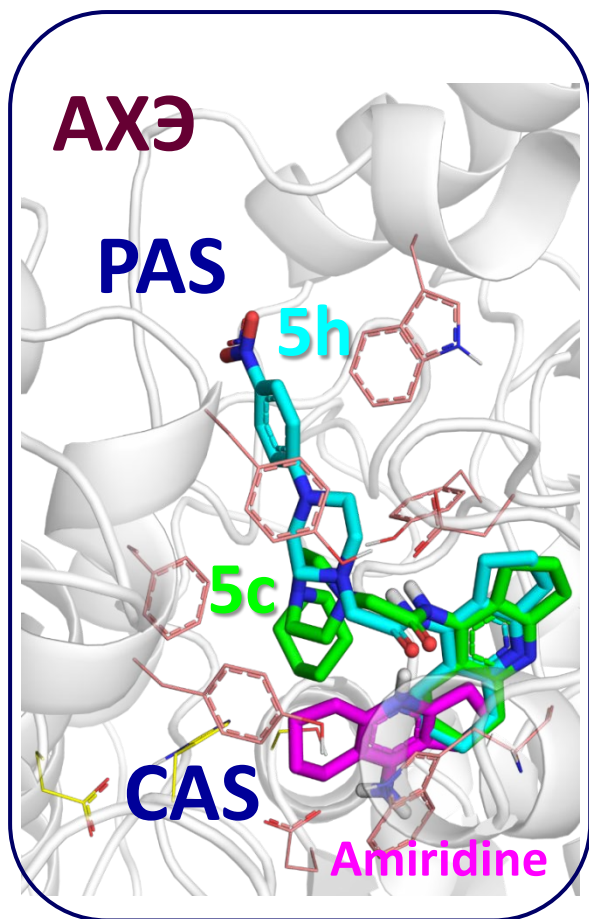


ОН группа фрагмента ВНТ образует водородную связь с кислородом основной цепи Pro285, а заряженный «такриновый» фрагмент участвует в ионных взаимодействиях с боковой цепью Asp70

8a и 8c связываются иначе. Амино-группа спейсера образует ионную пару с боковой цепью Glu197. Фрагмент ВНТ образует π - π -стэкинг взаимодействия с Trp82. «Такриновый» фрагмент образует водородную связь с кислородом основной цепи Pro285.

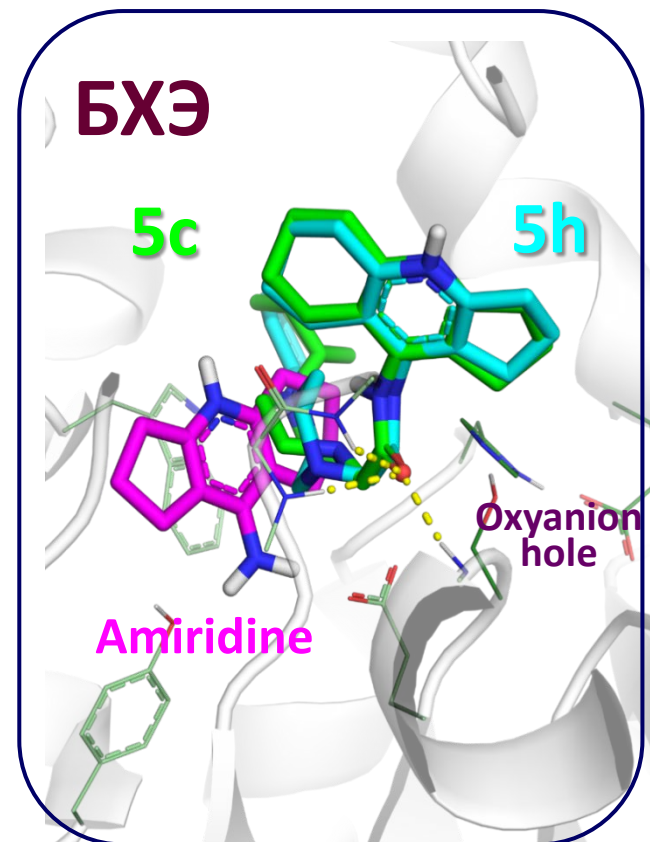
Вместе эти взаимодействия улучшают ингибиторную активность 8a и 8c по сравнению с 7a-7d с енаминовой группой в спейсере

Гибриды амиридина и пиперазина как потенциальные мультитаргетные агенты



Соединения-лидеры

- высокая анти-АХЭ активность;
- умеренная анти-БХЭ активность;
- низкая анти-КЭ активность вытеснение пропидия из АХЭ ПАС;
- неплохая антиоксидантная активность;
- хороший предсказанный профиль ADMET



Заключение

Таким образом, с использованием направленной химической модификации ингибиторов холинэстераз, экспериментальных исследований биологической активности и активного использования компьютерного молекулярного моделирования найдены новые мультитаргетные ингибиторы АХЭ и БХЭ.

Хороший спектр фармакологической активности и хороший предсказанный ADMET профиль новых гибридных структур позволяет рассматривать их как перспективные соединения для дальнейшей оптимизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты 17-03-00984а, 19-53-26016а и 20-03-00590а

Спасибо за внимание!