

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова**

**Химический факультет**

*На правах рукописи*

**Карлов Дмитрий Сергеевич**

Моделирование структуры ионотропных  
глутаматных рецепторов и дизайн их лигандов

02.00.16 — Медицинская химия

02.00.03 — Органическая химия

Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник

Палюлин В. А.

Москва

2016

## Оглавление

Введение .....	5
Глава 1. Литературный обзор .....	7
1.1. Роль глутаматных рецепторов в организме человека .....	7
1.2. Структура NMDA-рецептора .....	8
1.3. Строение глутаматергического синапса .....	11
1.4. Роль AMPA- и КА-рецепторов в синаптической передаче .....	13
1.5. Роль NMDA-рецептора в синаптической передаче .....	14
1.6. Роль гомологов глутаматных рецепторов в других организмах .....	15
1.7. Терапевтический потенциал лигандов глутаматных рецепторов .....	15
1.7.1. Инсульт и травма мозга .....	17
1.7.2. Большое депрессивное расстройство .....	18
1.7.3. Ноотропный эффект лигандов глутаматных рецепторов .....	19
1.7.4. Шизофрения .....	19
1.8 Лиганды ионотропных глутаматных рецепторов .....	20
1.8.1. Агонисты глутаматного сайта .....	20
1.8.2. Конкурентные антагонисты .....	23
1.8.3. Неконкурентные антагонисты .....	25
1.8.4. Блокаторы канала .....	27
1.9. Аллостерическая регуляция NMDA-рецептора .....	27
1.10. Применение молекулярного моделирования для исследования структуры и функций NMDA-рецептора .....	30
1.10.1. Модели QSAR .....	30
1.10.2. Виртуальный скрининг .....	33
1.10.3. Метод молекулярной динамики.....	34
Глава 2. Поиск отрицательных модуляторов NMDA-рецептора, действующих на аминоконцевой домен .....	35
2.1. Особенности моделирования структуры белка по гомологии .....	35
2.2. Анализ способа связывания ифенпродила .....	36
2.3. Моделирование молекулярной динамики комплексов ифенпродила с аминоконцевыми доменами GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D .....	40

2.4. Докинг отрицательных аллостерических модуляторов, связывающихся в аминоконцевом домене .....	54
2.5. Особенности гидратации сайта связывания ифенпродила.....	57
2.6. Построение моделей CoMFA для лигандов аминоконцевых доменов .....	60
2.7. Виртуальный скрининг баз данных органических соединений .....	65
2.8. Построение фармакофорной гипотезы .....	67
2.9. Валидация процедуры виртуального скрининга .....	69
2.10. Подготовка выборок истинно активных и условно неактивных соединений	70
2.11. Выбор порогового значения оценочной функции .....	75
2.12. Описание библиотек, использованных для виртуального скрининга .....	76
2.13. Анализ результатов виртуального скрининга методом докинга .....	76
2.14. Анализ результатов виртуального скрининга методом фармакофорного поиска .....	79
2.15. Биологические исследования .....	79
Глава 3. Протокол слепого докинга для идентификации сайтов связывания лигандов NMDA-рецептора .....	83
3.1. Описание протокола слепого докинга .....	83
3.2. Валидация протокола слепого докинга .....	84
3.3. Поиск сайта связывания димебона .....	90
3.4. Докинг модуляторов, селективно ингибирующих NMDA-рецепторы, содержащие субъединицы GluN2C, GluN2D .....	92
3.5. Построение модели MFTA для анализа выборки отрицательных модуляторов NMDA-рецептора.....	100
Глава 4. Фармакофорная гипотеза для положительных аллостерических модуляторов AMPA-рецепторов .....	102
4.1. Отбор структур для построения фармакофора .....	102
4.2. Анализ выборки лигандов методом CoMFA .....	102
4.3. Валидация фармакофора .....	108
Глава 5. Моделирование молекулярной динамики для комплексов ПАМ и лиганд-связывающих доменов GluA2 рецепторов .....	110
5.1. Расчет энтальпий и свободных энергий связывания.....	110
5.2. Особенности механизма открытия лиганд-связывающего домена .....	117

Выводы .....	122
Список литературы .....	123
Приложение 1А. Выравнивание аминокислотных последовательностей GluN1/GluN2B (Код PDB – 4PE5, <i>Rattus norvegicus</i> ), калиевого канала Kirbac1.1 (Код PDB - 2WLL, <i>Burkholderia pseudomallei</i> ) и GluN1/GluN2B ( <i>Homo sapience</i> ).....	145
Приложение 1Б. Выравнивание аминокислотных последовательностей GluN1/GluN2B (Код PDB – 4PE5, <i>Rattus norvegicus</i> ), калиевого канала Kirbac1.1 (Код PDB - 2WLL, <i>Burkholderia pseudomallei</i> ) и GluN1/GluN2D ( <i>Homo sapience</i> ).....	149

## **Введение**

Дизайн новых лекарственных средств — основная задача современной медицинской химии. Вычислительные методы прочно вошли в арсенал исследователей, их использование позволяет существенно сэкономить время и материальные ресурсы на всех стадиях разработки лекарственных препаратов: как на стадии поиска ведущего соединения, так и при оптимизации его фармакокинетических параметров.

Глутаматергическая система имеет огромное значение для человеческого организма: доказано ее участие в процессах обучения и формирования памяти. Генетические или приобретенные нарушения в регуляции этой системы могут стать причиной психических и нейродегенеративных заболеваний, раннего развития деменции. В то же время разумное регулирование данной системы может повысить работоспособность, активизировать восстановительные процессы в поврежденном мозге. К настоящему моменту накоплено значительное количество данных о фармакологии и механизме действия глутаматных рецепторов. В то же время нельзя считать эту тему полностью изученной: например, недавно было показано, что широко известный любителям туризма ДЭТА (диэтилтолуамид), используемый для борьбы с кровососущими насекомыми, действует на белок, гомологичный человеческим ионотропным глутаматным рецепторам.

Прочно вошел в клиническую практику блокатор глутаматных рецепторов мемантин, используемый для облегчения состояния при болезни Альцгеймера, известный анестетик кетамин, блокирующий ионные токи через глутаматные рецепторы, используется для наркоза в ветеринарии. В то же время широкий круг задач, касающихся некоторых аспектов механизма активации и деактивации этих рецепторов, создания их селективных модуляторов, еще ожидает решения.

Цель данной работы — основанный на применении методов моделирования по гомологии, молекулярной динамики, результатах докинга и количественных соотношениях «структура-активность» компьютерный дизайн новых модуляторов глутаматных рецепторов. В диссертационной работе были выдвинуты гипотезы о механизме действия отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-

рецептора и сформулированы качественные критерии для повышения активности таких соединений. Использование этой информации позволило разработать протокол виртуального скрининга, при помощи которого были идентифицированы новые активные соединения, связывающиеся в аминоконцевом домене, основанные на неизвестных ранее структурных скаффолдах. Для положительных модуляторов AMPA-рецептора разработана схема предсказания величин активности  $pEC_{50}$ , основанная на методах 3D-QSAR и молекулярной динамики. Также для активных молекул с неизвестными сайтами связывания разработан протокол поиска его наиболее вероятного места расположения, которая был успешно опробован на лигандах NMDA-рецептора с известными сайтами связывания.

## **Глава 1. Литературный обзор**

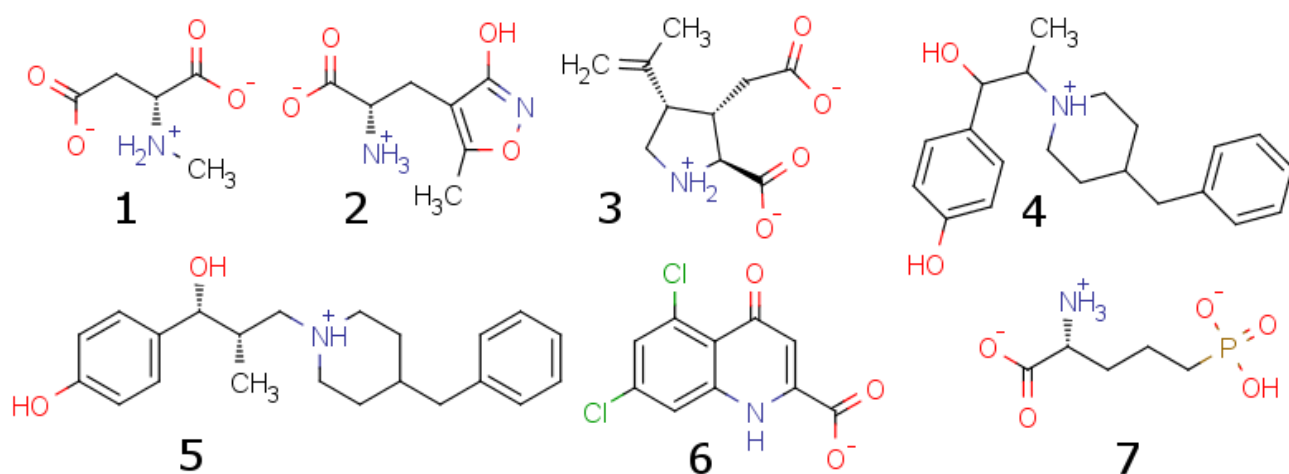
### **1.1. Роль глутаматных рецепторов в организме человека**

Изучение структуры и свойств глутаматных рецепторов привлекает внимание исследователей на протяжении уже более тридцати лет. С одной стороны, глутаматные рецепторы участвуют в поддержании системы передачи сигналов, контролирующей такие макроскопические способности живого существа, как запоминание, поддержание настроения, ответ на раздражители. С другой стороны, при повышенной активации глутаматных рецепторов наблюдается явление эксайтотоксичности — гибели нервных клеток в результате окислительного стресса.

При анализе концентраций различных эндогенных низкомолекулярных соединений в 30-е годы XX века было обнаружено повышенное содержание глутамата в тканях мозга, что дало толчок для проведения множества исследований влияния глутаминовой кислоты и глутамина на когнитивные расстройства и эпилепсию. Подтверждение факту особой непротеиногенной роли глутамата в системах передачи нервных импульсов было положено следующим экспериментом — инъекция раствора глутаминовой кислоты в мозг или сонную артерию приводила к судорогам у подопытных животных [1]. Физиологическое действие глутамата на клеточном уровне проявляется в последовательных стадиях возбуждения, а затем торможения. При дальнейшем анализе действия глутамата и его аналогов гипотеза о существовании специфических рецепторов, связывающих глутамат, подвергалась сомнению: во-первых, стереоизомеры и глутаминовой, и аспарагиновой кислоты вызывают аналогичный ответ, незначительно зависящий от стереохимии лиганда, во-вторых, среднее содержание глутамата в нервной ткани существенно выше, чем известных на тот момент нейромедиаторов норадреналина и ацетилхолина. При изучении активности аналогов глутамата оказалось, что N-метил-D-аспартат оказывает существенно более сильное воздействие, чем L-изомер, что стало первым косвенным подтверждением существования специфических глутаматных рецепторов. Первым прямым

доказательством существования различных типов глутаматных рецепторов стало исследование эффекта от глутамата и гомоцистеата на различных участках таламуса [2].

В настоящее время глутаматные рецепторы подразделяют на две структурно и фармакологически различающиеся группы: ионотропные и метаботропные. Метаботропные рецепторы относятся к классу рецепторов, сопряженных с G-белками, ионотропные — к классу тетрамерных лиганд-зависимых катионных каналов. Ионотропные глутаматные рецепторы принято подразделять на три основных типа в зависимости от лиганда, селективно активирующего данный тип рецепторов: N-метил-D-аспартата (1) (NMDA-рецептор),  $\alpha$ -аминометилизоксазолилпропионовой кислоты (2) (AMPA-рецептор) и каиновой кислоты (3) (KA-рецептор).



## 1.2. Структура NMDA-рецептора

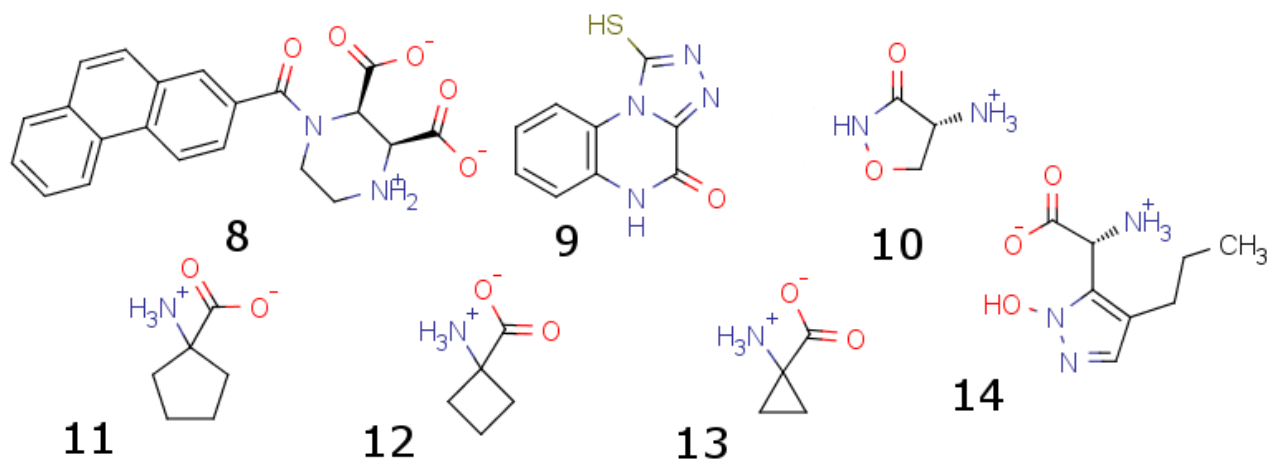
Ионотропные глутаматные рецепторы состоят из 4 субъединиц, формирующих мембранную пору. Наличие существенного сходства аминокислотных последовательностей NMDA, AMPA и каиновых рецепторов позволяет предполагать значительное структурное сходство между этими рецепторами. Данное предсказание частично подтверждается для полных структур AMPA- и NMDA-рецепторов [8,16]. Все глутаматные рецепторы обладают модульной архитектурой (рис. 1), при этом каждая из субъединиц построена из 4 основных частей: аминоконцевого домена (ATD), находящегося во



Таблица 1. Известные кристаллические структуры доменов NMDA-рецептора.

Код PDB	Лиганд	Разрешение	Краткое описание	Литература
3QEK	-	2.0	Аминоконцевой домен GluN1	[3]
3QEL	Ифенпродил (4)	2.6	Комплекс аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B	
3QEM	Ro25-6981 (5)	3.0	Комплекс аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B	
4KCC	-	1.89	Доли D1 и D2 лиганд-связывающего домена GluN1	[4]
4KCD	-	1.68	Доли D1 и D2 лиганд-связывающего домена GluN3A	
3JPW	-	2.8	Аминоконцевой домен GluN2B	[5]
3JPY	Zn <sup>2+</sup>	3.2	Аминоконцевой домен GluN2B	
4NF4	L-Glu, DCKA (6)	2.0	Тетрам. комплекс лиг.-связ. домена GluN1/GluN2A	[6]
4NF5	D-AP5 (7), Gly	1.9	Тетрам. комплекс лиг.-связ. домена GluN1/GluN2A	
4NF6	Gly, PPDA (8)	2.1	Тетрам. комплекс лиг.-связ. домена GluN1/GluN2A	
4NF8	L-Glu, Gly	1.86	Тетрам. комплекс лиг.-связ. домена GluN1/GluN2A	
4KFQ	TK40 (9)	2.20	Лиганд-связывающий домен GluN1	[7]
4TLL	Ro25-6981 (5)	3.59	Тетрамерная структура NMDA-рецептора GluN1/GluN2B (аминоконцевой, лиганд-связывающий, трансмембранный)	[8]
4TLM		3.77		
2A5T	L-Glu, Gly	2.0	Гетеродимер лиганд-связывающих доменов GluN1/GluN2A	[9]
2A5S	L-Glu	1.6	Лиганд-связывающий домен GluN2A	
1PB7	Gly	1.35	Лиганд-связывающий домен GluN1	[10]
1PB8	D-Ser	1.45	Лиганд-связывающий домен GluN1	
1PB9	D-циклосерин (10)	1.7	Лиганд-связывающий домен GluN1	
1PBQ	DCKA (6)	1.9	Лиганд-связывающий домен GluN1	
3OЕК	L-Asp	1.9	Лиганд-связывающий домен GluN2D	[11]
3OEL	D-Glu	1.9	Лиганд-связывающий домен GluN2D	
3OEM	NMDA (1)	1.9	Лиганд-связывающий домен GluN2D	
3OEN	L-Glu	1.8	Лиганд-связывающий домен GluN2D	
3Q41	-	3.4	Аминоконцевой домен GluN1	[12]
1Y1M	(11)	1.8	Лиганд-связывающий домен GluN1	[13]
1Y1Z	(12)	1.5	Лиганд-связывающий домен GluN1	
1Y20	(13)	1.4	Лиганд-связывающий домен GluN1	
4JWX	NHP5G (14)	1.5	Лиганд-связывающий домен GluN2A	[14]

4JWY		2.0	Лиганд-связывающий домен GluN2D	
2RCA	Gly	1.58	Лиганд-связывающий домен GluN3B	[15]
2RCB	D-Ser	1.62		
2RC7	Gly	1.58	Лиганд-связывающий домен GluN3A	
2RC8	D-Ser	1.45		
2RC9	(13)	1.96		



внеклеточном пространстве, лиганд-связывающего домена (LBD), находящегося также во внеклеточном пространстве, трансмембранного домена (TD), расположенного внутри мембраны, и С-концевого домена (CTD), находящегося во внутриклеточном пространстве. Интересно, что и аминоконцевой, и лиганд-связывающий домены проявляют некоторую степень гомологии по отношению к бактериальным периплазматическим белкам, связывающим аминокислоты [17]. В табл. 1 представлены известные из литературы экспериментальные (полученные методом рентгеноструктурного анализа) структуры доменов и их комплексов для некоторых подтипов NMDA-рецептора. Следует отметить, что наиболее изученными являются лиганд-связывающие домены, для которых разработана как методика получения белка, так и способ выращивания высококачественных кристаллов, для аминоконцевых и трансмембранных доменов таких данных существенно меньше.

Первые данные о структурной организации и симметрии глутаматных рецепторов основывались на результатах криоэлектронной микроскопии [18,19]. В

этих работах показано, что тетрамер, образующий функциональный рецептор, обладает лишь осью симметрии  $C_2$ , в отличие от известных структур калиевых каналов и рецепторов, содержащих высококонсервативную цистеин-содержащую

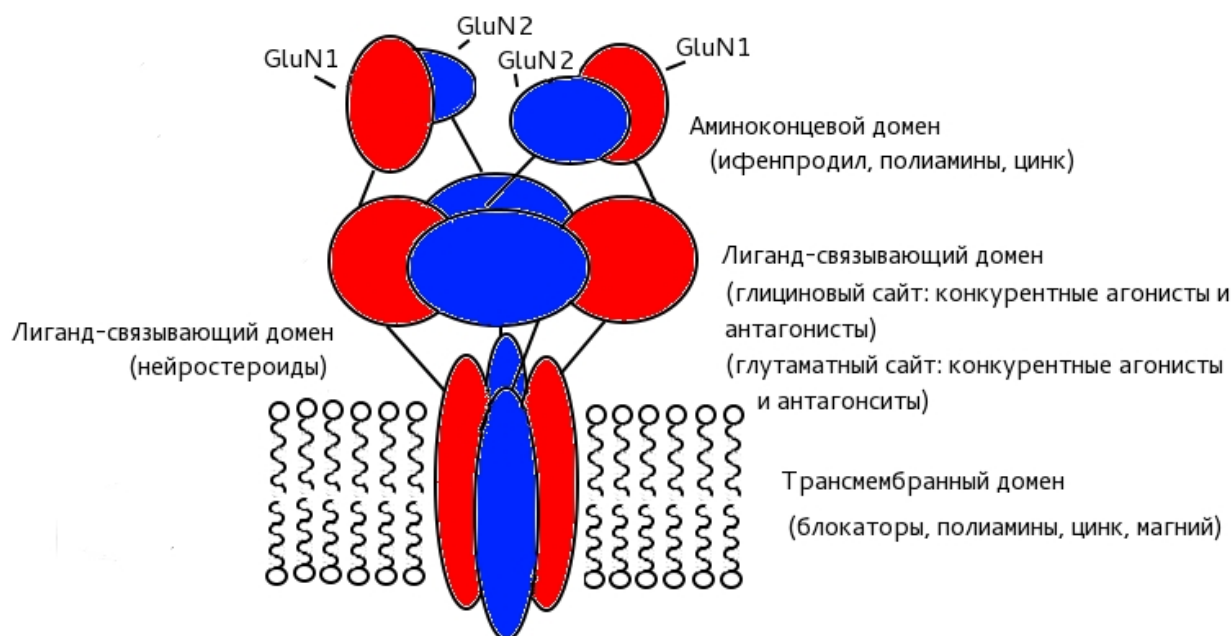


Рисунок 4. Схематичное описание структуры NMDA-рецептора с примерным расположением сайтов связывания лигандов.

петлю («Cys-loop» рецепторы), в которых присутствует ось вращения порядка, равного числу субъединиц. К настоящему моменту известны 2 полные структуры NMDA-рецептора, полученные методом рентгеновской кристаллографии (см. табл. 1). Из рассмотрения этих структур можно сделать вывод о наличии оси симметрии второго порядка. При этом аминоконцевые и лиганд-связывающие домены организуются как димеры димеров, а трансмембранный домен обладает псевдоосью четвертого порядка. Интересно, что низкая симметрия ионного канала хорошо согласуется с тем фактом, что в образовании нативной структуры рецептора принимают участие 2 пары одинаковых субъединиц, впоследствии разные субъединицы занимают симметрически неэквивалентные положения. NMDA-рецепторы, способные выполнять функции ионного канала, состоят из двух субъединиц GluN1 и двух субъединиц GluN2, либо двух субъединиц GluN1 и двух субъединиц GluN3 [20,21].

### 1.3. Строение глутаматергического синапса

Схематично строение глутаматергического синапса представлено на рис. 2. Синапс состоит из пресинаптической и постсинаптической части, а также глиальных клеток, прикрывающих синаптическую щель. Передача сигнала осуществляется после слияния везикул, содержащих нейромедиатор глутамат и/или глицин, с мембраной клетки и выделения их содержимого в синаптическую щель. Нейромедиаторы открывают ионные каналы (NMDA, AMPA, KA) и активируют рецепторы, сопряженные с G-белками (mGluR<sub>1-8</sub>). При этом по градиенту электрохимического потенциала из внеклеточного пространства

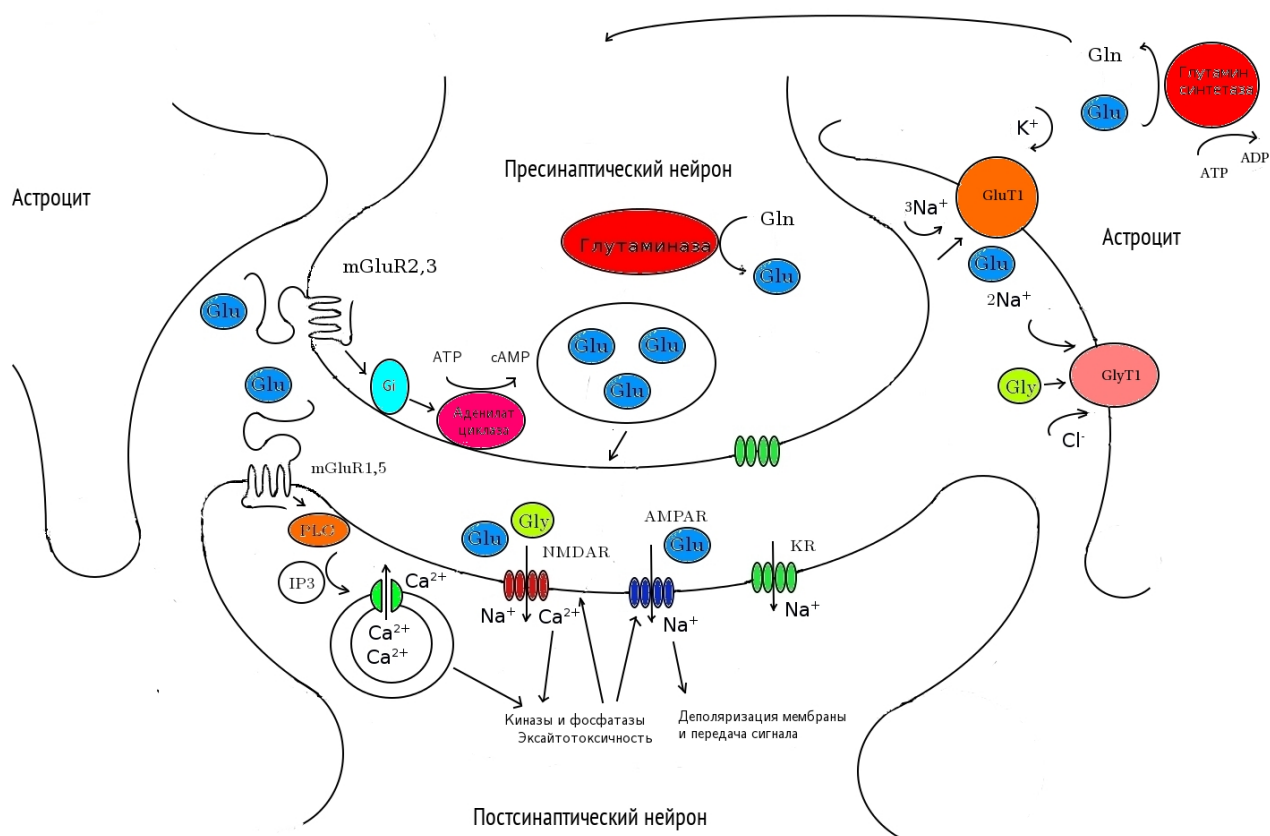


Рисунок 2. Схематическое строение глутаматергического синапса.

проходят ионы натрия (AMPA, NMDA, KA), кальция (NMDA, KA), вызывая деполяризацию мембраны и дальнейшую передачу сигнала через постсинаптический нейрон. Выведение глутаминовой кислоты и глицина из синаптической щели осуществляется в основном за счет активного транспорта в

окружающих глиальных клетках [22]. Поглощенная астроцитом глутаминовая кислота под действием глутаминсинтетазы превращается в глутамин, который затем транспортируется в нейрон и подвергается гидролизу с образованием глутамата [23].

Метаботропные глутаматные рецепторы, относящиеся к классу рецепторов, сопряженных с G-белками, хотя и не способны напрямую осуществлять пропускание ионных токов через мембрану, но участвуют в модуляции концентрации кальция в постсинаптическом нейроне. При активации метаботропные глутаматные рецепторы 1 группы (mGluR<sub>1,5</sub>) посредством вторичного мессенджера инозитолтрифосфата (IP3) открывают внутриклеточные депо, содержащие кальций, усиливая сигнал от внеклеточного кальция. Активация метаботропных глутаматных рецепторов второй и третьей группы вызывает ингибирование аденилатциклазы, что вызывает снижение ионных токов через NMDA-рецептор.

#### **1.4. Роль AMPA- и KA-рецепторов в синаптической передаче**

AMPA-рецепторы могут существовать как в гомотетрамерном, так и в гетеротетрамерном виде, при этом состав тетрамера зависит от этапа развития организма, типа клетки, экспрессирующей данный рецептор, а также от места нахождения данной клетки в теле человека. Локализованы AMPA-рецепторы преимущественно постсинаптически [24]. Во взрослом состоянии преимущественно обнаруживают рецепторы состава GluA1 и GluA2, и существенно меньше GluA2/3 [25], в постнатальном периоде и первые месяцы жизни организма повышена экспрессия формы GluA4, присутствие которой делает возможным проникновение кальция через пору канала [26]. Во взрослом состоянии GluA4 находят в основном в гранулярных клетках мозжечка и клетках глии. Присутствие субъединицы GluA2 в тетрамере существенно понижает проницаемость канала для ионов Ca<sup>2+</sup>, отсутствие данной субъединицы в рецепторе повышает эффективность блокирования канала полиаминами [27]. Профили экспрессии различных субъединиц весьма сложны — один нейрон

может экспрессировать одновременно несколько субъединиц и направлять синтезированный белок к разным синаптическим контактам [28].

Высокоаффинные сайты связывания каиновой кислоты обнаружены во всех отделах ЦНС [29]. Субъединицы GluK<sub>1-3</sub> могут существовать в виде гомотетрамеров, остальные известные субъединицы (GluK<sub>4-7</sub>), по-видимому, выступают как модификаторы кинетических и фармакологических свойств перечисленных выше подтипов [27]. В отличие от других типов глутаматных ионных каналов (AMPA и NMDA), каинатные рецепторы обнаруживаются как пресинаптически, так и постсинаптически [30]. Каинатные рецепторы после активации остаются открытыми существенно более длительное время по сравнению с AMPA-рецепторами ( $> 100$  мс). В дополнение к ионному току, каинатные рецепторы запускают G-белок-модулируемый каскад процессов, в частности, активация GluK2 активирует протеинкиназу C [31].

### **1.5. Роль NMDA-рецептора в синаптической передаче**

Практически во всех синапсах NMDA и AMPA рецепторы расположены близко и одновременно активируются при пресинаптическом высвобождении глутаминовой кислоты [32]. Соотношение числа этих рецепторов в синапсе может варьироваться в широких пределах. NMDA-рецепторы существуют лишь в виде гетеротетрамеров, состоящих обязательно из двух GluN1 субъединиц и двух GluN2 или GluN3 субъединиц, при этом в одном рецепторе могут находиться одновременно различные подтипы GluN2 или GluN3. Аналогично AMPA-рецепторам для NMDA-рецепторов характерно изменение уровней экспрессии различных подтипов по мере развития организма. Интересно, что в постнатальный период происходит замена подтипа GluN1/GluN2B, который изначально преобладает, на GluN1/GluN2A в коре больших полушарий, гиппокампе и мозжечке [33]. В начале постнатального периода развития организма шире всего распространен NMDA-рецептор, содержащий GluN2D субъединицы, в промежуточном мозге, стволе мозга и мозжечке. GluN3A и GluN3B наиболее распространены в постнатальном периоде и взрослом

состоянии. При этом экспрессия рецепторов, содержащих GluN3A, является важной ступенью в образовании синапсов, последующий эндоцитоз приводит к созреванию синапсов [34,35]. В синапсах с высоким содержанием GluA2, как правило, наблюдается высокий уровень экспрессии GluN2A-содержащего NMDA-рецептора [36]. Следует отметить, что NMDA-рецепторы обнаруживаются также вне синапсов и, как правило, содержат GluN2B-субъединицы, которые участвуют в процессах долговременной потенциации [37]. Эти рецепторы, по-видимому, активируются глутаматом, секретлируемым астроцитами [38].

### **1.6. Роль гомологов глутаматных рецепторов в других организмах**

Наиболее изученным с этой точки зрения организмом является растение *Arabidopsis thaliana*, который широко используется как модельный организм. Методами биоинформатики показано, что его геном содержит 20 генов, способных кодировать гомологи глутаматных рецепторов [39]. Важным отличием данных рецепторов у растений является пониженная селективность по отношению к различным типам аминокислот [40]. По-видимому, глутаматные рецепторы в растениях играют роль в модуляции иммунного ответа при инфицировании патогенами [41,42].

В случае насекомых особенно хорошо изучена *Drosophila melanogaster*, для которой имеются данные о существовании отдельной группы ионотропных обонятельных рецепторов, которые родственны ионотропным глутаматным рецепторам и не участвуют в синаптической передаче [43]. При этом степень гомологии с глутаматными рецепторами человека невелика (< 34%) [44].

### **1.7. Терапевтический потенциал лигандов глутаматных рецепторов**

К настоящему моменту накоплено огромное количество данных об эффективности в клинике и исследованиях на животных некоторых лигандов глутаматных рецепторов. Значительная часть исследованных лигандов не оправдала ожиданий исследователей, но помогла найти альтернативные пути к достижению цели. В табл. 2 представлены данные о клинических исследованиях, проведенных с лигандами глутаматных рецепторов.

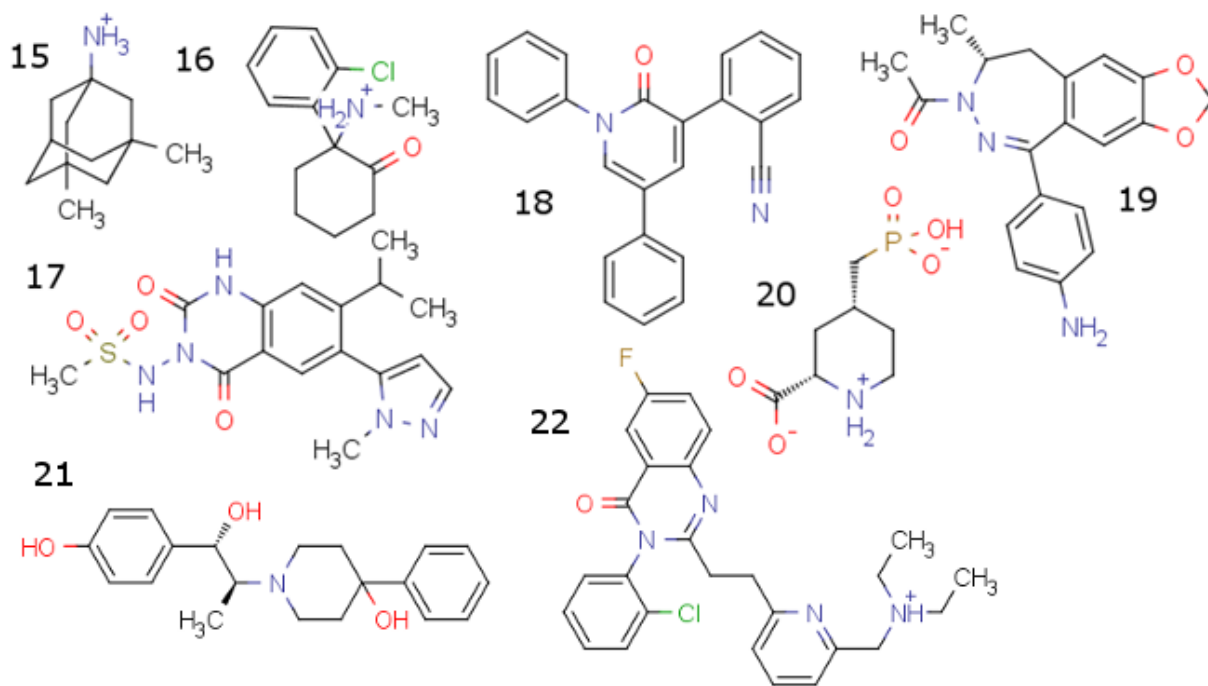
Таблица 2. Данные о проведенных клинических исследованиях препаратов, содержащих лиганды глутаматных рецепторов, за период 2006-2014 гг.

Лиганд	Механизм действия	Цель исследования	Результаты
Мемантин (15)	Низкоаффинный, неселективный блокатор NMDA-рецептора	Добавление мемантина к антидепрессантам, лечение большого депрессивного расстройства (major depression)	Есть положительный эффект по сравнению с антидепрессантами [45]
		Деменции, наблюдаемые при системной красной волчанке	Статистические различия в состоянии пациентов между плацебо и мемантином отсутствуют [46].
		Шизофрения, совместное применение со стандартным лечением клозапином.	Наблюдается улучшение и для положительных, и для отрицательных симптомов [47]
		Сосудистая деменция	Применение мемантина улучшает познавательные способности при слабой и средней форме данного заболевания [48]
		Хроническая головная боль при напряжении	Мемантин несколько облегчает состояние пациентов по сравнению с плацебо [49]
Кетамин (16)	Высокоаффинный, неселективный блокатор каналов NMDA-рецептора	Большое депрессивное расстройство (major depression)	Снижает симптомы депрессии по сравнению с плацебо [50]
Селурампанел (17)	Конкурентный антагонист AMPA-рецепторов	Эпилепсия	Результаты 2 фазы клинических исследований достаточно обнадеживающи для проведения третьей фазы [51]
Перампанел (18)	Неконкурентный антагонист AMPA-рецепторов	Эпилепсия	Одобен ЕМА для лечения эпилепсии [52]
Талампанел (19)	Неконкурентный антагонист AMPA-рецепторов	Амиотрофический латеральный склероз	Готовится к прохождению третьей фазы клинических исследований [53]
D-серин	Неселективный коагонист глутаматных рецепторов	Продромальные симптомы шизофрении	Количество испытуемых невелико, есть значимая эффективность по сравнению с плацебо [54]
Селфотел (20)	Конкурентный антагонист глутаматного сайта NMDA-рецептора	Инсульт	Прекращены вследствие побочных эффектов [55]



### 1.7.1. Инсульт и травма мозга

Множество экспериментов *in vitro* [56,57] и на животных позволяли предположить клиническую эффективность блокаторов глутаматных рецепторов для предотвращения смерти или ускорения восстановления после инсульта. Однако проведенные клинические исследования [58,59] продемонстрировали



неэффективность использования антагонистов глутаматных рецепторов в реальной ситуации. Предполагаемые причины отсутствия положительных результатов отличаются для различных типов антагонистов. Для блокаторов ионного канала наблюдается наличие крайне нежелательных побочных эффектов, таких как влияние на сердечно-сосудистую систему (удлинение QT-интервала) и психотомиметическое действие, при необходимых для проявления нейропротекторной активности концентрациях [60]. По-видимому, использование одних лишь блокаторов NMDA-рецепторов не будет эффективным, так как при ишемии в клетках головного мозга запускается множество нейротоксических эффектов, и гиперактивация этих рецепторов оказывается лишь одним из них [61]. Также очень важным фактором успешного применения препарата может быть время, прошедшее после инсульта или травмы [62]. Более того, на клеточном уровне показано, что применение антагонистов глутаматных рецепторов может замедлить [55] восстановление выживших после травмы нейронов.

Таким образом, намечается два пути исследований возможности применения антагонистов NMDA-рецептора для лечения инсульта и травм мозга: совместное использование антагонистов NMDA-рецептора с препаратами, подавляющими другие механизмы повреждения мозга, или лечение пациентов, получивших травмы мозга не позднее двух часов до начала терапии. Конкурентный антагонист AMPA-рецептора селфотел (**20**) также продемонстрировал неэффективность при инсульте и травмах мозга (таблица 2).

### **1.7.2. Большое депрессивное расстройство**

Данная болезнь на сегодняшний день является наиболее распространенным нейropsychиатрическим заболеванием [63]. Однако имеющиеся в арсенале психотерапевта препараты оказываются бессильны [64] примерно в половине случаев. Эффект при этом становится заметным лишь после нескольких недель применения. К настоящему моменту накоплено много данных об эффективности кетамина для лечения различных типов депрессивного расстройства [65] (таблица 2). Кетамин (**16**) обладает быстрым антидепрессантным эффектом, который длится несколько дней. При этом кетамин демонстрировал высокую эффективность в случаях устойчивой к стандартной терапии депрессии. При этом психотомиметические побочные эффекты присутствуют в процессе приема кетамина (50% случаев) и пропадают после окончания процесса введения. Аналогичный антидепрессантный эффект наблюдается для CP-101,606 (**21**), отрицательного модулятора NMDA-рецептора [66].

### **1.7.3. Ноотропный эффект лигандов глутаматных рецепторов**

Соединения, модулирующие работу AMPA-рецептора и замедляющие процессы деактивации и десенситизации, представляют интерес с точки зрения улучшения памяти и когнитивных функций [67]. Наиболее клинически исследованным препаратом является CX516 (**63**, стр. 106), низкоаффинный модулятор AMPA-рецептора, замедляющий процесс деактивации [68]. По результатам клинических исследований данный препарат существенно улучшает

память здоровых пожилых людей [69], однако практически не влияет на когнитивную дисфункцию при шизофрении [70] и синдроме Мартина-Белл [71].

#### **1.7.4. Шизофрения**

Последствия приема антагонистов NMDA-рецептора напоминают симптомы шизофрении [72]. Эти данные стали базисом одной из гипотез возникновения шизофрении: недостаточной активации или экспрессии [73] глутаматных рецепторов. С учетом этого было проведено несколько клинических исследований глицина, D-аланина, D-цикосерина [74]. При терапии нейролептиками прием агонистов NMDA-рецептора вызывает некоторое ослабление отрицательных симптомов, но не влияет на положительные симптомы шизофрении. Однако на более широкой выборке данные эффекты не проявились (таблица 2), что можно объяснить совместным приемом антипсихотиков второго поколения. Необходимость приема высоких доз агонистов глицинового сайта, их слабое проникновение через гематоэнцефалический барьер создают предпосылки поиска других мишеней. На сегодняшний день ими являются глициновый транспортер (GlyT1) и оксидаза D-аминокислот (DAAO). Саркозин (N-метилглицин) — слабый ингибитор обратного захвата глицина, по данным клинических исследований [75] эффективен и при положительных, и при отрицательных симптомах шизофрении. Очень хорошие результаты получены при добавлении бензоата натрия (слабого ингибитора DAAO) к стандартной терапии нейролептиками [76].

К сожалению, имеется довольно мало данных о лигандах, селективных к подтипам глутаматных рецепторов, поэтому дальнейшие клинические исследования могут быть связаны с изучением лигандов, селективных к определенным подтипам.

#### **1.8. Лиганды ионотропных глутаматных рецепторов**

Сведения о лигандах глутаматных рецепторов к настоящему моменту весьма обширны, поэтому представляется уместным выделить несколько групп лигандов, действующих на различные сайты связывания рецепторов.

### 1.8.1. Агонисты глутаматного сайта

Сайты связывания как глутамата, так и глицина находятся между долями D1 и D2 соответствующих лиганд-связывающих доменов всех глутаматных рецепторов. Связывание агониста индуцирует процесс соединения долей, что, в свою очередь, приводит к открытию канала и активации рецептора. Известно, что ни N-метил-D-аспартат, ни D-аспартат не способны активировать каинатные или AMPA-рецепторы [77].

Общий ход полипептидной цепи в лиганд-связывающем домене сохраняется во всех типах глутаматных рецепторов, однако изменения боковых цепей вызывают существенные различия в профиле селективности. В структуре А (рис. 2) аминокислота связанного глутамата формирует тетраэдрическую сеть водородных связей с R478, T480, G705. Карбоксильная группа, связанная с  $\alpha$ -атомом углерода, формирует солевой мостик с R485, одновременно образуя водородные связи с двумя пептидными группами основной цепи. Дистальная карбоксильная группа глутамата образует две водородные связи с амидным атомом водорода основной цепи и гидроксильной группой боковой [79]. В случае GluK2 (Б) карман связывания глутамата практически не отличается от кармана в GluA2, однако на позиции Thr480 в GluK2 находится аланин, который не может поддерживать водородную связь с аминокислотной группой глутамата, однако оставляет место для молекулы воды, которая и образует эту водородную связь.

Уникальность NMDA-рецепторов заключается в том, что их активация осуществляется при одновременном связывании глутамата субъединицей GluN2 и глицина субъединицей GluN1 [80]. Существенные отличия в строении сайта

связывания агонистов между GluN2A (В), GluN1 (Г) и другими

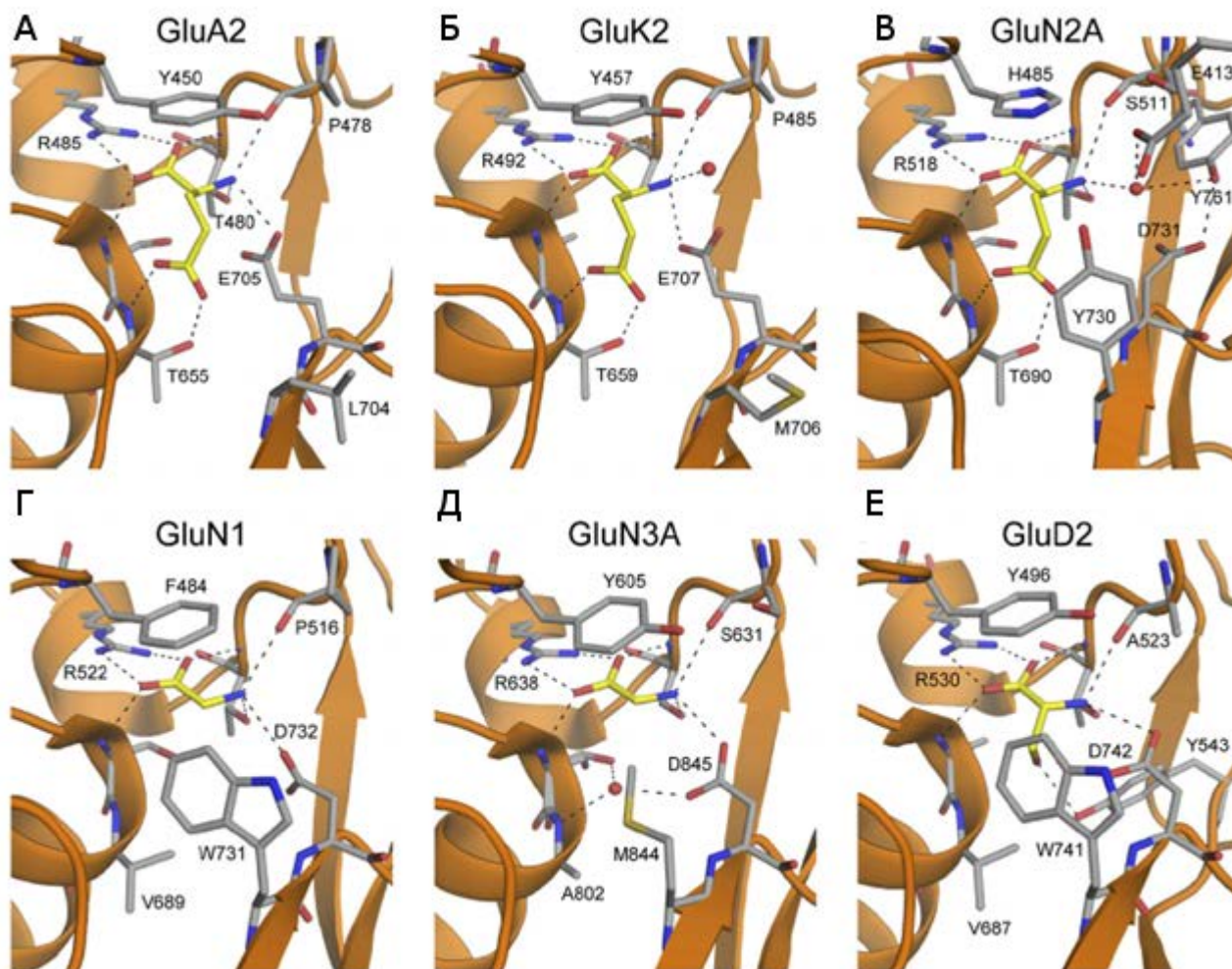


Рисунок 3. Сайты связывания глутамата и глицина в известных структурах глутаматных рецепторов (взято из [78]). А — сайт связывания глутамата в GluA2 (PDB 1FTJ), Б — сайт связывания глутамата в GluK2 (PDB 1S7Y), В — сайт связывания глутамата в GluN2A, Г — сайт связывания глицина в GluN1, Д — сайт связывания глицина в GluN3A, Е — сайт связывания D-серина в GluD2.

сайтами связывания представлены на рис. 3. Во-первых, объем сайта связывания агонистов в подтипах NMDA-рецептора оказывается существенно меньше, чем в каинатных и AMPA-рецепторах. Характерные водородные связи, поддерживающие лиганд-белковый комплекс, аналогичны водородным связям комплекса глутамата с GluK2:  $\alpha$ -карбоксильная группа образует солевой мостик с R522 и двумя амидными атомами водорода основной цепи, аминогруппа глутамата образует водородную связь с гидроксилами T513 и S511. Во-вторых, в непосредственной близости от аминогруппы находится молекула воды, которая,

по-видимому, и позволяет NMDA-рецептору связывать N-метилованные аминокислоты.

В случае GluN1 остаток W731 создает существенные стерические препятствия для связывания глутамата (в случае GluN2A Y730 и глутамат находятся в ван-дер-ваальсовом контакте) и одновременно остаток T690 (GluN2A) в этом случае оказывается замещен на остаток валина, что в дополнение к стерическим затруднениям повышает липофильность этой части сайта связывания и полностью подавляет возможность связывания глутамата субъединицей GluN1. GluN2A содержит остаток D731, который в случае AMPA и каинатных рецепторов замещается на глутамат. При этом D731, будучи короче, оставляет место для метильной группы N-метил-D-аспартата.

Циклические и содержащие атом галогена аналоги глицина и серина, например, противотуберкулезный препарат D-циклосерин являются частичными агонистами NMDA-рецептора [81,82]. Интересно, что D-циклосерин вызывает максимальный отклик в случае GluN2C подтипа, что можно использовать для его избирательной потенциации [83]. Следует отметить, что при ассоциации субъединиц GluN1 с субъединицами GluN2 сродство к глицину GluN1 различается в зависимости от подтипа GluN2 (максимальное для GluN2A, минимальное для GluN2D) [84]. Подтипы GluN3A и GluN3B способны связывать глицин, но не глутамат, как и GluN1. Однако при этом степень гомологичности отдельно взятых лиганд-связывающих доменов GluN1 и GluN3 составляет около 30%, а константа связывания глицина с отдельно взятым лиганд-связывающим доменом GluN3A в 600 раз больше, чем аналогичная величина для GluN1 [85]. Карбоксильная группа глицина взаимодействует с R638, S633, S801, аминокислота — с D845, S631, S633 [15]. Главные различия для сайтов связывания глицина в GluN1 и GluN3A проявляются в положениях сайтов связывания молекул воды, что, по-видимому, влияет на различие в сродстве к глицину.

Лиганд-связывающий домен GluD2 рецептора, который также относится к семейству глутаматных рецепторов, больше всего напоминает лиганд-связывающий домен GluN1 [86]. Эндогенным лигандом GluD2 рецептора, по-

видимому, является D-серин. При этом имеются данные, что физиологическая роль данного рецептора не связана с ионной проводимостью [87,88]. Более того, регуляция синаптической дифференциации выполняется даже рецепторами в отсутствие лиганд-связывающего домена.

Механизм действия агонистов лиганд-связывающего домена можно представить следующим образом: лиганд-связывающий домен может находиться в нескольких состояниях (как минимум двух: открытом и закрытом). При этом агонисты смещают равновесие к закрытому состоянию домена, что ведет к изменению конформационного состояния петель, соединяющих трансмембранный домен с лиганд-связывающим, и открытию канала, а антагонисты стабилизируют открытую форму домена [89-91]. smFRET (single molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer) исследования [92] демонстрируют существование лишь небольшого числа конформационных состояний лиганд-связывающего домена, при этом связывание лиганда лишь изменяет заселенность каждого из них. При разработке конкурентных антагонистов глутаматных рецепторов очевидным является увеличение длины или объема линкера, соединяющего дистальную карбоксильную группу и аминокарбоксильный фрагмент.

### **1.8.2. Конкурентные антагонисты**

Одним из первых изученных конкурентных антагонистов глицинового сайта NMDA-рецепторов является дихлоркинуреновая кислота (**6**) [93,94]. Сама кинуреновая кислота, представляющая собой продукт метаболизма триптофана, также оказывает слабое антагонистическое действие, что вкуче с повышенным содержанием кинуреновой кислоты в мозге некоторых пациентов послужило толчком к созданию кинуреновой гипотезы шизофрении [95].

В структуре комплекса лиганд-связывающего домена GluN1 с дихлоркинуреновой кислотой [10] сохраняется характерная для комплексов с агонистами водородная связь между карбоксильной группой лиганда и R131 (рис. 3). Гидроксипиридиновое кольцо находится в кетонной таутомерной форме, при этом протонированный атом азота образует водородную связь с карбонильной

группой основной цепи остатка L125. Карбонильная группа пиридинового фрагмента оказывается связана с S180 через молекулу воды. Атом хлора в положении 5 образует ван-дер-ваальсов контакт с W223, а F192 находится в стекинг-взаимодействии с пиридиновым фрагментом. В зависимости от того, с какими подтипами GluN2 субъединица GluN1 образует тетрамер, сродство дихлоркинуреновой кислоты (**6**) может отличаться на порядок [96,97].

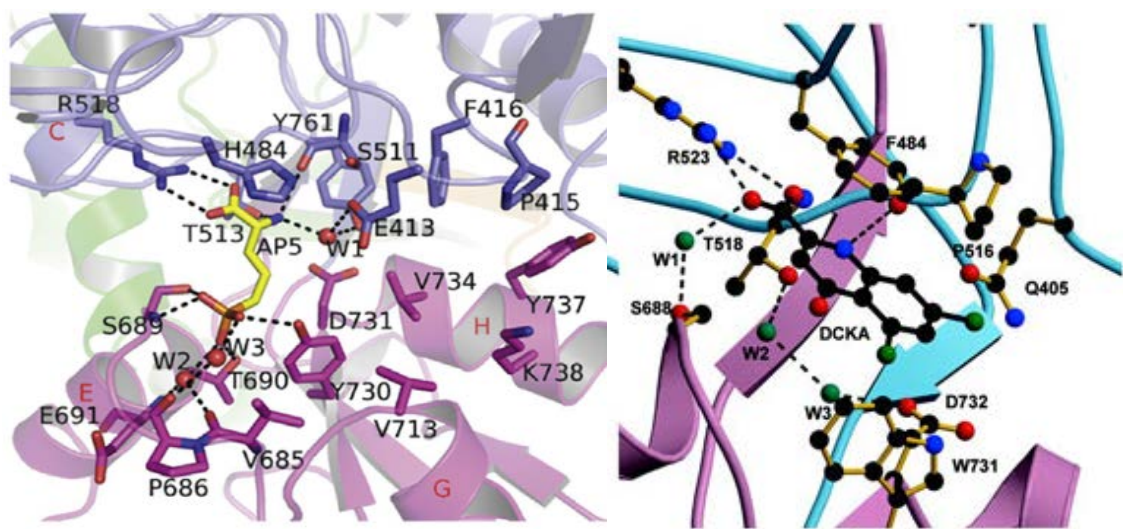


Рисунок 4. (Справа) Структура комплекса DCKA (**6**) / лиганд-связывающий домен GluN1 *Rattus norvegicus*, нумерация остатков для структуры 1PBQ не соответствует полной структуре GluN1, зеленым цветом обозначены водородные связи (взято из [6]). (Слева) Способ связывания конкурентного антагониста D-AP5 (**7**) глутаматного сайта.

Следует отметить, что ксенон [99], одно из лучших на сегодняшний день средств для общего наркоза, также действует на NMDA-рецептор посредством связывания с лиганд-связывающим доменом GluN1 [100]. Моделирование механизма действия ксенона проводилось Андрийченко с соавторами [101].

Лишь недавно появились структурные данные о связывании антагонистов глутаматного сайта [98]. Как и в случае AMPA-рецепторов, связывание антагонистов в глутаматном сайте приводит к неполному закрытию лиганд-связывающего домена (рис. 3).

Конкурентные антагонисты подтипов GluN2 на практике используются мало, так как исследователям не удалось добиться существенной селективности к подтипам. Однако D-AP5 (**7**) раньше использовали в исследованиях



синаптической пластичности и нейротоксичности, чтобы отличать NMDA-опосредованные эффекты от эффектов, вызываемых ингибированием других глутаматных рецепторов [102,103]. Все 10 остатков, непосредственно контактирующих с глутаматом (рис. 4), являются консервативными среди подтипов GluN2 [104], поэтому разработка антагонистов этого сайта пока не имеет перспективы.

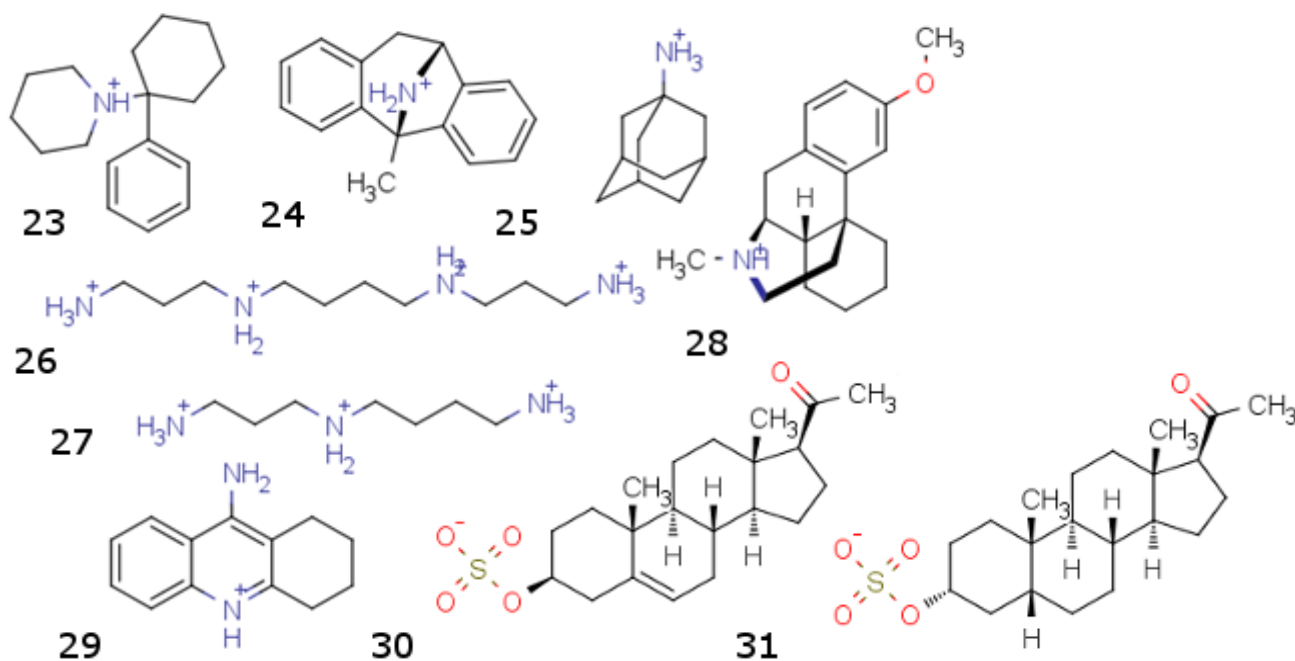
### 1.8.3. Неконкурентные антагонисты

Исторически первым известным отрицательным аллостерическим модулятором (неконкурентным антагонистом) NMDA-рецептора стал ифенпродил (**4**), который отличается высокой селективностью по отношению к GluN2B-подтипу [105]. Схематичное расположение сайтов связывания в структуре рецептора представлено на рис. 1. Интересно, что различные сплайс-варианты GluN1 не влияют на термодинамику связывания ифенпродила, рецепторы состава GluN1/GluN2A/GluN2B менее чувствительны к ифенпродилу [106]. Предполагается, что ифенпродил стабилизирует форму, связывающую агонист и имеющую меньшую вероятность открытия канала [107,108]. При этом ингибирование ифенпродилом не является полным (~90%) при насыщающих концентрациях. К сожалению, антагонисты данного типа обладают нежелательными побочными эффектами по отношению к  $\alpha_1$ -адренергическим рецепторам, серотониновым рецепторам, кальциевым каналам и hERG [109]. Частично эти проблемы решаются повышением сродства лигандов данного подтипа к NMDA-рецептору, например, как это имеет место для Ro25-6981 (**5**) [110].

Побочное действие на hERG отсутствует у лигандов, не содержащих основных атомов азота, также повышение числа атомов кислорода в линкере уменьшает сродство к hERG и  $\alpha_1$ -адренергическим рецепторам [111,112].

Аналоги известного антагониста AMPA-рецептора CP-465,022 (**22**) обладают антагонистическим действием на некоторые подтипы NMDA-рецептора, ингибирование при этом неконкурентно и не зависит от потенциала мембраны

[113]. Интересно, что некоторые представители данного класса лигандов оказываются почти на 2 порядка эффективнее по отношению к подтипам GluN2C/GluN2D, чем к GluN2A/GluN2B. Примерно известно расположение аминокислотных остатков, вносящих наибольший вклад в селективность: Q704 и L708 (GluN2D) [114].



Показано, что этанол является неконкурентным антагонистом NMDA-рецептора, при этом эффективность ингибирования зависит от подтипа субъединицы GluN2 [115,116], однако не зависит от сплайс-вариантов GluN1, pH, присутствия  $Zn^{2+}$  [117,118]. Следует отметить, что действие этанола на NMDA-рецепторы, по-видимому, обуславливает многие эффекты от употребления алкоголя [119].

#### 1.8.4. Блокаторы канала

Данный вид ингибиторов действует следующим образом: под действием агонистов открывается пора канала, в которую затем попадает блокатор, образующий водородную связь с остатком аспарагина в устье канала и механически препятствующий прохождению ионного тока [120]. Данный механизм хорошо объясняет корреляцию между вероятностью открытия канала и

эффективностью ингибирования. Некоторые блокаторы имеют размер, позволяющий лиганду оставаться в полости канала после его закрытия (PCP (23), МК-801 (24), кетамин (16)). Диссоциация такого комплекса происходит достаточно медленно и требует присутствия агониста [121]. Некоторые исследования демонстрируют, что связывание таких блокаторов, как амантадин (25), способствует последующему закрытию канала [122]. Диссоциация комплекса с мемантином (15) кинетически происходит гораздо легче, что уменьшает побочные эффекты и позволяет использовать мемантин в клинической практике [123]. Ингибиторы такого типа снижают избыточную активность NMDA-рецептора, при этом не влияя на нормальную физиологическую функцию канала [124].

Блокаторами канала NMDA-рецептора являются ионы  $Mg^{2+}$ , полиамины спермин (26) и спермидин (27), МК-801 (24), кетамин (18), фенциклидин (PCP) (23), производные аминокислот амантанов (15), (25), декстрометорфан (28), 9-аминотетрагидроакридин (29). Следует отметить, что лиганды данного типа отличаются низкой селективностью по отношению к подтипам GluN2. Например, МК-801 лишь в 10 раз эффективнее в случае каналов GluN2A/GluN2B, чем для GluN2C/GluN2D [125]. Аминокислотные остатки, определяющие эффективность связывания блокаторов, неидентичны, однако находятся на первой и второй трансмембранных петлях [126].

### **1.9. Аллостерическая регуляция NMDA-рецептора**

Модуляторы глутаматных рецепторов интересны для медицинской химии по двум причинам: во-первых, они не активируют или блокируют глутаматергическую систему, а усиливают или ослабляют эффект от связывания эндогенного лиганда. Во-вторых, связывание модулятора, как правило, происходит в сайтах, которые имеют низкое сходство аминокислотных последовательностей среди подтипов, что позволяет добиться большей селективности.

Многие двухвалентные катионы способны влиять на деактивацию рецептора и потенциал-зависимое блокирование канала. Среди двухвалентных катионов наиболее эффективно ингибируют NMDA-рецепторы ионы  $Zn^{2+}$  [127]. Внутриклеточные ионы цинка находятся в синаптических везикулах в гиппокампе, полосатом теле, коре головного мозга [128] и, по-видимому, выделяются в синаптическую щель вместе с глутаматом, модулируя агонистический эффект. Анализ ингибирования цинком различных подтипов NMDA-рецептора позволяет предполагать наличие двух сайтов, связывание в которых влияет на ток через канал: высокоаффинного сайта, обеспечивающего потенциал-независимое ингибирование тока ( $IC_{50} = 10-30$  нМ), и низкоаффинного сайта, связывание цинка в котором приводит к потенциал-зависимому блокированию ( $IC_{50} = 20-100$  мкМ) [129,130]. Показано, что высокоаффинный сайт связывания цинка находится в аминоконцевом домене [131]. При этом низкоаффинный сайт связывания цинка расположен рядом с остатками, образующими вход в фильтр селективности ионного канала [132]. Из всех глутаматных рецепторов к ингибированию ионом цинка склонны лишь рецепторы, содержащие субъединицы GluN2A или GluN2B. При этом для GluN1/GluN2B рецептора  $IC_{50}$  имеет величину порядка 1  $\mu$ М [133]. Остатки, участвующие в связывании цинка известны по кристаллографическим данным [5], что позволяет выдвинуть гипотезу о механизме действия цинка: он стабилизирует закрытую форму аминоконцевого домена. Методом ковалентной модификации мутантных форм GluN1/GluN2B показано, что степень открытия долей аминоконцевого домена положительно коррелирует с вероятностью открытия канала. Предполагается, что причиной этого факта является дестабилизация поверхности контакта между лиганд-связывающими доменами [134]. Данный механизм подтверждается тем фактом, что мутации, дестабилизирующие поверхность контакта между лиганд-связывающими доменами, также увеличивают сродство [135] к ионам цинка.

Одновалентные ионы напрямую не влияют на функционирование NMDA-рецепторов, однако было показано, что ионный ток через NMDA-рецепторы

усиливается при повышении концентрации ионов  $\text{Na}^+$ . Данный процесс обусловлен активацией при повышении концентрации иона натрия фермента Src тирозинкиназы, который фосфорилирует NMDA-рецепторы [136].

Протоны способны ингибировать все типы глутаматных рецепторов [137]. Для NMDA-рецепторов величина  $IC_{50}$  в зависимости от типа GluN2-субъединицы колеблется в пределах  $\text{pH} = 7.0-7.4$ . При этом ингибирование протонами не зависит от наличия связанного агониста или мембранного потенциала. Кинетически протоны уменьшают вероятность открытия канала, мало влияя на величину ионного тока и время открытия [138]. По данным мутагенеза аминокислотные остатки, ответственные за  $\text{pH}$ -зависимое ингибирование, находятся на междимерном интерфейсе лиганд-связывающих доменов [139].

Полиамины, такие как спермин (26) и спермидин (27), положительно модулируют NMDA-рецепторы независимо от потенциала клеточной мембраны. Интересно, что существует два типа модулирования. Механизм глицин-зависимого модулирования характерен для рецепторов, содержащих GluN2A и GluN2B субъединицы [140], и проявляется в увеличении сродства лиганд-связывающего домена к глицину за счет аллостерического взаимодействия с полиаминовым сайтом в аминоконцевом домене [141]. Глицин-независимое потенцирование NMDA-рецептора при насыщающих концентрациях глицина имеет место только в рецепторах, содержащих субъединицу GluN2B [142].

NMDA-рецепторы склонны к модуляции нейростероидами, при этом ненасыщенные сульфаты являются положительными модуляторами, а насыщенные планарные — отрицательными [143]. При этом отрицательно заряженная группа при C3-атоме углерода циклопентанпергидрофенантренового фрагмента необходима для активности [144,145]. Эффективность нейростероидов сильно зависит от типа субъединицы: прегненолон сульфат (30) значительно увеличивает вероятность открытия канала, содержащего субъединицы GluN2A и GluN2B, в то время как для GluN2C и GluN2D он обладает ингибирующим действием [146]. Такая селективность по отношению к субъединицам позволила выявить сайт связывания такого типа нейростероидов, который находится на доле

D2 лиганд-связывающего домена [147,148]. Прегнано́лон сульфат (**31**) уменьшает вероятность открытия канала и понижает среднее время пребывания канала в открытом состоянии, а также повышает склонность к десенситизации, при этом обладает низкой селективностью по отношению к рецепторам, построенным из различных подтипов субъединиц GluN2 [149]. Полиненасыщенные жирные кислоты также способны к положительной модуляции NMDA-рецептора, увеличивая при этом вероятность открытия канала и не влияя на амплитуду ионного тока [150].

NMDA-рецепторы чувствительны к влиянию осмоса: вероятность открытия канала повышается при растяжении мембраны и уменьшается при сжатии [151]. Ион свинца  $Pb^{2+}$  ингибирует токи через рецептор по механизму, аналогичному механизму ингибирования ионом  $Zn^{2+}$  [152]. Интересно, что аденозинтрифосфорная кислота способна влиять на активацию NMDA-рецептора [153], некоторые исследования убедительно демонстрируют, что гистамин селективно потенцирует NMDA-рецепторы, содержащие GluN2B субъединицы, посредством связывания с аминоконцевым доменом [154].

Таким образом, к настоящему моменту имеются обширные сведения о фармакологии, путях регуляции и роли глутаматных рецепторов в организме человека, что открывает возможности для направленного дизайна их лигандов.

## **1.10. Применение молекулярного моделирования для исследования структуры и функций NMDA-рецептора**

### **1.10.1. Количественные соотношения «структура-активность»**

Для лигандов NMDA-рецептора было построено значительное число моделей QSAR. Данные приведены в таблице 3.

Для анализа данных о связывании лигандов различных сайтов NMDA-рецептора используются методы 3D-QSAR, искусственных нейронных сетей с применением физико-химических дескрипторов, методы Ганча, Фри-Вильсона и HQSAR. Наиболее широкое применение находит метод Ганча, видимо вследствие длительного отсутствия структурных данных о способах связывания лигандов.

Методы 3D-QSAR применяются менее широко (в основном анализируются лиганды глицинового сайта, так как в этом случае, как правило, наложение очевидно). Наиболее высокие значения  $q^2$  наблюдаются для лигандов глицинового сайта. Хорошие результаты получаются при использовании HQSAR [171]. В то же время следует отметить недостаточное применение QSAR-анализа для изучения лигандов аминоконцевого домена.

Таблица 3. Количественные соотношения структура-активность для лигандов NMDA-рецептора.

Выборка	Сайт связывания	Число соединений	Наложение	Метод	$r^2$	$q^2$	S	Контроль	Литература
Триптамины	канал	64	-	Голографический QSAR	0.80	0.60	0.27	LOO	[155]
Арилиденаминогуанидины	канал	45	-	PLS, ANN, 12 разл. дескрипторов	0.81	0.71	0.26	LOO	[156]
Триазолил-амидины	Сайт связывания ифенпродила	17	-	MLR, 3 дескриптора: cLogP, E(HOMO), ovality	0.84	0.61	0.29	LOO	[157]
Аналоги лидокаина	Канал	13	-	MLR: 3 дескриптора	0.96	-	0.1	-	[158]
Выборка гетероциклов разных классов	Глициновый сайт	72	-	autoMEP/PLS&RSA	0.81	0.75	0.5	LOO	[159]
Аналоги фенциклидина	канал	38	-	ANFIS	-	0.48	0.54	-	[160]
Аналоги ифенпродила	Сайт связывания ифенпродила	47	-	CoMSIA	0.97	0.54	-	LOO	[161]
Тиенопиридиноны	Глициновый сайт	46	-	FWA, HA	0.97 0.92	-	0.31; 0.42	-	[162]
Винилиндол-карбоновые кислоты	Глициновый сайт	34	Индольные и карбоксильные группы	CoMFA	0.8	0.55	0.3	LOO	[163]
4-гидроксинолоны-2	Глициновый сайт	126	-	MLR, ANN	-	-	1.1 0.7	Внешняя контрольная выборка	[164]

Хиноксалин-2,3-дионы	Глициновый сайт	48	-	HA, PLS	0.78	0.67	-	LOO	[165]
Винилпиррол-карбоновые кислоты	Глициновый сайт	26	-	HA, PLS	0.74	0.44	-	LOO	[166]
Амины (фенциклидин, амантадин и др.)	Канал	17	Наложение по наибольшему общему подграфу	CoMFA	0.94	0.72	0.61	LOO	[167]
Производные индол-2-карбоновой кислоты	Глициновый сайт	25	-	HA, PLS	0.84	0.76	0.28	-	[168]
Хиноксалин-2,3-дионы	Глициновый сайт	88	Докинг в построенную по гомологии модель	CoMFA	-	0.81	0.38	LMO	[169]
Амины	Канал	27	Докинг в построенную по гомологии модель	CoMFA	0.99	0.74	0.09	LMO	[170]

### 1.10.2. Виртуальный скрининг

Работы, включающие проведение виртуального скрининга с целью идентификации новых лигандов NMDA-рецептора, можно разделить на 3 группы. К первой группе можно отнести методы, основанные на докинге базы данных молекул в один из известных сайтов связывания лигандов. Ко второй группе относятся методы фильтрования по фармакофорной гипотезе. Третью группу составляют подходы, основанные на методах машинного обучения.

В работе [7] авторы проводили виртуальный скрининг с использованием построенной по гомологии модели для лиганд-связывающего домена GluN3B подтипа в антагонист-связанной форме. Авторы утверждают, что в дальнейшем полученные селективные лиганды могут быть использованы для фармакологической характеристики рецепторов этого подтипа. Восемь из 99 испытанных веществ проявили антагонистическую активность по отношению к NMDA-рецептору. Тот же коллектив авторов опубликовал данные об еще одном антагонисте GluN1 [172], выявленном тем же методом.



Виртуальный скрининг методом фармакофорного подобия представлен работой [173], в которой была проведена валидация метода скрининга ( $AUC = 0.8$ , число структур в контрольной выборке — 162).

Целью работы [174] была проверка эффективности виртуального скрининга методом опорных векторов с использованием топологических и физико-химических дескрипторов для предсказания активности относительно большой выборки активных молекул с различными типами биологической активности, в том числе антагонизма к NMDA-рецептору.

И наконец, в работе [159] был проведен сравнительный анализ результатов виртуального скрининга методами докинга, фармакофорного подобия и наивного байесовского классификатора с отпечатками пальцев для глицинового сайта.

В целом, опубликовано достаточно мало работ, описывающих виртуальный скрининг по отношению к NMDA-рецептору. Данный метод нашел широкое применение в поиске новых соединений-хитов уже после начала активного изучения структуры и функций NMDA-рецептора.

### **1.10.3. Использование метода молекулярной динамики**

Данный метод позволяет изучать динамическое поведение биомолекул для уточнения структуры комплексов, расчета свободной энергии связывания, барьеров перехода между конформационными состояниями. Анализируя результаты применения данного метода для исследования NMDA-рецептора, следует отметить несколько интересных работ. В работе [175] исследовалось влияние различных частичных агонистов на торсионные углы шарнирных областей основной цепи лиганд-связывающего домена. Показано [176], что замены цистиновых сшивок на остатки аланина в лиганд-связывающем домене существенно увеличивают подвижность субъединиц, в то время как для аминоконцевых доменов такие замены незначительно влияют на динамику рецептора. В работе [177] идентифицированы сайты связывания ксенона и изучено его влияние на конформационное состояние лиганд-связывающих

доменов. Поиск сайта связывания и изучение влияния ноотропа нефирацетама были проведены в работе [178].

В целом, следует отметить небольшое количество работ по молекулярной динамике глутаматных рецепторов, причем практически все они сосредоточены на лиганд-связывающем домене, в то время как сведения о периферийных доменах и сайтах связывания аллостерических модуляторов гораздо менее обширны. Применение методов молекулярного моделирования может пролить свет на особенности функционирования аминоконцевых доменов и междоменное взаимодействие, а также позволит предложить перспективные лиганды для управления функционированием глутаматных рецепторов.

## **Глава 2. Поиск отрицательных модуляторов NMDA-рецептора, действующих на аминоконцевой домен**

### **2.1. Особенности моделирования структуры белка по гомологии**

Согласно «термодинамической гипотезе» [179] трехмерная структура белка полностью определяется его аминокислотной последовательностью и обладает самым низким значением свободной энергии среди возможных конформеров. Применимость данного подхода к нахождению полной нативной структуры белка лимитируется двумя факторами. Во-первых, аккуратный и быстрый расчет значения свободной энергии с учетом эффектов растворителя, для заданной конформации пока остается достаточно сложной задачей. Во-вторых, поверхность свободной энергии для типичного белка содержит большое количество локальных энергетических минимумов, и методы нахождения глобального минимума требуют больших вычислительных ресурсов даже для небольших пептидов. В некоторых случаях вторую проблему можно решить, применяя знание о том, что родственные белки, имеющие высокую степень гомологии, также имеют сходные способы укладки полипептидной цепи. Таким образом, начальная структура для оптимизации свободной энергии оказывается близкой к структуре, соответствующей глобальному энергетическому минимуму. В данной работе моделирование по гомологии выполнялось в программе MODELLER 9.8 [180]. Стандартный протокол процесса построения модели состоит из четырех стадий: поиск подходящего шаблона, выравнивание аминокислотных последовательностей моделируемого белка и шаблона, построение трехмерной структуры моделируемого белка, оценка качества построенной модели. Парные и множественные выравнивания аминокислотных последовательностей выполнялись в программе ClustalX [181] с использованием матрицы замещения BLOSUM62 [182], штрафы за разрыв цепи и удлинение обрыва на один остаток были выбраны равными 10 и 0.1 соответственно. Затем с помощью функции «automodel» строили 100 моделей и отбирали лучшую. Для оценки качества построенной модели использовался статистический потенциал DOPE (Discrete

Optimized Protein Energy) [183]. Данный потенциал рассчитывается суммированием значений некоторой псевдоэнергетической функции от всех межатомных расстояний в белке. Параметризация этой функции происходит на основании известных структур белка и имеет вероятностную природу, то есть, чем меньше вероятность того, что два атома заданных типов находятся на данном расстоянии, тем больше значение функции. Данная функция применяется в этой работе как для оценки качества модели всего белка, так и для построения энергетического профиля аминокислотной последовательности, что позволяет локализовать неудовлетворительно смоделированные участки аминокислотной цепи.

## **2.2. Анализ способа связывания неконкурентных антагонистов NMDA-рецептора, являющихся аналогами ифенпродила**

Долгое время для комплексов лигандов с аминоконцевым доменом было доступно крайне мало структурных данных. К настоящему моменту известно два комплекса аминоконцевых доменов NMDA-рецептора с лигандами (таблица 1). Несмотря на большое число данных по мутагенезу аминокислотных остатков, влияющих на связывание и физиологические эффекты лигандов такого типа, и наличие структур родственных белков, результаты моделирования значительно отличались от недавно полученных кристаллических структур [184].

На основании структуры комплекса аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B нами построены структурные модели комплексов состава GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D (рис. 5). Выравнивание аминокислотных последовательностей приведено на рис. 6. В качестве шаблона использовали структуру с кодом PDB 3QEL, которая представляет собой комплекс аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B с ифенпродилом (таблица 1).

При анализе множественных выравниваний аминокислотных последовательностей, приведенных на рис. 6, следует отметить, что аминоконцевые домены GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D обладают значительным сходством аминокислотных последовательностей, и, таким

образом, построенные модели будут достаточно информативными и надежными. Модели аминоконцевого домена GluN1 для различных комплексов мало отличаются друг от друга. Наибольшими отличиями от остальных доменов обладает аминоконцевой домен GluN2D: в нем присутствует длинная петля, состоящая из аминокислотных остатков с 276 по 298 (недостаточно хорошо смоделированная область 2 на рис. 6), которая почти в два раза длиннее гомологичных петель в GluN2A, GluN2B, GluN2C. Наиболее эффективные алго-

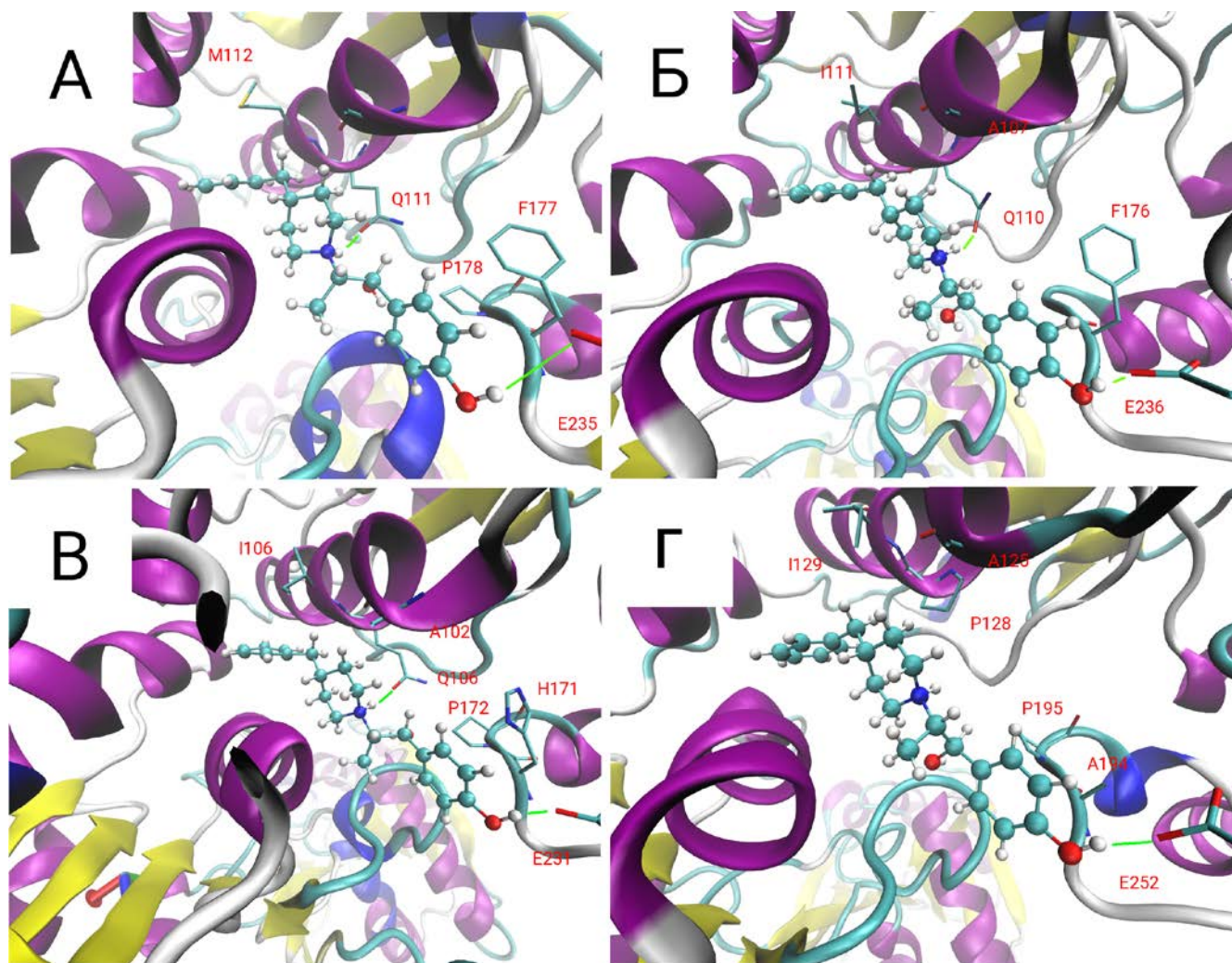


Рисунок 5. Сайты связывания ифенпродила в смоделированных по гомологии структурах GluN1/GluN2X, где X= A (А), В (Б), С (В), D (Г).

ритмы, разработанные к настоящему времени, способны удовлетворительно предсказывать конформации петель длиной до 14 остатков [185], а наличие большого количества остатков глицина и пролина позволяет предполагать множество вероятных низкоэнергетических конформаций данной петли. Область

1 на рис. 6 соответствует разупорядоченной петле, состоящей из аминокислотных остатков с 52 по 62 в структуре 3QEL. Итеративный подход к оптимизации ее структуры привел к существенному улучшению качества модели данной петли, однако, она, видимо, не имеет функционального значения и, скорее всего, не важна для функционирования домена.

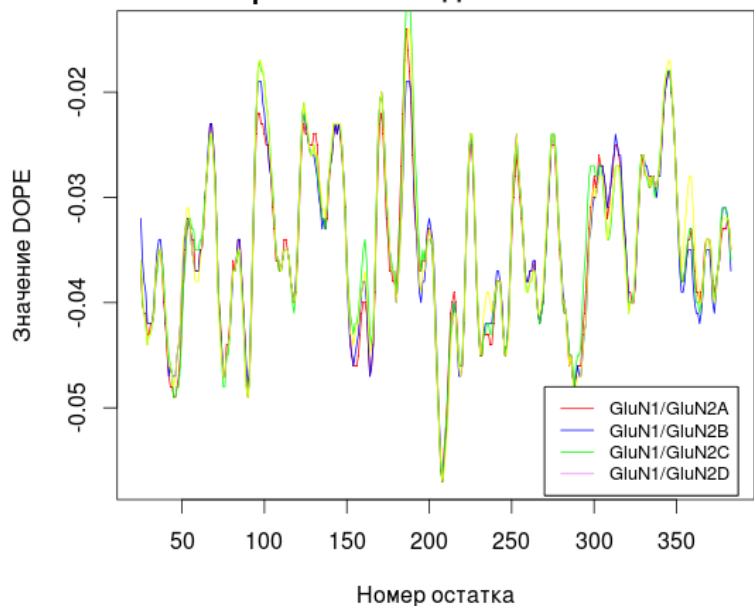
Петля, состоящая из остатков с 207 по 215 GluN2B, структурно выполняет важную роль в формировании поверхности контакта аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B и, по-видимому, стабилизирует данный комплекс. Следует отметить, что в аминокислотных последовательностях GluN2A, GluN2C и GluN2D наблюдаются значительные различия с последовательностью GluN2B в этой петле - как по ее длине, так и по аминокислотному составу.

Гомологичные петли в GluN2A и GluN2D оказываются короче и для остатков M207 и L209 (GluN2B), поддерживающих структуру петли в комплексе аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B, наблюдаются замены на гидрофильные остатки. Гомологичная петля GluN2C обладает такой же длиной, что и петля 207-215 в GluN2B, но состоит в значительной степени из остатков глицина и пролина. Таким образом, различия в аминокислотной последовательности могут с высокой вероятностью служить одной из причин низкого сродства ифенпродила к комплексам GluN2A, GluN2D, GluN2C.

На рис. 5 представлены смоделированные сайты связывания отрицательных аллостерических модуляторов. На каждом подрисунке выделено ближайшее аминокислотное окружение лиганда. Наибольшим сродством к ифенпродилу обладает лиганд-связывающий домен GluN2B подтипа, существенно слабее его связывают GluN2A и GluN2C и связывание практически отсутствует для GluN2D. Достаточно просто, исходя из ближайшего аминокислотного окружения, объяснить отсутствие сродства к аминоконцевому домену GluN2D. Во-первых, остаток Q110 (GluN2B) оказывается замещен на остаток P128 (GluN2D), который не может поддерживать водородную связь с заряженной третичной аминогруппой аналогов ифенпродила. Следует отметить, что наличие пролина в  $\alpha$ -спирали ведет к излому в ней или существенному изменению вторичной структуры, что может

указывать на то, что поверхность контакта аминоконцевых доменов GluN1/GluN2D существенно отличается от поверхности контакта между остальными типами димеров.

**DOPE-профили для аминоконцевых доменов GluN1 в комплексе с аминоконцевыми доменами различных подтипов GluN2**



**DOPE-профили для аминоконцевых доменов GluN2 различных подтипов**

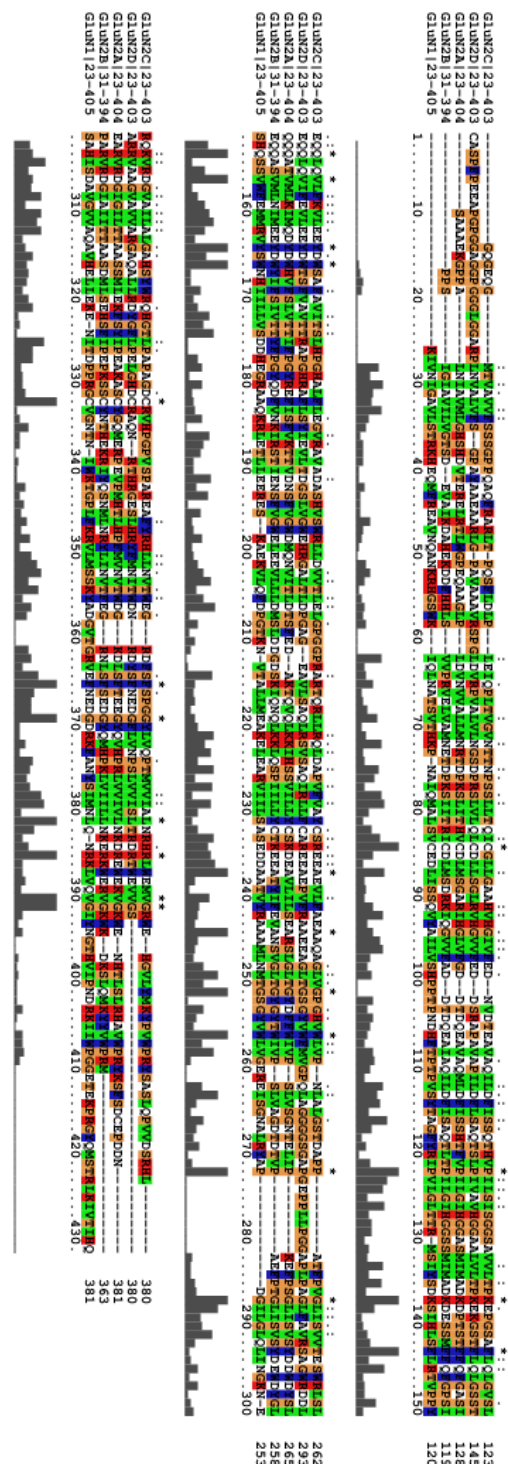
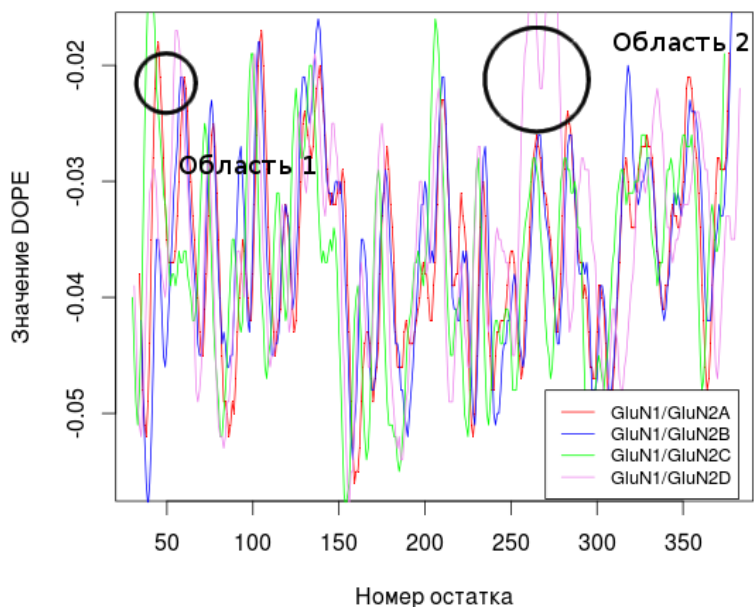


Рисунок 6. DOPE-профиль построенных моделей GluN1 (слева сверху) и GluN2X, где X = A, B, C, D (слева внизу), для наглядности последовательность остатков GluN2D смещена на 20 остатков влево; множественное выравнивание аминокислотных последовательностей аминоконцевых доменов (справа).

Во-вторых, замена F176 (GluN2B) на P195 (GluN2D) приводит к увеличению размера сайта связывания, что также способствует уменьшению площади контакта и, как следствие, уменьшению аффинности. Аминокислотное окружение лиганда отличается достаточно слабо для аминоконцевых доменов GluN2A, GluN2B, GluN2C. Основными взаимодействиями, за счет которых осуществляется связывание лиганда с аминоконцевым доменом GluN2B, являются: взаимодействия фенильной группы лиганда с гидрофобными остатками на поверхности белка, в том числе I111 (GluN2B), водородная связь между протонированной третичной аминогруппой лиганда и карбонилем боковой цепи Q110 (GluN2B), а также водородная связь между гидроксилом фенольной группы лиганда и E236 (GluN2B). Для аминоконцевых доменов подтипов GluN2A и GluN2C эти взаимодействия также имеют место. Однако в случае GluN2A остаток M207 (GluN2B) оказывается заменен на T208, который может конкурировать с гидроксилом фенольной группы лиганда за связывание с Glu236 (GluN2B). В случае GluN2C M207 (GluN2B) оказывается замещен на L202 (GluN2C), что может создать определенные стерические препятствия для вышеупомянутой водородной связи. Следует добавить, что в случае GluN2C имеет место замена F176 (GluN2B) на H171 (GluN2C), что изменяет гидрофобное окружение фенольной группы лиганда на гидрофильное и также может вносить вклад в снижение сродства.

### **2.3. Моделирование молекулярной динамики комплексов ифенпродила с аминоконцевыми доменами GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D**

Метод молекулярной динамики предоставляет возможность наблюдать эволюцию молекулярной системы во времени, рассчитывать термодинамические параметры и позволяет определять структурные параметры системы. В данной работе метод молекулярной динамики применяется для изучения влияния лиганда как на структуру комплексов аминоконцевых доменов NMDA-рецептора GluN1/GluN2X (X= A,B,C,D), так и влияния различных модуляторов АМРА-



рецептора на комплекс лиганд-связывающих доменов GluA2-рецептора. Моделирование молекулярной динамики позволяет в некоторых случаях получить дополнительную информацию, недоступную при использовании методов, оперирующих статическими структурами. При условии наступления равновесия в исследуемой системе данный метод позволяет сгенерировать ансамбль релевантных структур, для которого может производиться расчет и усреднение термодинамических параметров. Особенно эффективен данный метод для изучения растворов, что важно при разработке лекарственных препаратов.

Эволюция молекулярной системы во времени может быть описана решением уравнений классической механики Ньютона. В данной работе использовался метод интегрирования «leapfrog» [186] для решения дифференциальных уравнений, при этом значения координат и скоростей рассчитывают для разных моментов времени. Однако, как известно, для траекторий, полученных при решении уравнений классической механики, должны оставаться неизменными такие интегралы движения, как энергия, импульс и момент импульса. В реальном мире такие траектории могут наблюдаться только для замкнутых систем, которые экспериментально труднодостижимы. Поэтому в современных молекулярно-динамических расчетах в качестве постоянных принято брать температуру системы, объем или давление.

Термостатирование системы может осуществляться несколькими методами. В уравнения движения добавляется член, который налагает ограничения на температуру. В вычислительном плане это реализуется домножением значения скорости каждой частицы на такую постоянную, чтобы средняя кинетическая энергия системы колебалась в узком интервале значений. Различные типы термостатов реализуют разные схемы вычисления коэффициента масштабирования. Следует отметить термостат, предложенный Берендсеном [187]: в этом случае вероятность отклонения температуры системы от фиксированного значения затухает экспоненциально. Данный метод удобен для «нагрева» системы до необходимых значений температуры. В данной работе для поддержания постоянства температуры используется термостат Ланжевена.

Для этого уравнения движения модифицируются таким образом, что из силы, действующей на частицу, вычитается член, линейно зависящий от импульса частицы (имитирует вязкость растворителя), и прибавляется случайное значение силы, подчиняющееся закону нормального распределения с математическим ожиданием, равным нулю, и дисперсией, линейно зависящей от температуры и параметра Ланжевена, значение которого в нашем случае было принято равным 0.1.

Моделирование молекулярной динамики может проводиться либо вместе с растворителем, либо в его отсутствие с использованием моделей неявного растворителя. Первый способ позволяет получить дополнительную информацию о взаимодействии с растворителем, второй способ менее требователен с точки зрения вычислительных мощностей. В данной работе использовался первый из рассмотренных способов с применением периодических граничных условий.

Для поддержания постоянного давления в процессе вычислительного эксперимента использовался баростат. Поддержание постоянства давления требует варьирования других параметров системы, а именно масштабирования расстояний между частицами. Для этого использовали баростат Берендсена [187].

Энергию системы в случае небольших отклонений от равновесных значений геометрических параметров можно описать разложением в ряд Тейлора по значениям внутренних координат системы. При отбрасывании членов порядка выше второго получают общее представление силового поля. В таком представлении энергия системы аддитивна и разлагается на квадратичные вклады от изменения длин связей и валентных углов, а также ван-дер-ваальсовы, электростатические и торсионные компоненты, имеющие более сложную математическую форму. Под силовым полем подразумевается набор числовых параметров, входящих в энергетическую функцию. Силовые поля, как правило, разрабатываются для определенного класса систем (Amber [186] для белков, нуклеотидов, углеводов, липидов; GAFF [186], MMFF94 - для малых органических молекул). В данной работе для белковой компоненты использовалось поле AmberFF12SB, при разработке которого особое внимание

уделено корректному энергетическому ранжированию конформаций основной цепи белка. Для описания органических лигандов использовали силовое поле GAFF.

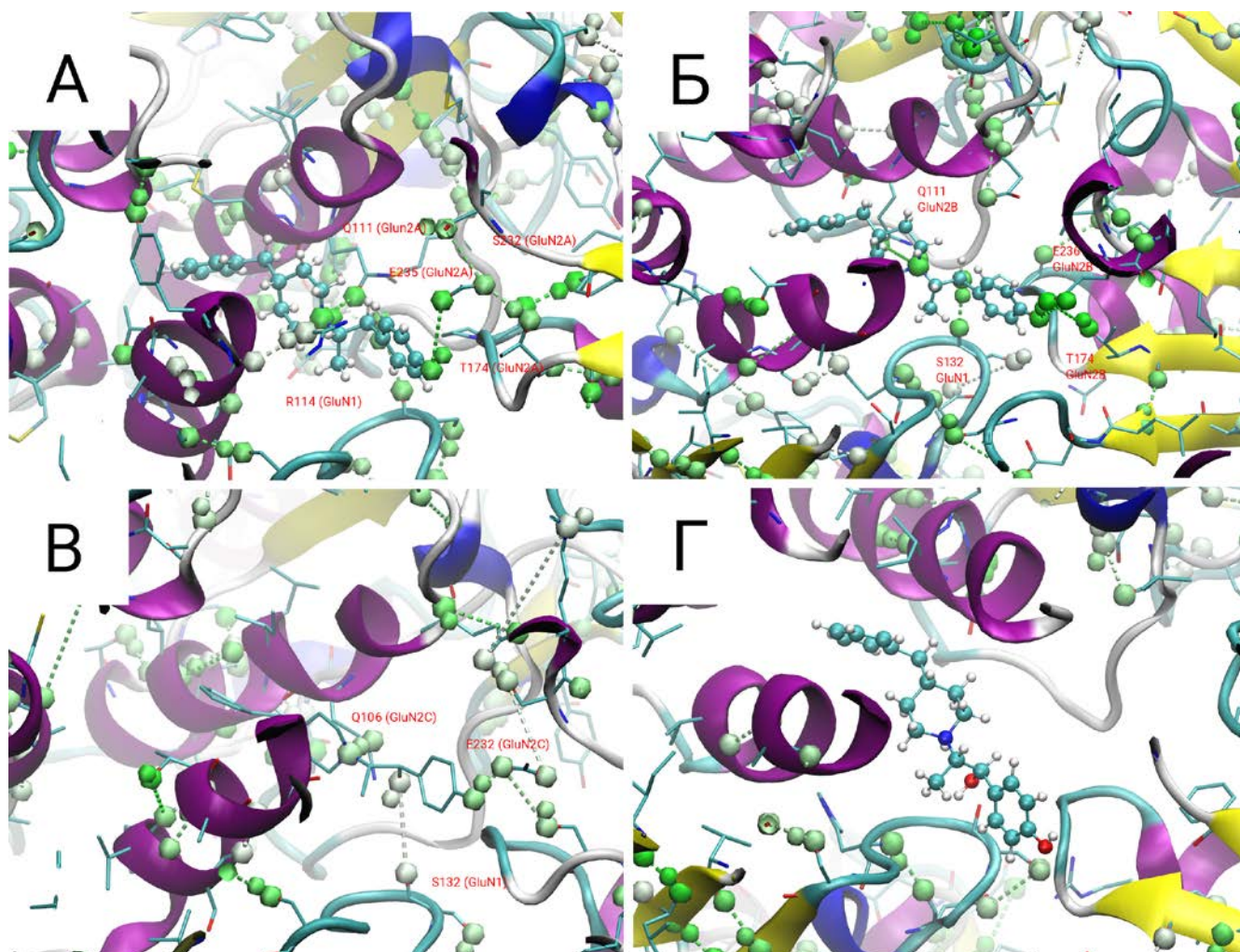


Рисунок 7. Структура сайта связывания ифенпродила для GluN1/GluN2A (А), GluN1/GluN2B (Б), GluN1/GluN2C (В), GluN1/GluN2D (Г). Зелеными сферами обозначены водородные связи между белком и лигандом — чем более интенсивно окрашена сфера, тем дольше существует эта водородная связь в динамике.

Для изучения влияния лиганда на структуру комплексов аминоконцевых доменов GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D было проведено моделирование молекулярной динамики. Аминоконцевые домены глутаматных рецепторов, как и лиганд-связывающие домены, имеют дальнейшее структурное родство с бактериальными периплазматическими белками (Venus Flytrap Domain) [17], которые при связывании агониста меняют конформацию - «закрываются» и, это структурное изменение способствует передаче сигнала через

клеточную мембрану. Данный раздел содержит анализ влияния отрицательного модулятора на динамику аминоконцевых доменов.

На рис. 7 представлены сайты связывания аллостерических модуляторов после проведенной молекулярной динамики. В случае комплекса GluN1/GluN2B, обладающего наибольшим сродством к лигандам такого типа, имеет место наличие трех водородных связей, которые существуют практически на всем протяжении траектории: это водородная связь между карбонильным кислородом Q111 (GluN2B) и протонированной третичной аминогруппой, алифатическим гидроксилом лиганда и карбонильным кислородом основной цепи остатка S132, а также фенольным гидроксилом лиганда и E236 (GluN2B).

Для комплекса с GluN1/GluN2A ситуация похожая — практически все время моделирования сохраняются водородные связи между карбонильным кислородом Gln111 (GluN2A) и протонированной третичной аминогруппой, фенольным гидроксилом лиганда и Glu235 (GluN2A). В случае GluN1/GluN2C взаимодействие лиганд-белок осуществляется сходным образом посредством алифатический гидроксил лиганда — карбонильный атом кислорода остатка S132 (GluN1), фенольный гидроксил — E232. Однако время существования водородной связи между фенольным гидроксилом лиганда и E232 гораздо меньше по сравнению с GluN2B (она рвется в процессе динамики), что может вести к снижению сродства лиганда к комплексу аминоконцевых доменов GluN1/GluN2C. Данный процесс, видимо, вызван наличием более объемного аминокислотного остатка L202 (GluN2C) вместо M207 (GluN2B). Для комплекса с GluN1/GluN2D наблюдается быстрая диффузия лиганда из сайта связывания, водородная связь между фенольным гидроксилом и E254 существует очень недолго, а вместо нее образуется солевой мостик между E254 (GluN2D) и R115 (GluN1). Из таблицы 4 видно, что наиболее подвижным в сайте связывания лиганд становится в комплексе GluN1/GluN2D, что хорошо согласуется с отсутствием сродства к этому рецептору у аналогов ифенпродила. Также достаточно подвижным становится лиганд в комплексе GluN1/GluN2A, что может быть связано со снижением сродства к данному подтипу рецепторов.

Оценка энтальпий связывания выполнялась на основании метода MMPB(GB)SA [188], суть которого заключается в обработке траекторий, полученных по методу молекулярной динамики, и расчета средних значений разности свободной энергии (или энтальпии) между двумя состояниями, обычно это лиганд-связанное и свободное состояние. Расчет энтальпии выполняется методом термодинамического цикла. То есть,

$$\Delta H_{300}^{\circ}(\text{связывания}) = \Delta H_{300}^{\circ}(\text{сольватации комплекса}) - \Delta H_{300}^{\circ}(\text{сольватации лиганда}) - \Delta H_{300}^{\circ}(\text{сольватации рецептора}) + \Delta H_{300}^{\circ}(\text{связывания в вакууме}),$$

где

$$\Delta H_{300}^{\circ}(\text{связывания в вакууме}) = \Delta H_{300}^{\circ}(\text{образования комплекса}) - \Delta H_{300}^{\circ}(\text{образования рецептора}) - \Delta H_{300}^{\circ}(\text{образования лиганда})$$

$\Delta H_{300}^{\circ}(\text{образования})$  оценивается как среднее значение потенциальной энергии структуры в вакууме, рассчитанной методом молекулярной механики. Для каждой структуры суммируются значения энергетических вкладов от изменения длин связей, величин валентных и торсионных углов, ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий. Также в расчет может быть включена оценка величины энтропии комплексообразования для получения значения свободной энергии.

Оценка свободной энергии сольватации проводится либо решением уравнения Пуассона-Больцмана [189], либо с применением существенно менее ресурсоемкой обобщенной модели Борна [190].

Расчет каждой из величин  $\Delta H_{300}^{\circ}(\text{образования комплекса})$ ,  $\Delta H_{300}^{\circ}(\text{образования рецептора})$ ,  $\Delta H_{300}^{\circ}(\text{образования лиганда})$  может основываться как на трех траекториях - для каждой структуры необходима отдельная траектория, так и с применением одной траектории. В данной работе использовался второй подход.

Следует отметить, что в данной работе расчет производился для несколько более сложных по строению комплексов: в частности, в качестве рецептора может выступать белковый комплекс. В таком случае целесообразно рассчитать энергию

образования комплекса, состоящего из 3 частей: мономер рецептора 1, мономер рецептора 2 и лиганд. На рис. 8 приведена схема расчета такой величины. Следует отметить, что программа MMPBSA программного комплекса AMBER14 способна вычислять  $\Delta H^{\circ}_{300}$ (образования комплекса) для комплекса, состоящего из одного рецептора и одного лиганда. Однако, комбинируя термодинамические циклы для диссоциации комплекса димер-лиганд и мономер-мономер, удастся получить искомую величину.

Для рис. 8 Б термодинамический цикл записывается в виде (1):

$$\Delta H^{\circ}_{300}(\text{связывания димера}) = \Delta H^{\circ}_{300}(\text{сольватации димера}) - \Delta H^{\circ}_{300}(\text{сольватации мономера1}) - \Delta H^{\circ}_{300}(\text{сольватации мономера2}) + \Delta H^{\circ}_{300}(\text{димеризации в вакууме}) \quad (1)$$

Для рис. 8 В термодинамический цикл записывается в виде (2)

$$\Delta H^{\circ}_{300}(\text{связывания лиганда димером}) = \Delta H^{\circ}_{300}(\text{сольватации комплекса}) - \Delta H^{\circ}_{300}(\text{сольватации димера}) - \Delta H^{\circ}_{300}(\text{сольватации лиганда}) + \Delta H^{\circ}_{300}(\text{связывания в вакууме}) \quad (2)$$

При этом искомая величина (рис. 8 А) записывается в виде (3):

$$\Delta H^{\circ}_{300}(\text{связывания}) = \Delta H^{\circ}_{300}(\text{сольватации комплекса}) - \Delta H^{\circ}_{300}(\text{сольватации мономера 1}) - \Delta H^{\circ}_{300}(\text{сольватации мономера 2}) - \Delta H^{\circ}_{300}(\text{сольватации лиганда}) + \Delta H^{\circ}_{300}(\text{связывания в вакууме}) + \Delta H^{\circ}_{300}(\text{димеризации в вакууме}) \quad (3)$$

Данная величина может быть получена простым сложением (1) и (2), таким образом, энергия диссоциации комплекса может быть представлена как сумма ступенчатых энергий диссоциаций, рассчитываемых программой MM-PBSA.

Для декомпозиции энергии взаимодействия по остаткам соответствующие атомные вклады суммировали.

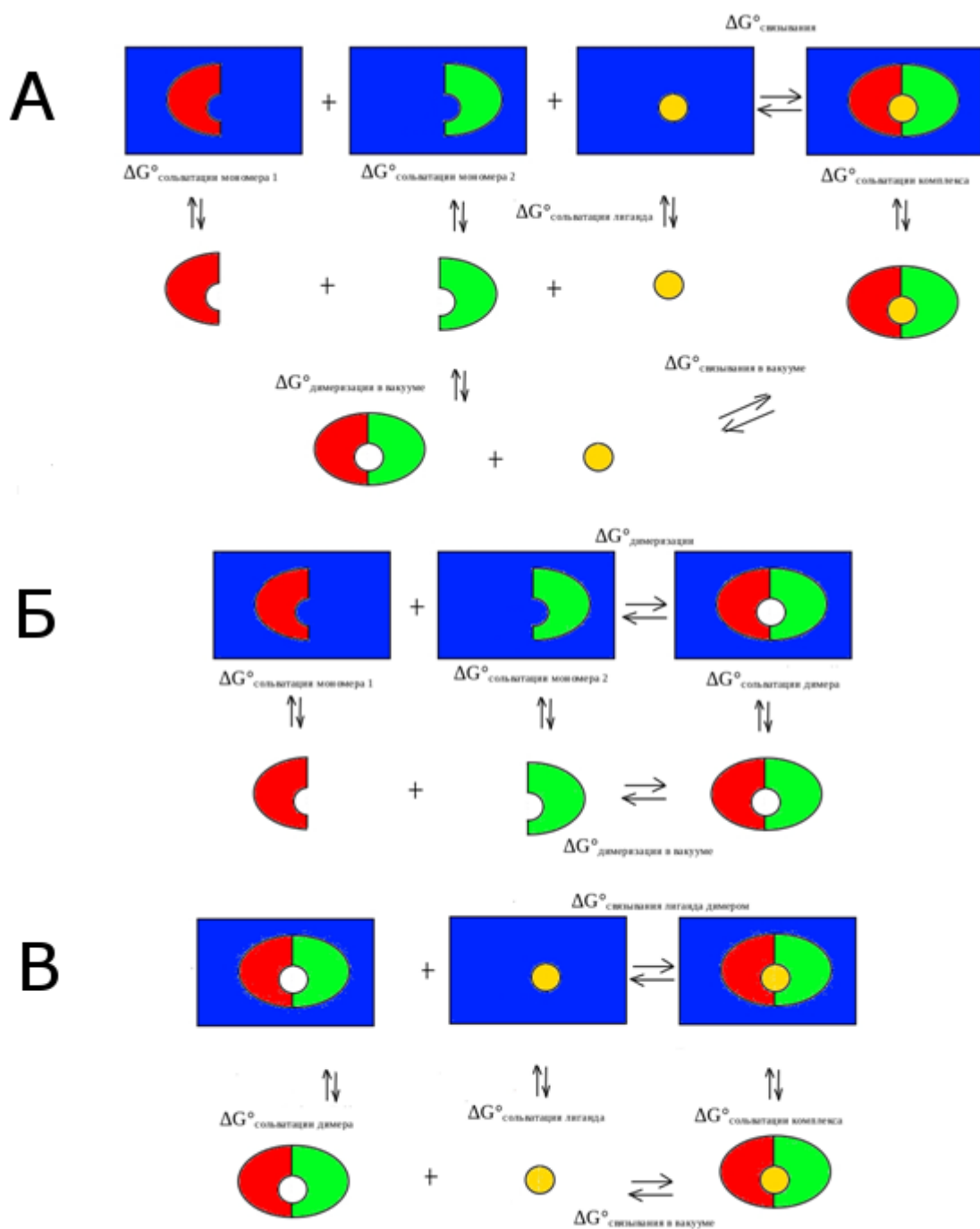


Рисунок 8. Схема расчета энтальпий связывания методом MMPBSA.

В таблице 4 представлены рассчитанные значения энтальпий связывания для ифенпродила методом MM-PBSA и MM-GBSA. Следует отметить, что результаты применения обоих методов качественно хорошо согласуются с известными данными об аффинности лигандов данного типа к различным подтипам NMDA-рецептора: лучше всего лиганды данного типа связываются с

GluN1/GluN2B, несколько хуже с GluN1/GluN2A и GluN1/GluN2C, практически не связываются с GluN1/GluN2D. Особенно интересно значительное понижение энтальпии связывания лиганда для GluN1/GluN2B по сравнению с GluN1/GluN2C и GluN1/GluN2A, что согласуется с экспериментальными данными о константах связывания. Также интересные результаты дает рассмотрение энтальпий связывания комплексов аминоконцевых доменов GluN1 и GluN2X, где X = A,B,C,D в отсутствие лигандов. Комплекс аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B оказывается существенно менее стабильным (в случае учета сольватации методом ММ-PBSA), чем другие комплексы. То есть, высокое значение сродства аналогов ифенпродила к данному подтипу рецепторов может быть в значительной степени обусловлено низкой стабильностью такого комплекса без лиганда.

Таблица 4. Энтальпии связывания ифенпродила в комплексах GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D, рассчитанные методом ММ-PB(GB)SA.

Тип комплекса	Энтальпия связывания лиганда, рассчитанная ММ-GBSA, ккал/моль	Энтальпия связывания лиганда, рассчитанная ММ-PBSA, ккал/моль	Энтальпия связывания димеров в отсутствие лиганда ММ-GBSA, ккал/моль	Энтальпия связывания димеров в отсутствие лиганда ММ-PBSA, ккал/моль	RMSD лиганда в сайте связывания, Å
GluN1/GluN2A	-50.3	-22.9	-82.2	30.1	1.06
GluN1/GluN2B	-53.4	-25.5	-64.3	54.4	0.55
GluN1/GluN2C	-49.3	-12.3	-32.6	44.2	0.59
GluN1/GluN2D	-35.4	11.2	-69.5	39.3	1.48

Для рассмотрения локальных характеристик связывания лиганда в данных комплексах была проведена декомпозиция вкладов аминокислотных остатков в величину энергии связывания. Основной вклад в энергию связывания аминоконцевого домена GluN1-подтипа с лигандом приходится на остатки под



номерами 100-110 и 130-140 (см. рис. 6 и 9), что соответствует поверхности контакта лиганда с белком. Для комплекса GluN1/GluN2C величины этих вкладов

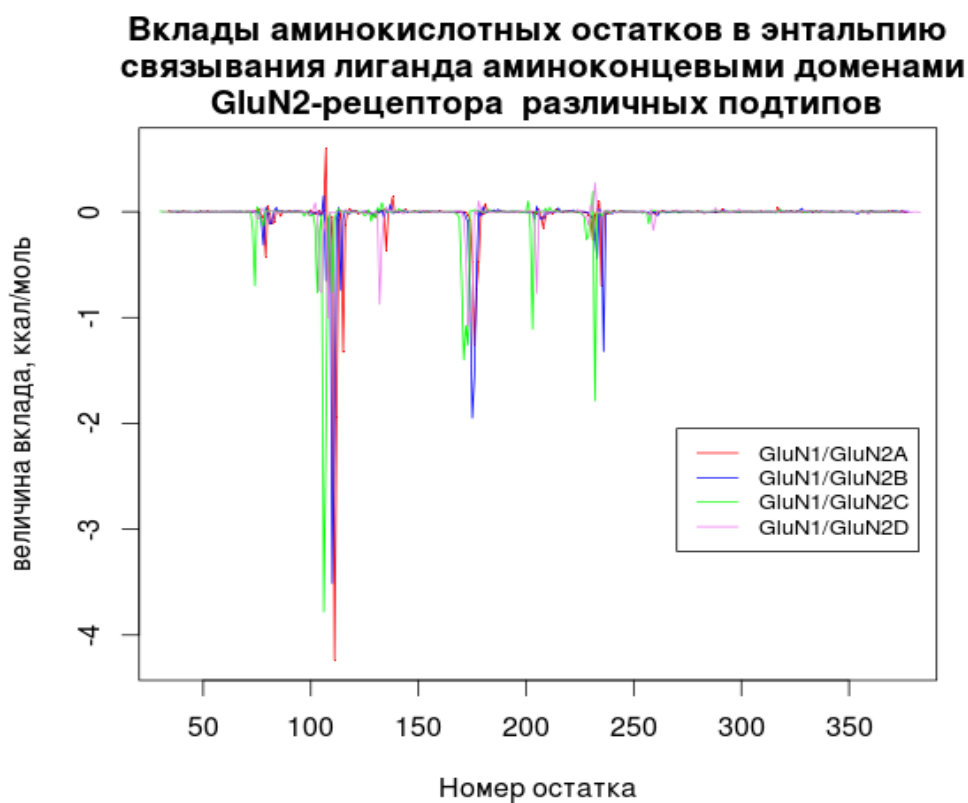
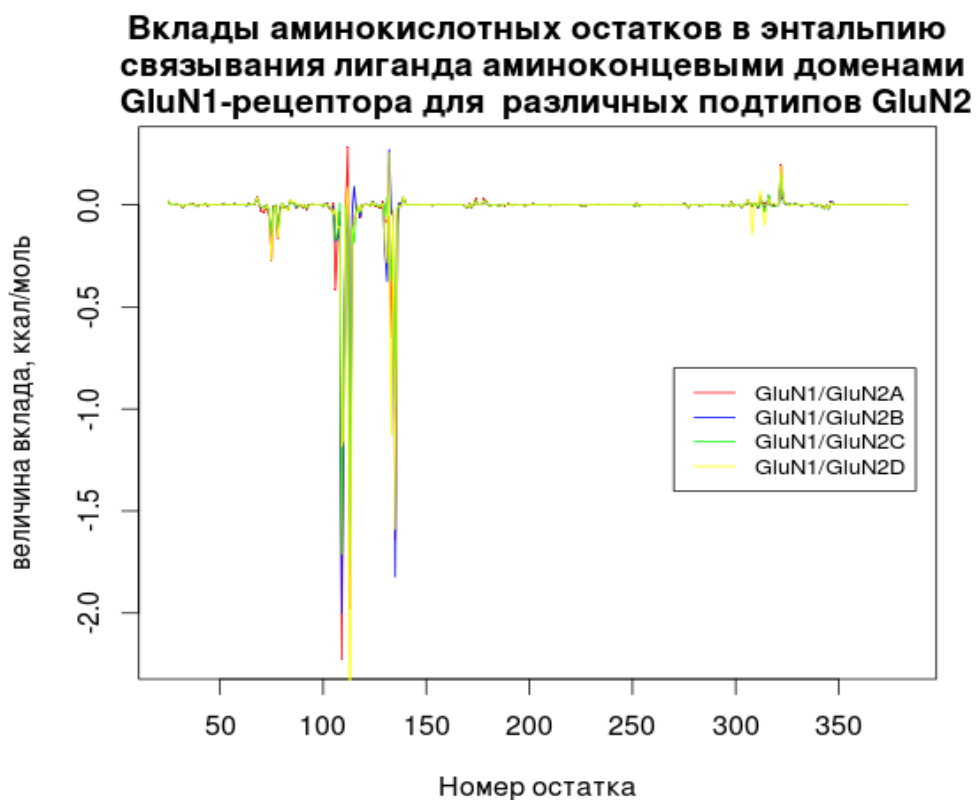


Рисунок 9. Вклады аминокислотных остатков в значение энтальпии связывания ифенпродила.

несколько ниже, чем для остальных подтипов. Следует отметить, что для аминоконцевых доменов GluN2-подтипов основные положительные вклады концентрируются в районе расположения остатков 100—110, 160-170, 235-240. Для GluN2A наблюдается некоторое снижение вкладов от остатков, взаимодействующих с гидроксилом фенольного фрагмента, по сравнению с GluN1/GluN2B. Однако в целом спектр энергетических вкладов достаточно сходен для всех типов комплексов.

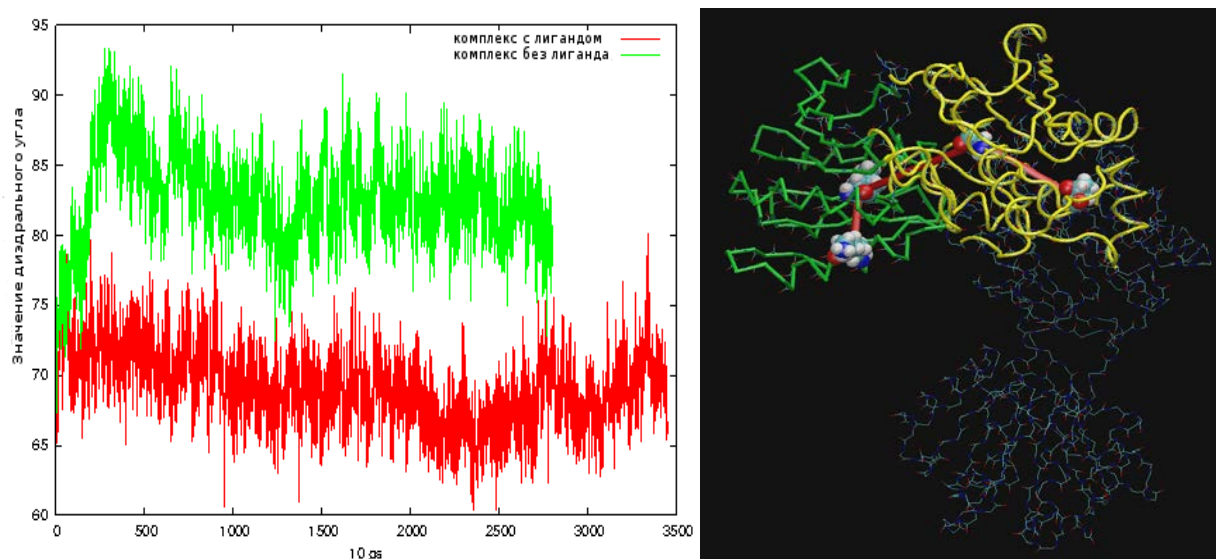


Рисунок 10. (Справа) Изображение двугранного угла между субъединицами аминоконцевого домена GluN2B, отмеченными желтым и зелеными цветами. (Слева) Изменение двугранного угла во времени в отсутствие и в присутствии лиганда.

Судя по известным функциям гомологичных белков, в аминоконцевых доменах могут происходить определенные типы движений: «открытие-закрытие» и вращение долей аминоконцевого домена GluN2X (где X=A, B, C, D) друг относительно друга. При анализе траекторий было обнаружено, что движения типа вращения субъединиц друг относительно друга играют большую роль в подстройке структуры комплекса аминоконцевого домена к лиганду. За изменением двугранного угла между субъединицами вдоль траектории следили по углу между C- $\alpha$  атомами четырёх аминокислот: N184 (1), L229(2), G125(3), T119(4), находящихся в глубине домена и в наименьшей степени подверженных

случайным движениям внешних петель (См. рис. 10, нумерация аминокислот ведется слева направо).

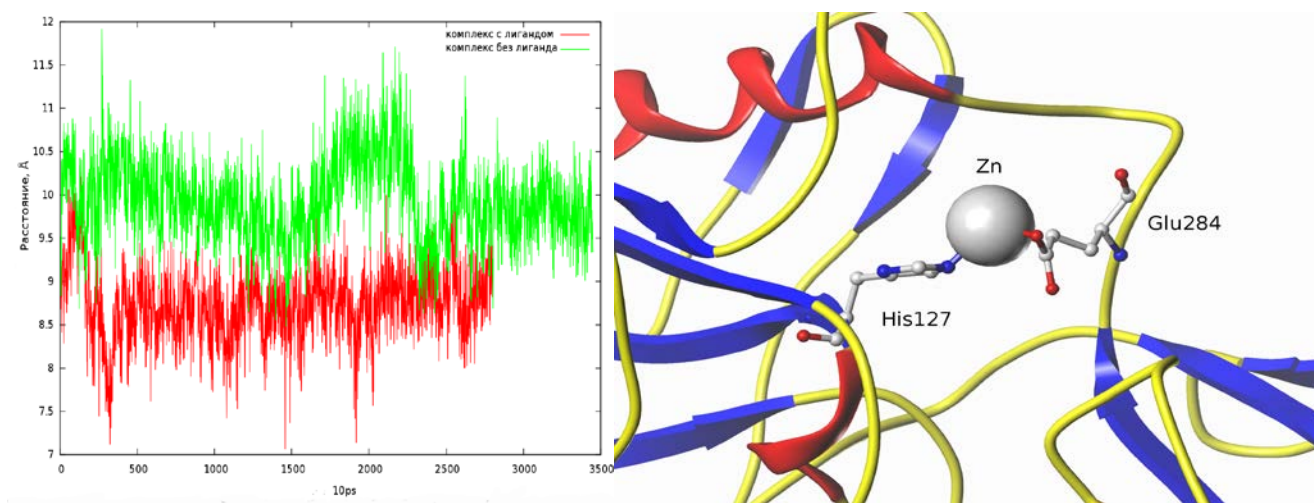


Рисунок 11. Зависимость расстояния между C-α атомами остатков His127 и Glu284 GluN2B субъединицы от времени моделирования, сайт связывания иона цинка на субъединице в аминоконцевом домене GluN2B.

Для субъединиц GluN2B наблюдается небольшой, но значимый разворот субъединиц друг относительно друга при отсутствии лиганда. Данный процесс начинается после снятия ограничений на координаты атомов в процессе приведения системы к равновесию и заканчивается через 3 нс. Из имеющихся данных нельзя сделать однозначное заключение, является ли наблюдаемое явление началом более глобального изменения конформации белка, например «открытия» домена. Также следует отметить, что сайт связывания другого отрицательного аллостерического модулятора - иона  $Zn^{2+}$ , состоящий из остатков H127 и E284, также претерпевает существенные изменения при удалении лиганда, как показано на рис. 11. Это наблюдение хорошо согласуется с данными о том, что сайты связывания цинка и отрицательных модуляторов – аналогов ифенпродила связаны аллостерически [191].

Сайт связывания ифенпродила не является жестким и способен подстраиваться под изменение структуры лиганда (например, в отсутствие лиганда карман связывания фенильной группы оказывается полностью заполнен окружающими аминокислотными остатками, поэтому может быть полезным выявить те области сайта связывания, которые можно использовать для

повышения активности и селективности данного лиганда. На рис. 12 представлен комплекс аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B с лигандом, синим

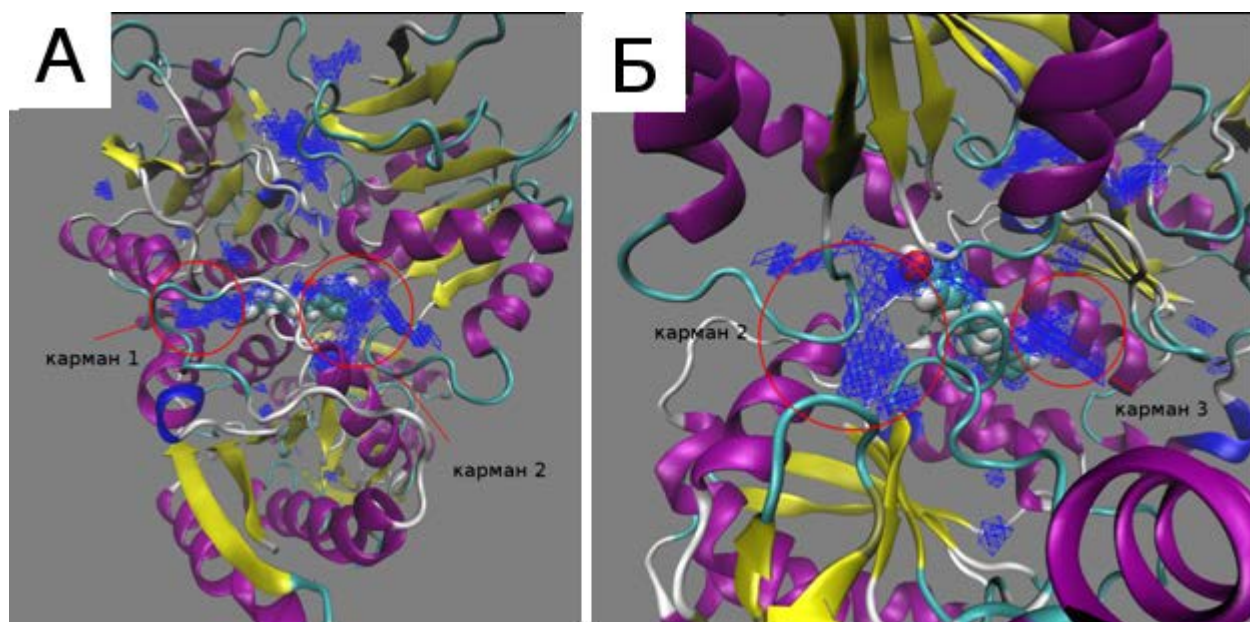


Рисунок 12. Сайт связывания ифенпродила, вид с двух сторон.

цветом обозначена поверхность, ограничивающая объем кармана связывания, существующего, как минимум, 50% времени моделирования динамики. Следует отметить 3 интересных области, которые не заняты аллостерическим модулятором. Во-первых, это карман 1, который расположен рядом с областью, занимаемой фенильной группой лиганда. Форма кармана такова, что там способен связываться фенильный фрагмент с необъемными заместителями в положениях 3 и 4, что согласуется с литературными данными об активных лигандах, содержащих 3,4-дихлорфенильный фрагмент. Во-вторых, карман 2, видный с разных ракурсов на рис. 12 А и Б, расположен в области связывания фенольного гидроксила лиганда. Релевантность данного кармана подтверждается успехом замены гидроксила на объемную метилсульфонамидную группу. В-третьих, это карман 3 (рис. 12 Б), который находится рядом с линкером, соединяющим фенильный фрагмент и пиперидинильный фрагмент лиганда, и образованный остатками Tyr109 (GluN1) и Asp113 (GluN2B).

Изменения в сайте связывания лиганда после его удаления можно наблюдать на рис. 13. Карманы 1 и 3 (рис. 12) оказываются полностью заполнены боковыми цепями остатков, образующих данные карманы. В то же время карман,

находящийся внутри аминоконцевого домена GluN2B, участвующий в родственных белках в связывании глутамата (метаботропные глутаматные рецепторы), увеличивается в размерах, что может свидетельствовать об увеличении степени открытия или поворота в данном домене. Также в районе петли, состоящей из аминокислотных остатков с 208 по 214 (GluN2B), о которой уже упоминалось как о кандидате на роль структурного элемента, отвечающего за высокую аффинность ифенпродила и его аналогов к NMDA-рецептору подтипа GluN1/GluN2B, наблюдается расширение кармана связывания лиганда, что также можно интерпретировать как повышение степени открытия и/или поворот субъединиц аминоконцевого домена GluN2B друг относительно друга.

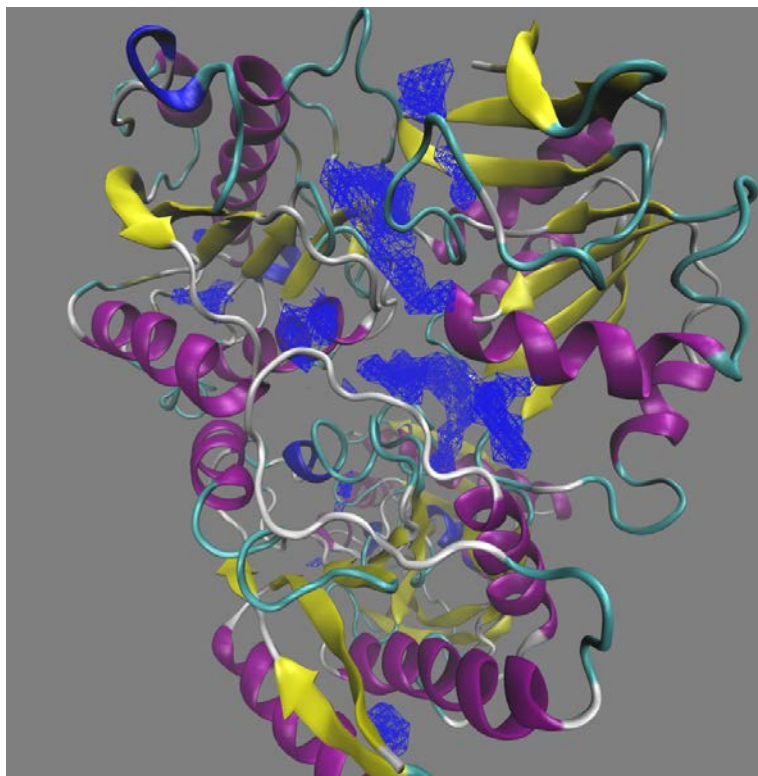


Рисунок 13. Изменения в кармане связывания ифенпродила, происходящие на поверхности контакта GluN1/GluN2B при удалении лиганда.

Приведенные данные позволяют высказать предположения о локальной роли отрицательных аллостерических модуляторов, связывающихся с аминоконцевыми доменами NMDA-рецептора. Характер движений, выявленных при анализе молекулярно-динамических траекторий, позволяет сделать вывод о нестабильности поверхности контакта GluN1/GluN2B, роль лиганда состоит в «достройке» этой поверхности для лучшего контакта между двумя доменами. Эта

гипотеза схематично проиллюстрирована на рис. 14. При удалении лиганда происходит движение субъединиц аминоконцевого движения GluN2B, включающее в себя вращение субъединиц друг относительно друга.

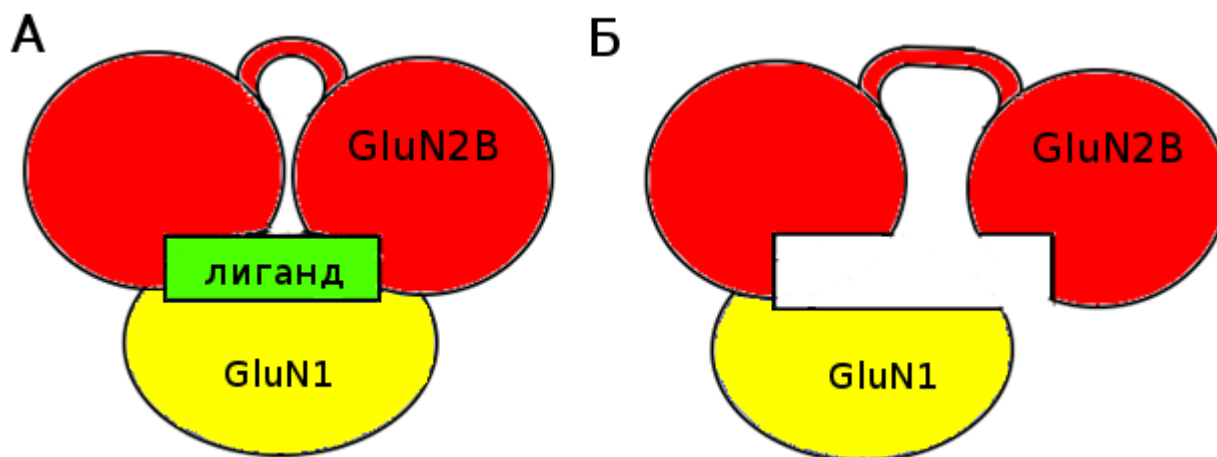
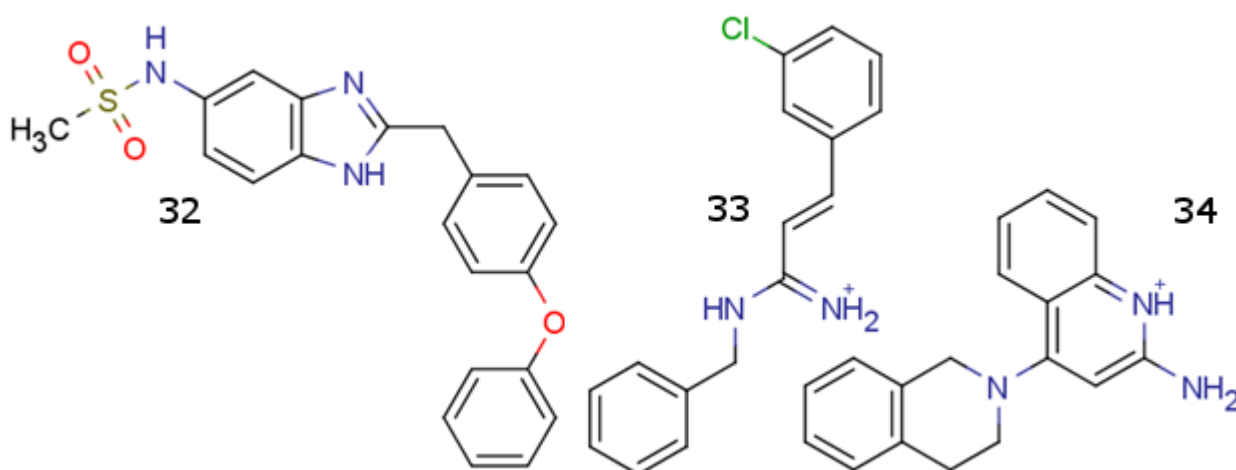


Рисунок 14. Схема действия отрицательных модуляторов, связывающихся с аминоконцевыми доменами NMDA-рецептора. (А) – GluN1/GluN2B в комплексе с лигандом, (Б) – GluN1/GluN2B без лиганда.

#### 2.4. Докинг отрицательных аллостерических модуляторов, связывающихся в аминоконцевом домене

В литературе описано несколько различных классов лигандов, действующих на аминоконцевые домены NMDA-рецептора. Следует отметить, что высокая подвижность сайта связывания отрицательных модуляторов, возможность существования других аллостерических сайтов, выполняющих сходную функцию



и аллостерически связанных с сайтом связывания ифенпродила (сайт связывания иона  $Zn^{2+}$ ), а также скудность структурных данных о способах связывания лигандов такого типа делает задачу докинга весьма нетривиальной. Докинг производился для базы лигандов, включающей 194 структуры [161,192-199]

Докинг отрицательных модуляторов проводили только в комплекс аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B, так как структуры комплексов GluN1/GluN2X (X = A, C, D), скорее всего, могут от него отличаться, как показано в предыдущей главе. Все известные лиганды можно разделить на три группы по найденному способу связывания с рецептором, представляют каждую из этих групп структуры **32**, **33**, **34**.

К лигандам первой группы следует отнести модуляторы, которые обладают сходным с ифенпродилом способом связывания, такие, как соединение **32**. Структуры лигандов, относящихся к данной группе, оказываются достаточно вытянутыми. При этом во всех случаях докинга гидрофобный карман P78 (GluN2B), A107 (GluN1), Y109 (GluN1), T110 (GluN1) оказывается занят фенильным фрагментом, замещенным в мета- или пара- положениях (карман 1, рис. 12). Для лигандов этой группы характерно образование водородной связи с E236 в районе кармана 2 (рис. 12), в частности, такую водородную связь образует кислый атом водорода сульфамидной группы 1,3-бензимидазольного фрагмента лиганда **32** (рис. 15). В некоторых случаях имеет место образование водородной связи с атомами боковой цепи остатка Q110 (например, для самого ифенпродила), однако, судя по результатам докинга, это не обязательно для высокоаффинного связывания. Следует отметить также наличие водородной связи с карбонилем основной цепи остатка Ser132.

Ко второй группе лигандов следует отнести структуры замещенных стириламидинов, характерным представителем данного класса веществ является соединение **33** (рис. 16). Несмотря на возможность принятия вытянутой конформации, анализ результатов докинга убедительно демонстрирует, что данные лиганды имеют существенно отличный от первой группы способ связывания. Бензильный фрагмент лиганда связывается аналогично фенильному





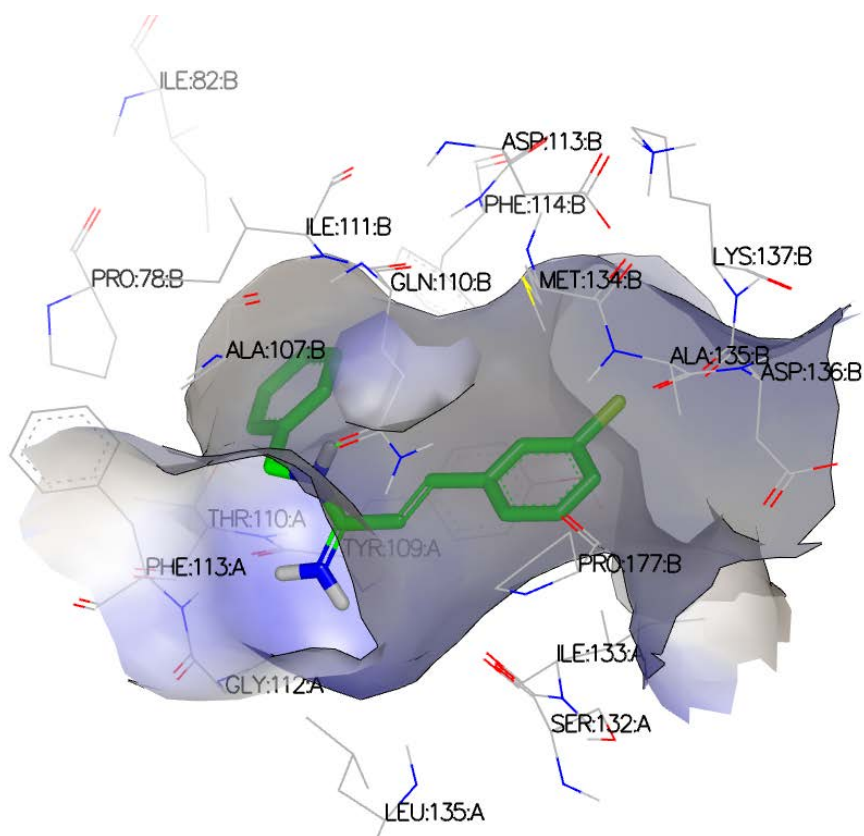


Рисунок 16. Результаты докинга лиганда **33**, относящегося ко второй группе отрицательных аллостерических модуляторов аминоконцевых доменов NMDA-рецептора.

Другой ароматический гетероциклический фрагмент оказывается вовлечен в стекинг-взаимодействия с Y109 (GluN1). При этом для средства лигандов такого типа большую роль играет основность атома азота, входящего в гетероциклический фрагмент. Чем она выше, тем с большей вероятностью этот фрагмент окажется заряжен, что будет способствовать увеличению сродства этого фрагмента к ароматическому фрагменту боковой цепи Y109 (GluN1) и повышению аффинности лиганда в целом.

## 2.5. Особенности гидратации сайта связывания модуляторов

Исследование стабильности положения молекул воды в сайтах связывания лигандов приносит существенную пользу как для дизайна новых структур модуляторов, так и для повышения аффинности лигандов с уже известными скаффолдами. Определение местоположения молекул воды в сайте связывания лиганда осуществляется на основании анализа решения уравнения Пуассона-Больцмана в программе SZMAP [200].

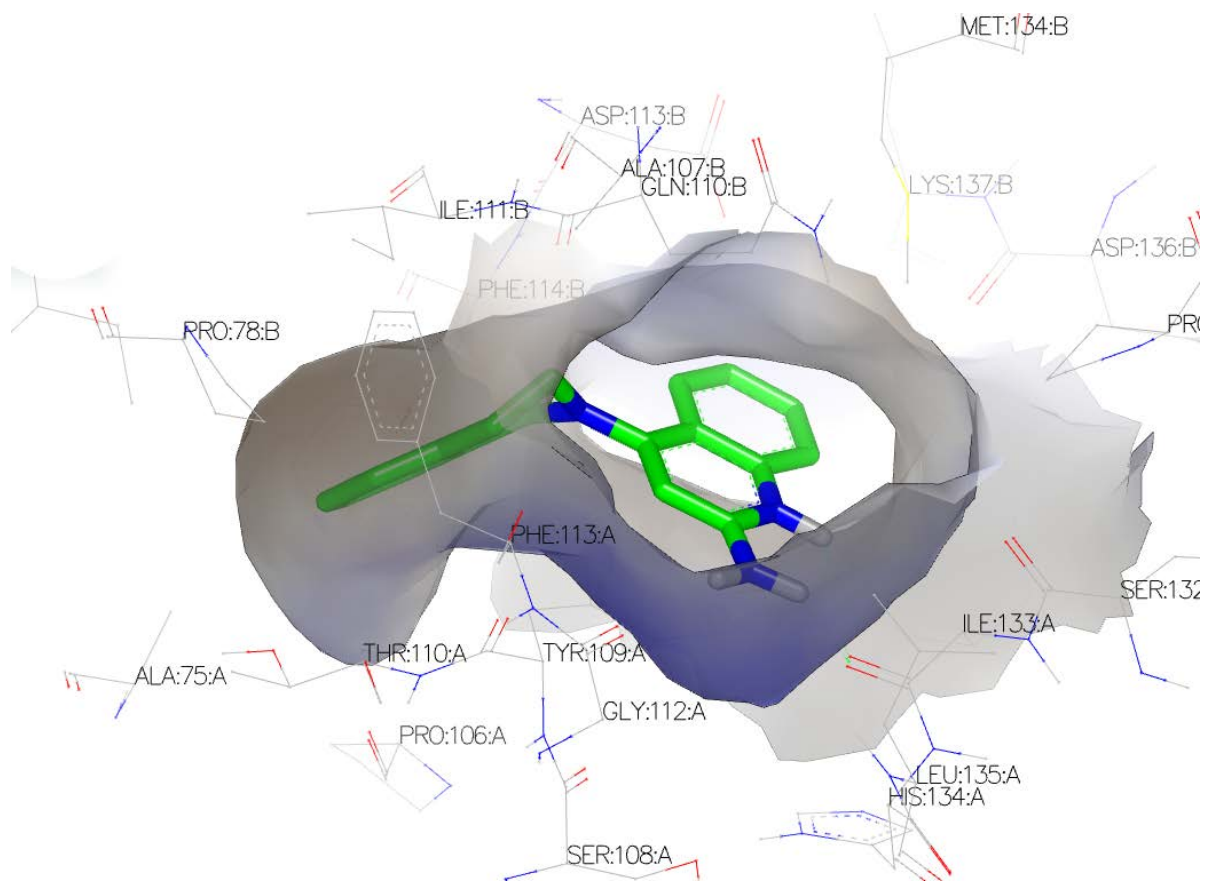


Рисунок 17. Результаты докинга лиганда **34**, относящегося к третьей группе отрицательных модуляторов NMDA-рецепторов.

На рис. 18 представлены карты выгодного и невыгодного расположения молекул воды в сайте связывания отрицательных модуляторов. Следует отметить, что карманы 1 и 3 оказываются в значительной степени невыгодными для заполнения молекулами воды, что хорошо согласуется с результатами докинга лигандов второй и третьей группы, а также с тем фактом, что в процессе моделирования молекулярной динамики эти карманы исчезают. В то же время пространство, ограниченное остатками E106 (GluN2B) и R115 (GluN1) может быть легко занято молекулами воды, поэтому все конформации лигандов, полученные в результате докинга представителей трех групп и заполняющие эту область, рассматривались лишь в том случае, если электростатические свойства и поляризуемость заполняющей группы была сходна с таковыми для молекулы воды (карбоксил, амид). Также с большой вероятностью молекула воды находится рядом с фенольным гидроксилом молекулы лиганда, взаимодействуя с амидами



боковых цепей M207 и Y175. По-видимому, замена гидроксила в фенольном фрагменте на метилсульфамидную группу как раз ведет к вытеснению этой молекулы и некоторому выигрышу в свободной энергии.

## 2.6. Построение моделей CoMFA для лигандов аминоконцевых доменов

Построение моделей 3D-QSAR проводилось методом сравнительного анализа молекулярного поля (CoMFA) [201]. Наложение проводилось по результатам докинга, если отсутствовали экспериментальные данные о пространственных структурах комплексов белок/лиганд, и осуществлялось за счет наложения структур комплексов по атомам основной цепи белка, при этом заранее проводилась оптимизация структуры комплекса в силовом поле TRIPOS [202]. Вокруг наложенных лигандов рассчитывается электростатический и стерический потенциалы на решетке. Так как количество рассчитываемых дескрипторов, как правило, очень велико, используется метод PLS (частичных наименьших квадратов). Моделирование проводилось в программном комплексе SYBYL X 1.3. Для оценки качества построенных моделей использовали параметр перекрестного контроля ( $q^2$ ), для расчета которого производилось случайное разбиение выборки лигандов на 10 групп, расчет активности для каждой из групп по модели, построенной по 9 остальным группам, и усреднение полученных значений.

Также был осуществлен подбор зарядовой схемы для получения модели с максимальной предсказательной силой. Использовались встроенные в SYBYL схемы: Гастайгера-Хюккеля, Гастайгера [203], Дель Ре [204], Пюльман [205], MMFF94 [206], а также формальная зарядовая схема. Для построения модели CoMFA использовались стандартные параметры: шаг расчета потенциала на решетке 2.0 Å, ван-дер-ваальсов потенциал рассчитывался в силовом поле TRIPOS, порог стерической и электростатической энергии был выбран равным 30 ккал/моль. Оптимальное число компонент выбиралось таким образом, чтобы максимизировать значение  $q^2$ .

В данном разделе представлены результаты построения моделей 3D QSAR. Для наложения структур лигандов использовали конформации, полученные в результате докинга. Данный подход дает определенные преимущества: возможность наложения лигандов различных классов и возможность использования данной модели для постпроцессинга результатов виртуального

Таблица 5. Данные о построенных моделях 3D QSAR для отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора.

Номер модели	Включенные в выборку данные	Схема расчета атомных зарядов	$r^2$	$q^2$	Число компонент
1	Первая группа лигандов (66 структур)	Гастайгер	0.39	-0.014	2
2		Гастайгер-Хюккель	0.498	0.006	3
3		Дель Ре	0.416	-0.065	2
4		Пюльман	0.636	0.167	3
5		ММФФ94	0.949	0.185	8
6	Вторая группа лигандов (53 структуры)	Гастайгер	0.87	0.34	5
7		Гастайгер-Хюккель	0.7	0.15	3
8		Дель Ре	0.94	0.39	6
9		Пюльман	0.88	0.34	5
10		ММФФ94	0.97	0.54	6
11	Третья группа лигандов (75 структур)	Гастайгер	0.69	0.19	3
12		Гастайгер-Хюккель	0.62	0.20	3
13		Дель Ре	0.68	0.17	3
14		Пюльман	0.62	0.21	3
15		ММФФ94	0.69	0.15	3
16	Третья группа лигандов (75 структур, добавлен дополнительный дескриптор - рК <sub>b</sub> )	Гастайгер	0.93	0.50	5
17		Гастайгер-Хюккель	0.87	0.47	4
18		Дель Ре	0.89	0.47	4
19		Пюльман	0.90	0.47	5
20		ММФФ94	0.87	0.47	4

скрининга баз органических соединений. В то же время наложения получаются существенно менее экономичными с точки зрения занимаемого пространства, что может повлиять на качество модели. В таблице 5 представлены данные о построенных моделях и их предсказательной способности.

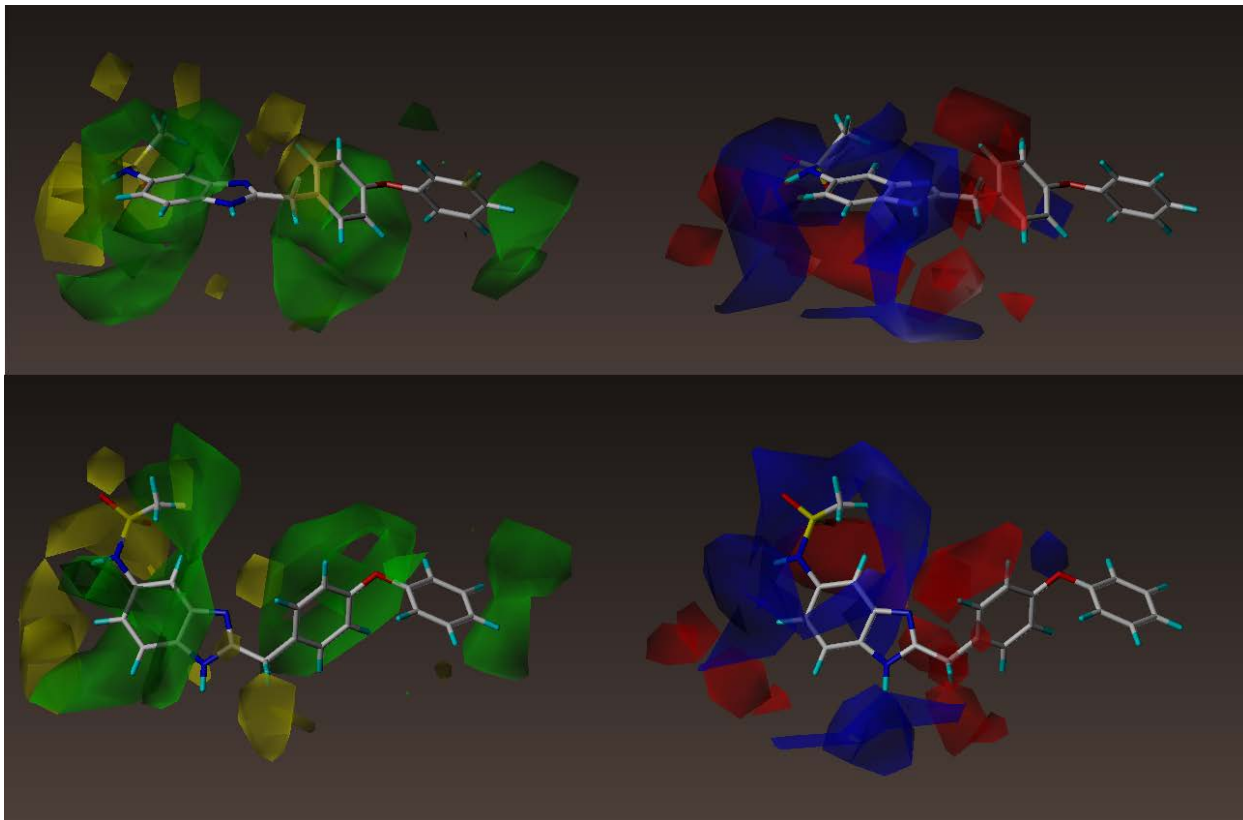


Рисунок 19. Карты стерического и электростатического потенциала лигандов первой группы (изображено соединение **32**). Желтым и зеленым цветом обозначены области неблагоприятного и благоприятного стерического взаимодействия, соответственно. Синим и красным обозначены благоприятные области для положительного и отрицательного зарядов, соответственно.

Для лигандов первой группы не удалось добиться построения модели CoMFA с хорошей предсказательной способностью. Видимо, это происходит вследствие небольшого диапазона изменения исходных данных (менее трех логарифмических единиц) и большого количества возможных локальных изменений конформаций комплексов белок/лиганд в результатах докинга. Наилучшей в этом случае является модель, использующая зарядовую схему MMFF94, при этом наблюдается очень высокий коэффициент корреляции  $r^2$  за счет большого числа компонент, включенных в модель.

Наибольший вклад в предсказанное значение константы связывания вносит электростатический потенциал. Следует отметить, что электростатический вклад от замещенной фенильной группы, связывающейся в кармане 1, оказывается практически нулевым, поле стерического потенциала правильно отражает форму кармана. Наибольшие по амплитуде вклады положительного заряда расположены в районе протонированного атома азота бензимидазольного фрагмента лиганда и сульфамидного фрагмента, что соответствует взаимодействиям с карбонилем основной цепи L133 (GluN1) и E236 (GluN2B).

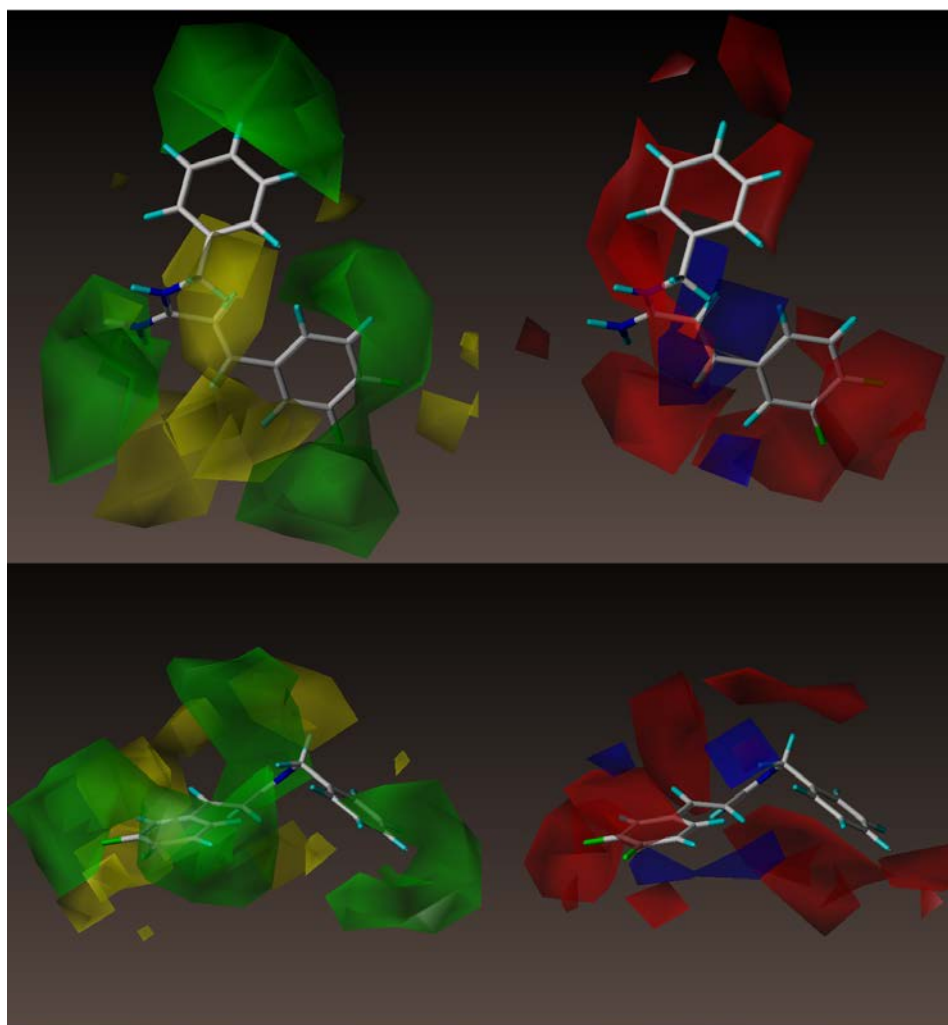


Рисунок 20. Карты влияния стерического и электростатического потенциала лигандов второй группы (изображено соединение **33**). Желтым и зеленым цветами обозначены области неблагоприятного и благоприятного стерического взаимодействия, соответственно. Синим и красным обозначены благоприятные области для положительного и отрицательного зарядов, соответственно.

Для лигандов второй группы удастся построить модели с очень хорошими значениями параметра перекрестного контроля. Оптимальная модель строится

также на основании зарядовой схемы MMFF94, при этом значение  $q^2$  оказывается равным 0.54, что является хорошим результатом для данного метода.

Области благоприятного стерического потенциала в данной модели (рис. 20) хорошо повторяют форму карманов 1 и 3. При этом наибольший вклад в значение предсказанной константы связывания вносит величина положительного заряда в районе амидинового фрагмента рядом с ароматическим фрагментом боковой цепи остатка Y109 (GluN1), то есть данный вклад можно интерпретировать как  $\pi$ -катионное взаимодействие с остатком Y109.

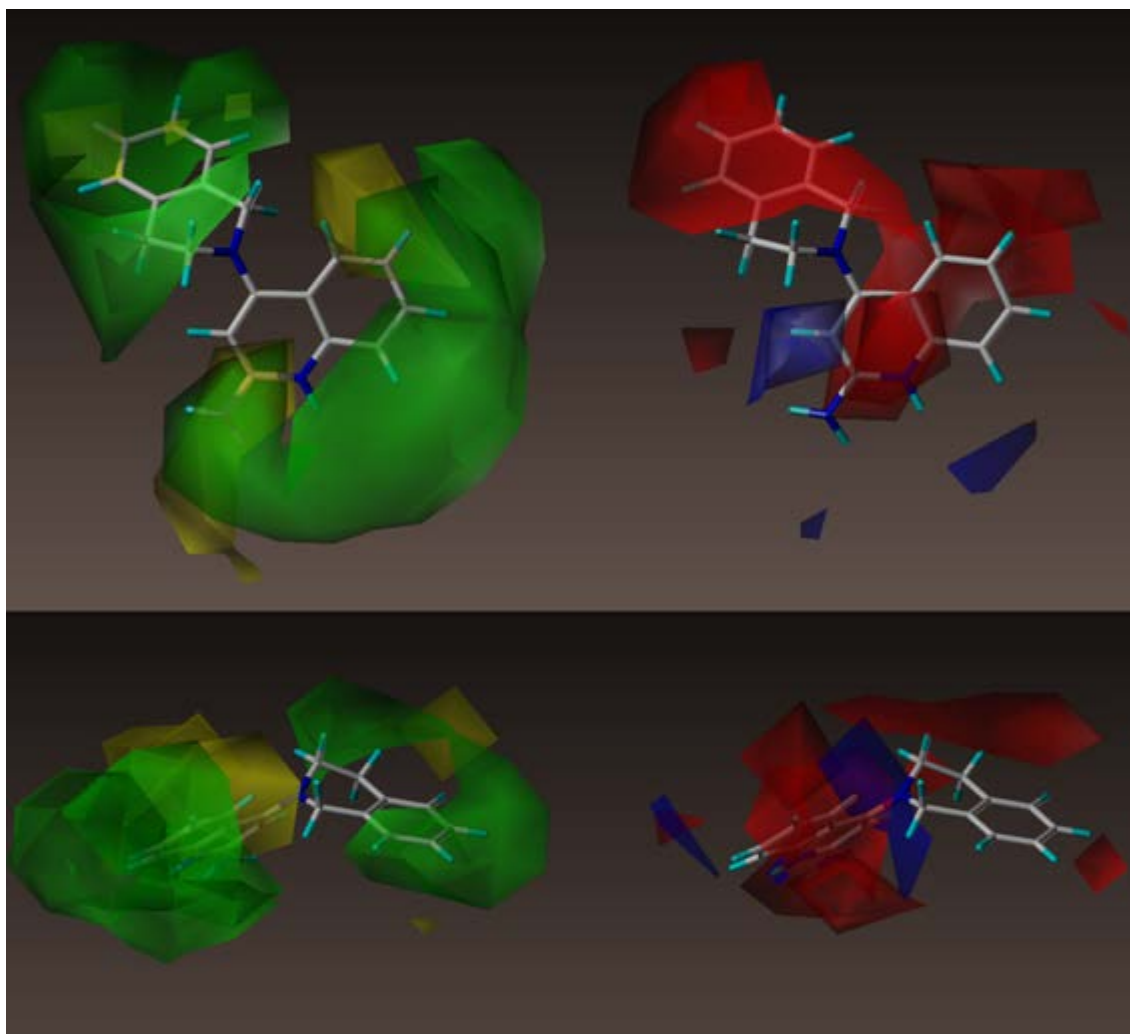


Рисунок 21. Карты влияния стерического и электростатического потенциалов лигандов третьей группы (соединение **34**). Желтым и зеленым цветом обозначены области неблагоприятного и благоприятного стерического взаимодействия. Синим и красным обозначены благоприятные области для положительного и отрицательного зарядов, соответственно.

Для лигандов третьей группы качество построенных моделей находится на промежуточном уровне между качеством моделей для первой и второй групп. С



одной стороны, конформации наиболее высокооцениваемых комплексов, полученные в результате докинга, однозначны. С другой стороны, в отличие от лигандов второй группы, которые вследствие высокой основности оказываются полностью протонированными в водной среде, константы основности лигандов третьей группы могут в значительной степени меняться в зависимости от типа и расположения заместителей в ароматическом кольце. Введение дополнительного дескриптора, равного отрицательному логарифму константы основности, позволяет существенно увеличить значения параметра перекрестного контроля. Наилучшей оказывается модель, использующая зарядовую схему Гастайгера для расчета электростатического потенциала.

В этой модели наибольшее значение имеют вклады положительного заряда. Следует также отметить, что форма областей, где желателен положительный заряд также сходна для лигандов второй и третьей группы, что соответствует стеккинг-взаимодействию с остатком Y109 (GluN1). Для совместной выборки лигандов также строились модели с использованием различных зарядовых схем, однако качество моделей оставалось на уровне моделей для первой группы.

Таким образом, несмотря на то, что для некоторых типов лигандов удается построить качественные модели 3D-QSAR, их область применимости ограничена лишь частью сайта связывания отрицательных модуляторов и не может быть использована для постпроцессинга результатов виртуального скрининга. Однако можно сделать несколько полезных выводов об основных взаимодействиях, влияющих на константу связывания. Во-первых, заполнение кармана 1 (рис. 12) требуется для стабилизации структуры комплекса лиганд-связывающих доменов. Во-вторых, сильный вклад в константу связывания вносят взаимодействия с остатком Y109 (GluN1). Такие качественные представления были использованы для анализа результатов виртуального скрининга библиотек органических соединений.

## **2.7. Виртуальный скрининг баз данных органических соединений**

Виртуальный скрининг используется в современной медицинской химии как вспомогательный метод на самом раннем этапе разработки лекарственных препаратов – идентификации активных соединений [207]. Данный подход не может заменить высокопроизводительный скрининг в полном объеме, но позволяет сделать его более экономичным. При наличии априорной информации о структурах лигандов или мишени данный подход позволяет повысить вероятность идентификации активного соединения до 10 раз.

Наиболее широко используемые стратегии виртуального скрининга основаны на методах фармакофорного поиска или докинга. При этом не последнюю роль в выборе алгоритма играет соотношение вычислительная сложность / точность расчета. Для виртуального скрининга применяют библиотеки соединений, содержащие миллионы структур, поэтому выбор метода докинга может играть определяющую роль для успеха проекта.

В данной работе для проведения виртуального скрининга методом докинга использовали программу FRED (Fast Rigid Exhaustive Docking) [208]. С одной стороны, данная программа демонстрирует хорошие результаты для факторов обогащения по сравнению с другими программами [209], а с другой стороны она обеспечивает высокую скорость фильтрации структур. Такое повышение скорости работы программы достигается за счет предварительной генерации библиотеки конформеров. Важно отметить, что при использовании данной программы имеется возможность установки ограничений на структуру лиганд-рецепторного комплекса: наличие атомов определенного типа в некоторых областях структуры комплекса и образование водородных связей с определенными аминокислотными остатками. В случае отсутствия необходимых взаимодействий переход к докингу следующей структуры происходит на ранних этапах, поэтому данная методология также обеспечивает ускорение процесса. Генерация конформеров осуществляется программой OMEGA2 [210].

Для фармакофорного поиска использовали программу vROCS [211]. Данная программа использует критерии отбора, основанные на сходстве формы молекул и положения определенных фармакофорных элементов. Важным преимуществом

программы является использование библиотек заранее сгенерированных конформеров. Следует отметить, что в данной программе есть возможность использования графических процессоров для ускорения вычислений.

В целях экономии вычислительных ресурсов при докинге программой FRED структура белка остается неподвижной, поэтому выбор оптимальной начальной конформации боковых цепей может стать критичным для успешной реализации проекта. К сожалению, все структуры комплексов аминоконцевых доменов имеют относительно низкое разрешение (таблица 1). Наилучшее разрешение имеет структура с кодом PDB 3QEL, равное 2.6 Å, что не позволяет с высокой вероятностью определить положения молекул воды. В данной структуре присутствуют следующие важные лиганд-белковые взаимодействия: гидрофобное между фрагментом фенила молекулы лиганда и гидрофобными аминокислотами, водородные связи между заряженной третичной аминогруппой и Q110 (GluN2B), а также фенольным гидроксилем и Glu236. Судя по результатам докинга (раздел 2.4) определяющую роль в связывании играет гидрофобное связывание фенила. Было проведено сравнение результатов виртуального скрининга активных и неактивных соединений с ограничением на обязательное присутствие ароматического фрагмента в кармане 1 и без этого ограничения. Геометрия комплексов для структур 3QEL и 3QEK также воспроизводится с достаточной точностью программой FRED (RMSD < 1.5 Å).

Для оценки результатов докинга использовались оценочные функции Chemgauss4 [212], Chemgauss3 [213], PLP [214], OEChemscore [214], Shapegauss [215], имеющиеся в программе FRED. Оценка полученных комплексов проводилась также с помощью функций Chemscore [216], G\_score [217], D\_score [218] и PMF\_score [219] из программы Sybyl X 1.3 [220].

## **2.8. Построение фармакофорной гипотезы**

Генерацию структуры фармакофора можно осуществить несколькими способами. Можно наложить структуры различных лигандов таким образом, чтобы оказались совмещены априорно важные фармакофорные элементы и

перекрывание структур молекул было максимальным. При этом важно, чтобы лиганды занимали один и тот же сайт связывания. В случае рассмотренных комплексов аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B структуры многих лигандов перекрываются лишь частично. При наличии достаточного количества известных кристаллических структур можно произвести их наложение по аминокислотным остаткам и автоматически получить фармакофорную гипотезу, но в данном случае это невозможно выполнить из-за недостаточного разнообразия кристаллических структур. Таким образом, было решено получить фармакофор наложением структур в конформациях, полученных по результатам докинга, выбирая из каждой группы лигандов по 2-3 структуры, при этом основным критерием отбора структур была взята не активность соединения, а однозначность конформации, полученной в результате докинга. Два лучших фармакофора, построенных из структур 35-42, представлены на рис. 22.

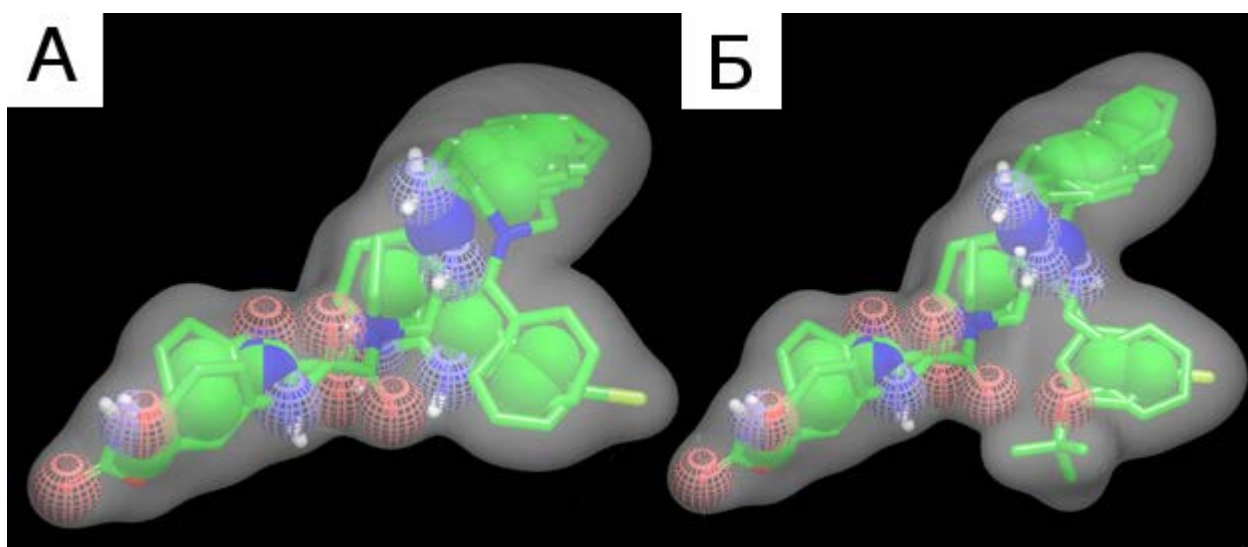
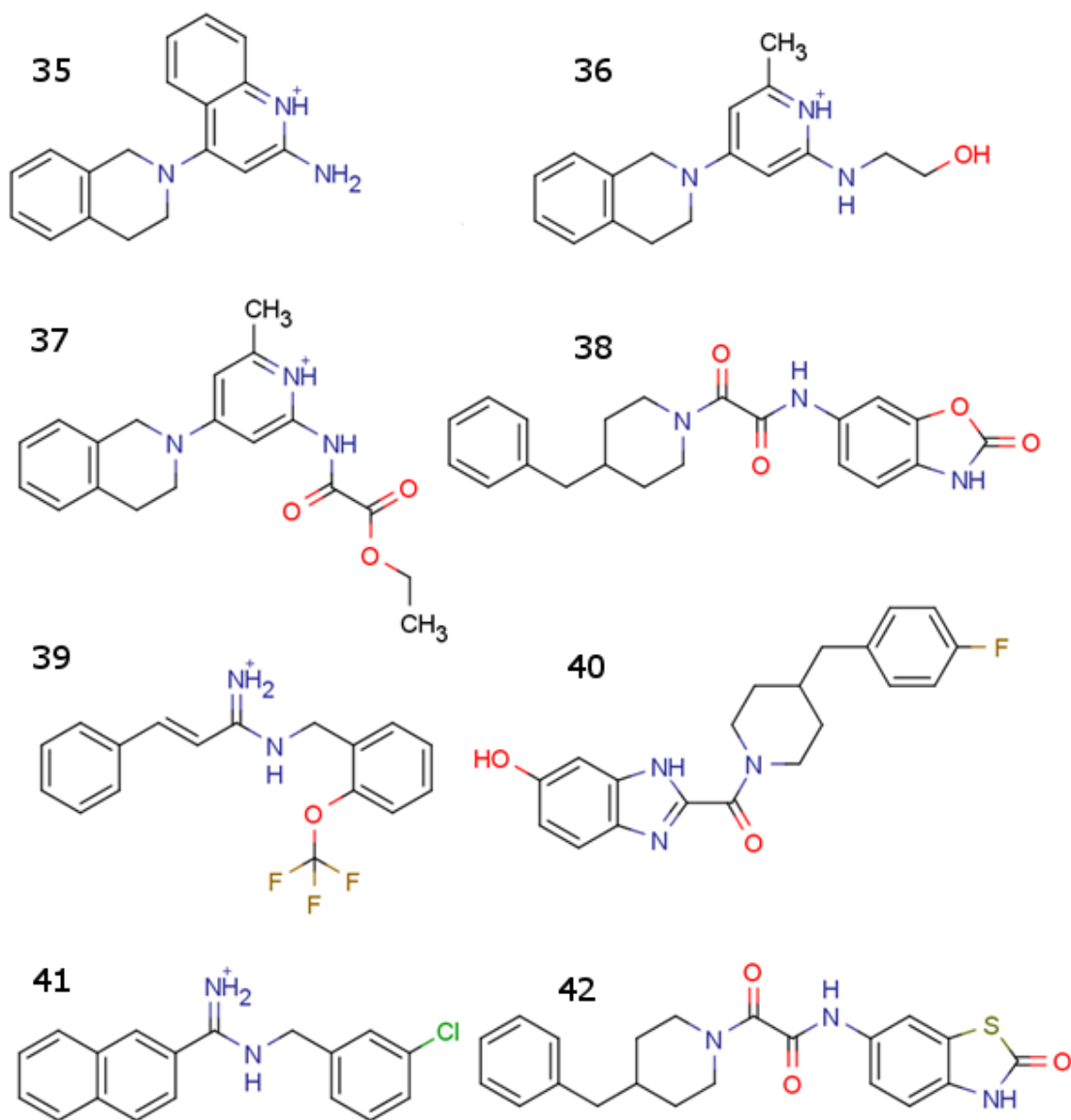


Рисунок 22. Фармакофорные гипотезы 3 (А) и 5 (Б) (см. таблицу 6).

## 2.9. Валидация процедуры виртуального скрининга

Виртуальный скрининг представляет собой процедуру ранжирования базы химических соединений по вероятности высокоаффинного взаимодействия с интересующей мишенью. Качество виртуального скрининга можно оценить по таким параметрам, как фактор обогащения и площадь под кривой ROC (Receiver Operating Characteristic). Фактор обогащения представляет собой отношения

вероятностей нахождения активного соединения при случайном выборе из начала ранжированного списка докируемых структур (0,1%, 1%, 5% списка) и при случайном выборе из всей базы структур. Однако у данной метрики есть недостаток – зависимость от размера выборки активных и неактивных лигандов. Альтернативная метрика – площадь под ROC-кривой (AUC – area under curve) является площадью под графиком зависимости доли правильно классифицирован-



ных истинно активных соединений (чувствительности) от доли неверно классифицированных истинно неактивных соединений (специфичности). Анализ данной кривой позволяет найти оптимальное значение оценочной функции, при

котором достигается максимальное значение соотношения чувствительность/специфичность. Также следует отметить, что для сравнения методов классификации важное значение имеет площадь под кривой ROC – AUC, которая может быть интерпретирована как вероятность того, что из классифицированных веществ: активного и неактивного, активное будет оценено выше, чем неактивное [221]. Следует отметить, что значения AUC является чувствительным к шуму в данных [222], поэтому для каждого значения AUC проводили расчет 95% доверительного интервала методом статистического бутстрепа (statistical bootstrapping).

## **2.10. Подготовка выборок истинно активных и условно неактивных соединений**

Правильная подготовка выборок активных и неактивных соединений оказывает значительное влияние на качество рассчитанных метрик. Как правило, достаточное количество активных соединений может быть взято из литературных данных, данные о неактивных соединениях публикуются в гораздо меньших количествах. Выборка активных соединений была создана на основе работ [161, 192-199]. Вообще говоря, можно использовать просто выборку случайных структур в качестве базы неактивных соединений, но в этом случае значения метрик качества распознавания активных соединений могут быть завышены. Значения оценочной функции докинга произвольно выбранного химического соединения коррелируют со значениями числа атомов, их типов, числа вращающихся связей, липофильности и других физико-химических параметров молекул. То есть в случае замены выборки неактивных соединений на выборку произвольных соединений задача для метода классификации может оказаться излишне “легкой”. В работе [223] предложен метод генерации выборки неактивных соединений путем отбора по физико-химическим свойствам структур, похожих на активные, но существенно отличающихся топологически. На рис. 23 показаны гистограммы распределений некоторых физико-химических характеристик выборки активных соединений. Из базы ZINC было отобрано

случайным образом 15000 структур, значения физико-химических дескрипторов для которых лежали в пределах значений, характерных для активных соединений. Структура отвергалась, если значение коэффициента Танимото, рассчитанного на основании сравнения «отпечатков пальцев» структур, для всех рассматриваемых пар структура / активный лиганд было больше 0.7. Следует отметить наличие бимодальности в распределениях таких характеристик, как число акцепторов водородной связи, площадь полярной поверхности TPSA (Topological Polar Surface Area) и числа атомов на рис. 23, что объясняется существованием некоторого числа структурно далеких кластеров лигандов.

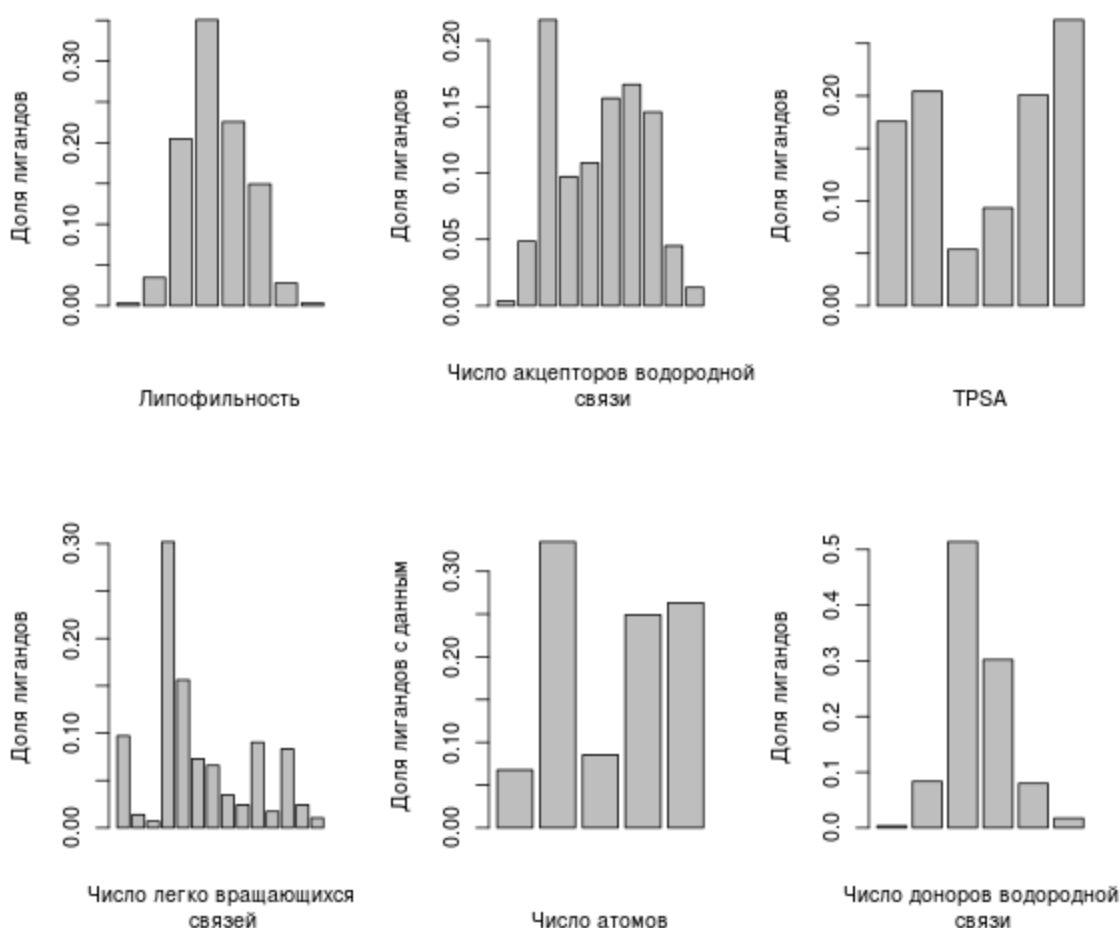


Рисунок 23. Распределения вероятностей для значений некоторых физико-химических дескрипторов отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора.

В таблице 6 представлены статистические параметры валидации фармакофорной гипотезы. При генерации фармакофора оказываются

задействованы лишь 6 структур из 8 использованных для построения фармакофора (структуры **35-42**). Наилучшие значения для AUC и фактора обогащения были получены при использовании оценочной функции TanimotoCombo, оценивающей как форму молекулы, так и пространственное расположение фармакофорных элементов. Расчет и усреднение значений факторов обогащения производили для случайно выбранных баз, состоящих из 30 активных соединений и 1000 неактивных.

Для всех полученных классификаторов характерны высокие значения AUC и факторов обогащения. Наибольшее значение фактора обогащения наблюдается для гипотезы 5 (рис. 22 Б), в то время как AUC максимален для гипотезы 3 (рис. 22 А). В дальнейшей работе использовали гипотезу номер 5, так как при небольших различиях в значении AUC более важную роль играет фактор обогащения, так как визуальный анализ проводится для относительно небольших выборок в начале ранжированного списка отфильтрованных соединений.

Таблица 6. Статистические параметры валидации фармакофорной гипотезы, в каждом ряду приведены оптимальные способы оценки для данного фармакофора, доверительный интервал дан для вероятности 95 %.

Номер фармакофора	Структуры, составляющие фармакофор	Площадь под ROC-кривой (AUC)	Фактор обогащения (EF) 0.5%	Фактор обогащения (EF) 1.0 %	Способ оценки
1	<b>35, 36, 37, 38</b>	0.88 ± 0.02	55 ± 10	33 ± 4	TanimotoCombo
2	<b>31, 34, 36, 38</b>	0.85 ± 0.02	57 ± 10	31 ± 4	TanimotoCombo
3	<b>34, 35, 36, 37</b>	0.90 ± 0.02	61 ± 10	40 ± 4	TanimotoCombo
4	<b>34, 35, 37, 38</b>	0.89 ± 0.02	57 ± 10	37 ± 5	TanimotoCombo
5	<b>31, 36, 37, 38</b>	0.88 ± 0.02	68 ± 10	37 ± 5	TanimotoCombo

По результатам валидации (таблица 7) оценочных функций для докинга среди оценочных функций программы FRED оптимальное значение AUC



получается при использовании Chemgauss4, однако значения факторов обогащения в этом случае оказываются достаточно низкими по сравнению с некоторыми другими оценочными функциями. Наивысшие значения факторов обогащения среди функций OpenEye наблюдаются для функции Shapegauss, в которой на вычисление ее значения влияет только соответствие формы лиганда форме кармана.

Среди оценочных функций из программы Sybyl X 1.3 лучше всего с задачей распознавания активных соединений справляется функция Chemscore, для которой значения факторов обогащения находятся на уровне Shapegauss, а значения AUC несколько выше, чем значение Chemgauss4. Функции, основанные на силовых полях (G\_score, D\_score), демонстрируют несколько худшие значения параметров валидации, чем эмпирические оценочные функции, неявно включающие энтропийную составляющую, такие как Chemscore или Chemgauss4. Перед оценкой проводилась локальная оптимизация геометрических параметров лиганда в комплексе при использовании соответствующей оценочной функции.

Наихудшие показатели демонстрируют функции, основанные на потенциалах “средней силы” (PLP, PMF\_score), для которых фактор обогащения мало отличается от 1. Следует отметить, что использование ограничений в докинге приводит к небольшому (статистически незначимому) ухудшению параметров валидации. Существенные различия наблюдаются в результатах валидации для функций Chemscore (Sybyl X 1.3) и OEChemscore (FRED), то есть результаты виртуального скрининга также могут сильно зависеть от способа реализации оценочной функции и версии программы.

Сравнение результатов валидации метода докинга и поиска по фармакофорному подобию демонстрирует существенное повышение степени обогащения начала ранжированного списка результатов активными соединениями при использовании метода фармакофорного поиска по сравнению с методом докинга, в то же время значение AUC не превышает соответствующих значений для лучших оценочных функций. Несмотря на то, что фактор обогащения для методов, основанных на фармакофорном поиске, оказывается существенно выше,

при использовании метода докинга повышается вероятность найти новые структурные классы лигандов. В дальнейшем, для оценки результатов виртуального скрининга использовали Chemgauss4 по причине удобства применения и высокой дискриминирующей способности.

Таблица 7. Результаты валидации оценочных функций для виртуального скрининга отрицательных модуляторов аминоконцевых доменов.

Способ докинга	Оценочная функция	Площадь под ROC-кривой (AUC)	Фактор обогащения (EF) 0.5%	Фактор обогащения (EF) 1.0 %
Ограничения присутствуют	Chemgauss4	0.87 ± 0.07	19 ± 13	17 ± 10
	Chemgauss3	0.84 ± 0.05	12 ± 8	14 ± 8
	OEChemscore	0.74 ± 0.08	21 ± 13	17 ± 10
	Chemscore	0.88 ± 0.06	28 ± 10	24 ± 10
	PLP	0.73 ± 0.08	11 ± 10	10 ± 6
	Shapegauss	0.76 ± 0.08	32 ± 6	28 ± 5
	G_score	0.70 ± 0.10	20 ± 10	15 ± 10
	D_score	0.77 ± 0.09	30 ± 10	22 ± 10
	PMF_score	0.76 ± 0.07	3 ± 10	3 ± 10
Ограничения отсутствуют	Chemgauss4	0.86 ± 0.06	18 ± 9	17 ± 7
	Chemgauss3	0.84 ± 0.04	14 ± 10	15 ± 10
	OEChemscore	0.74 ± 0.09	14 ± 14	13 ± 10
	Chemscore	0.89 ± 0.06	27 ± 9	23 ± 9
	PLP	0.74 ± 0.1	10 ± 13	8 ± 8
	Shapegauss	0.76 ± 0.09	33 ± 3	27 ± 6

G_score	0.7 ± 0.12	18 ± 12	14 ± 10
D_score	0.78 ± 0.1	28 ± 6	22 ± 9
PMF_score	0.76 ± 0.12	3 ± 10	3 ± 10

## 2.11. Выбор порогового значения оценочной функции

В задачу виртуального скрининга входит отбор сфокусированной библиотеки соединений, с большой вероятностью включающей в себя активные соединения. При некотором выбранном значении ОФ будут наблюдаться два типа ошибок: неправильно классифицированные активные соединения и неправильно классифицированные неактивные соединения. При этом вес ошибки второго типа

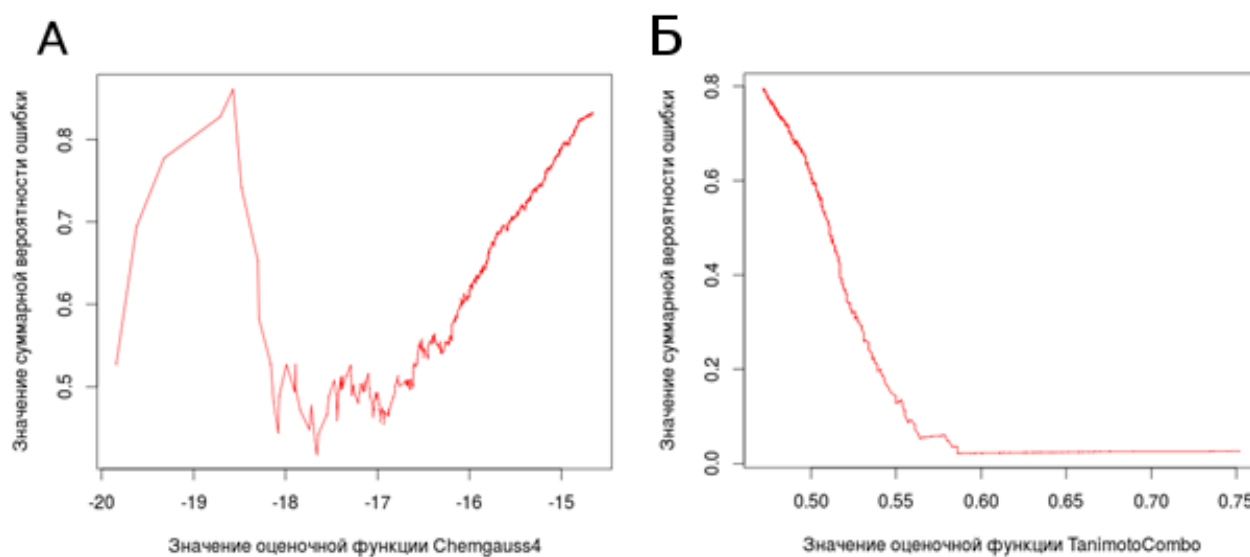


Рисунок 24. Зависимость суммарной вероятности совершить ошибку первого или второго типа от значения ОФ Chemgauss4 (А) и TanimotoCombo (Б).

должен быть существенно выше, чтобы сократить издержки на синтез и испытания предложенных соединений и при этом с разумной вероятностью найти активные соединения. На рис. 24 представлен график зависимости функции:

$$P = P_1 + P_2,$$

где  $P_1$  — вероятность совершить ошибку первого типа, а  $P_2$  — вероятность совершить ошибку второго типа. Минимальное значение данная функция

принимает для значения ОФ Chemgauss4 -17.7 (рис. 24 А). При валидации фармакофорного поиска минимальное значение данная функция принимает при значении метрики TanimotoCombo, равной 0.586 (рис. 24 Б). Следует отметить, что в отличие от оценочных функций для докинга, степень фармакофорного сходства тем больше, чем выше значение соответствующей ОФ.

Как видно из рис. 24 (А), наблюдается некоторое повышение вероятности ошибки при значениях оценочной функции от -20 до -18. Данное явление возникает за счет проникновения в начало ранжированного списка нескольких соединений из выборки неактивных, при визуальном анализе способа связывания которых была отмечена высокая вероятность взаимодействия данных соединений с мишенью.

## **2.12. Описание библиотек, использованных для виртуального скрининга**

Выбор библиотеки соединений для виртуального скрининга опирается прежде всего на доступность соединений для последующей проверки активности отобранных соединений. Наиболее представительной в этом плане является библиотека ZINC [224], включающая в себя базы синтезированных соединений от более чем 100 фирм-поставщиков. В то же время библиотека для скрининга должна содержать достаточно разнообразные соединения для повышения вероятности удачной идентификации ведущего соединения. В библиотеке ZINC содержится большое число родственных соединений, а также дубликатов, солей или соединений, существующих в виде большого числа таутомеров, поэтому в данном случае необходима предварительная подготовка библиотеки для скрининга, включающая удаление солей, генерацию таутомеров и определение состояния протонирования при pH 7.4. Кроме того, из библиотеки удаляли структуры, не соответствующие критериям «похожести на соединение-лидер» (lead-likeness) [225]. Из выборки также были исключены потенциально токсичные соединения, содержащие подструктуры, заданные в программе FILTER [226] как токсифоры.

## 2.13. Анализ результатов виртуального скрининга методом докинга

Для оценки и ранжирования результатов виртуального скрининга была использована функция Chemgauss4, сочетающая в себе хорошие статистические показатели для идентификации активных соединений и удобство использования. Подготовленную библиотеку ZINC разделили на 13 подгрупп по 120000 соединений. Для дальнейшего рассмотрения из ранжированного списка соедине-

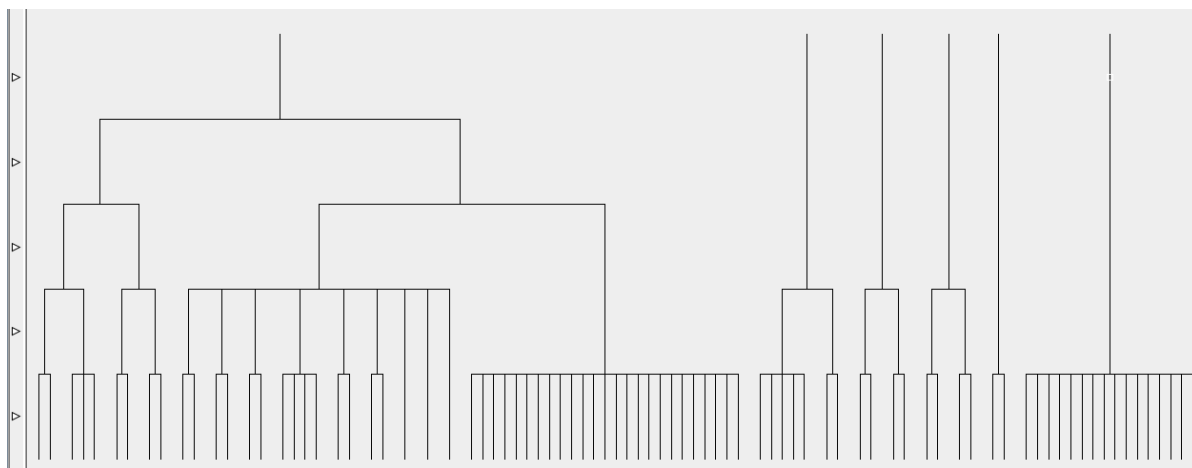


Рисунок 25. Результат кластеризации хит-листа, полученного методом докинга.

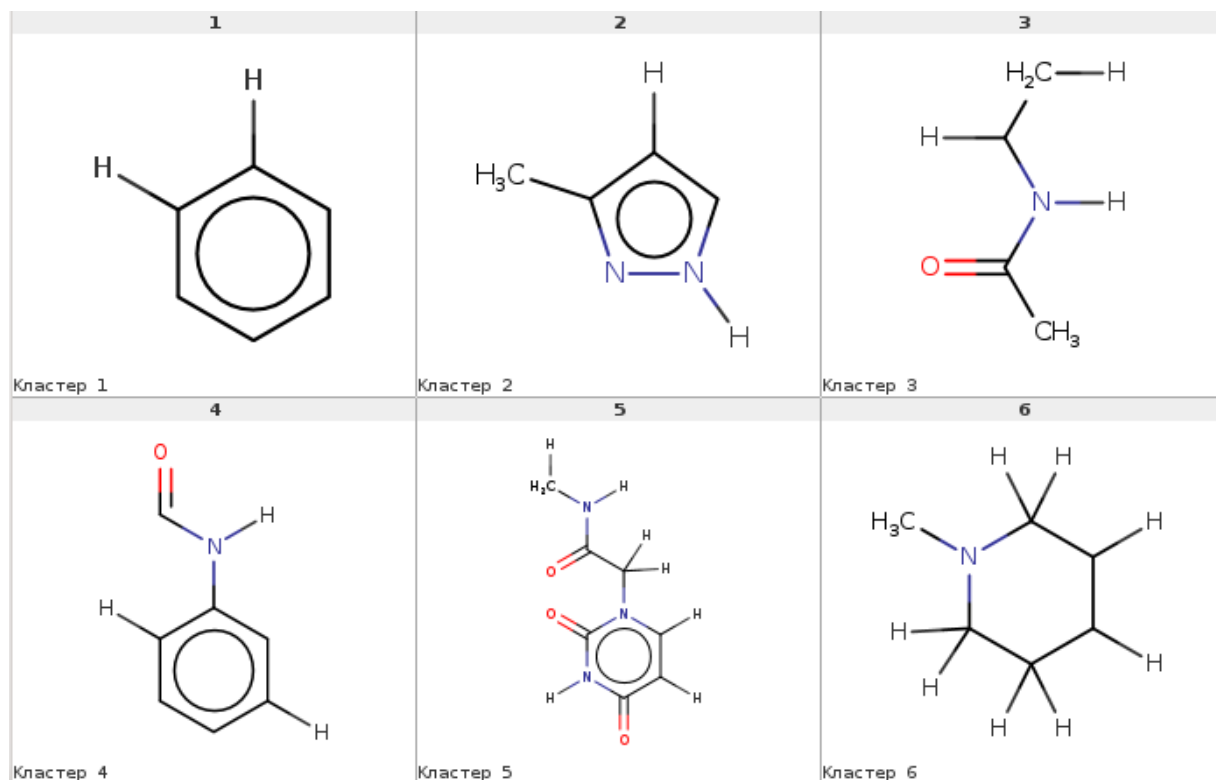


Рисунок 26. Структуры кластеров фрагментов верхнего уровня для хитлиста результатов скрининга методом докинга.

для каждой из подгрупп были взяты структуры, оцененные лучше, чем выбранное пороговое значение оценочной функции. При этом было найдено 84 структуры. Для упрощения анализа результатов докинга была проведена иерархическая кластеризация по максимальной общей подструктуре. Размер минимальной общей подструктуры был выбран равным 8 атомам. На рис. 25 представлен результат кластеризации объединенной базы.

Верхний уровень содержит 6 кластеров фрагментов, которые представлены на рис. 26. Наибольшее количество потомков (51) содержит кластер 1, представляющий собой фенильную группу с возможностью замещения по четырем положениям. Вторым по заселенности является кластер 6 (16 структур). Следует отметить, что большинство структур из хит-листа представляют собой структурные аналоги ифенпродила (наиболее заселенные кластеры являются подструктурами ифенпродила).

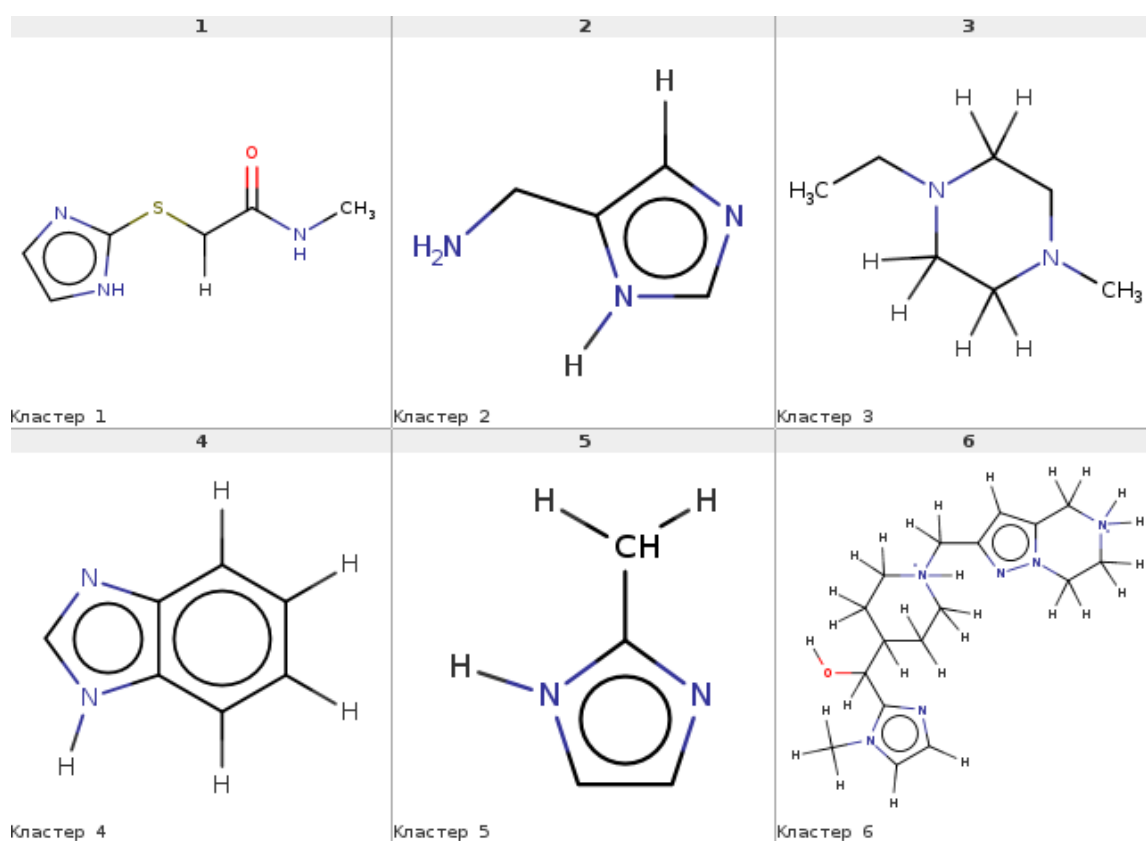


Рисунок 27. Структуры кластеров фрагментов верхнего уровня для хитлиста результатов скрининга методом фармакофорного поиска.

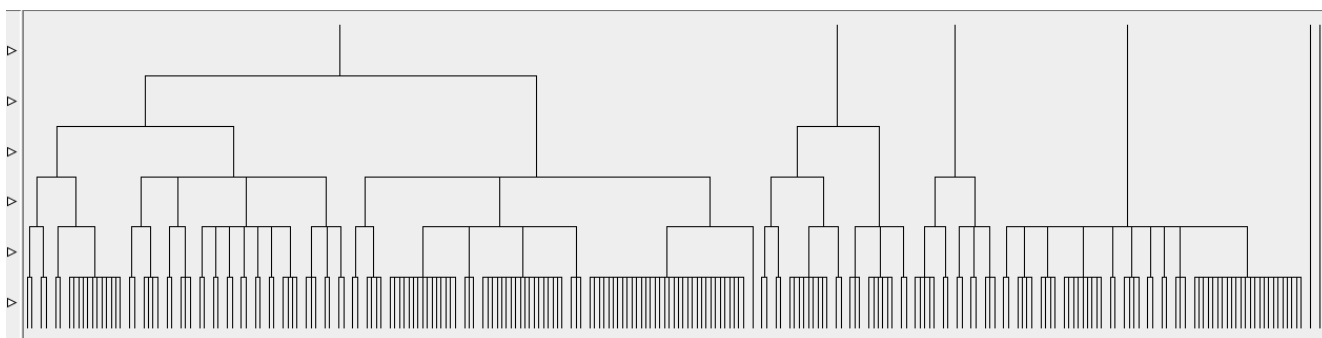


Рисунок 28. Результат кластеризации хит-листа, полученного методом фармакофорного поиска.

#### **2.14. Анализ результатов виртуального скрининга методом фармакофорного поиска**

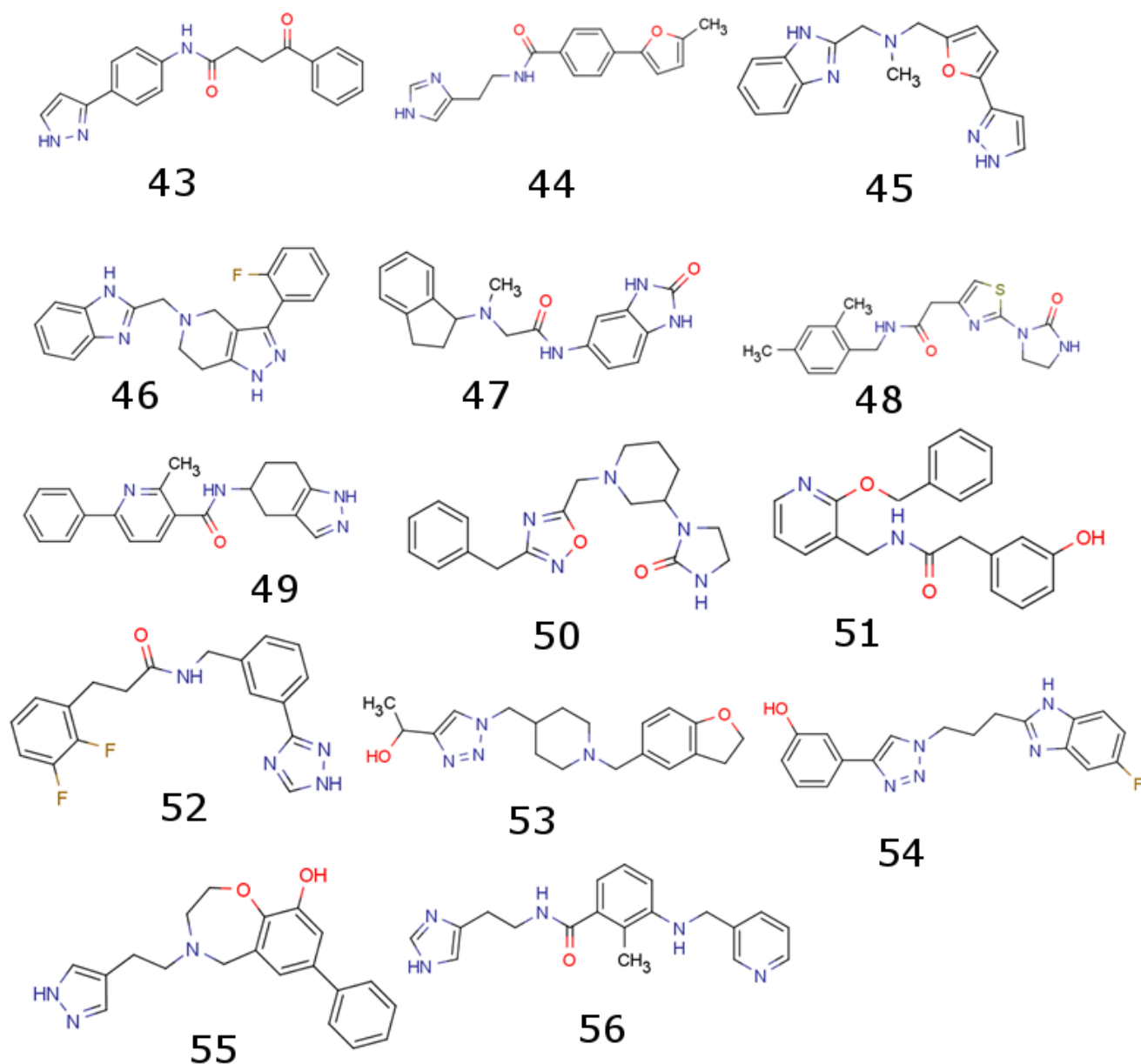
Число соединений, оцененных выше порогового значения оценочной функции TanimotoCombo, оказалось равным 164, при этом значение оценочной функции для наиболее высокооцененной структуры не превысило 0.66, то есть большинство хитов оказались оценены невысоко по сравнению с высокоактивными лигандами, несмотря на большой размер базы результатов по сравнению с методом докинга. Кластеризация результатов виртуального скрининга представлена на рис. 28. Число кластеров верхнего уровня и глубина бинарного дерева оказываются равными 6. При этом результаты кластеризации существенно отличаются от кластеров, полученных методом докинга, в частности, полученная сфокусированная библиотека оказывается обогащена молекулами, содержащими бензимидазол (наиболее заселенный кластер), а также структурами, содержащими пиперазиновый фрагмент (рис. 27).

#### **2.15. Биологические исследования**

Отбор лигандов для биологических исследований проводили из хит-листов, полученных в результате виртуального скрининга как методом докинга, так и фармакофорным поиском. В таблице 8 представлены 14 отобранных структур, для которых проводились исследования. Величина биологической активности оценивалась по степени замещения меченого [3H]ифенпродила на фракции

синаптических мембран мозга крыс. Исследование проводились д.х.н. В.В. Григорьевым (ИФАВ РАН, г. Черноголовка).

Активность демонстрируют структуры **45** и **48**, способ связывания которых представлен на рис. 29.



Связывание вещества **48** с белком может происходить за счет водородной связи между амидным атомом водорода лиганда и атомом кислорода боковой цепи Gln110, фрагментом диметиленмочевины и боковой цепью остатка Glu236 и гидрофобных взаимодействий 2,4-диметилфенильного фрагмента и остатков, образующих карман 1 (рис. 12).



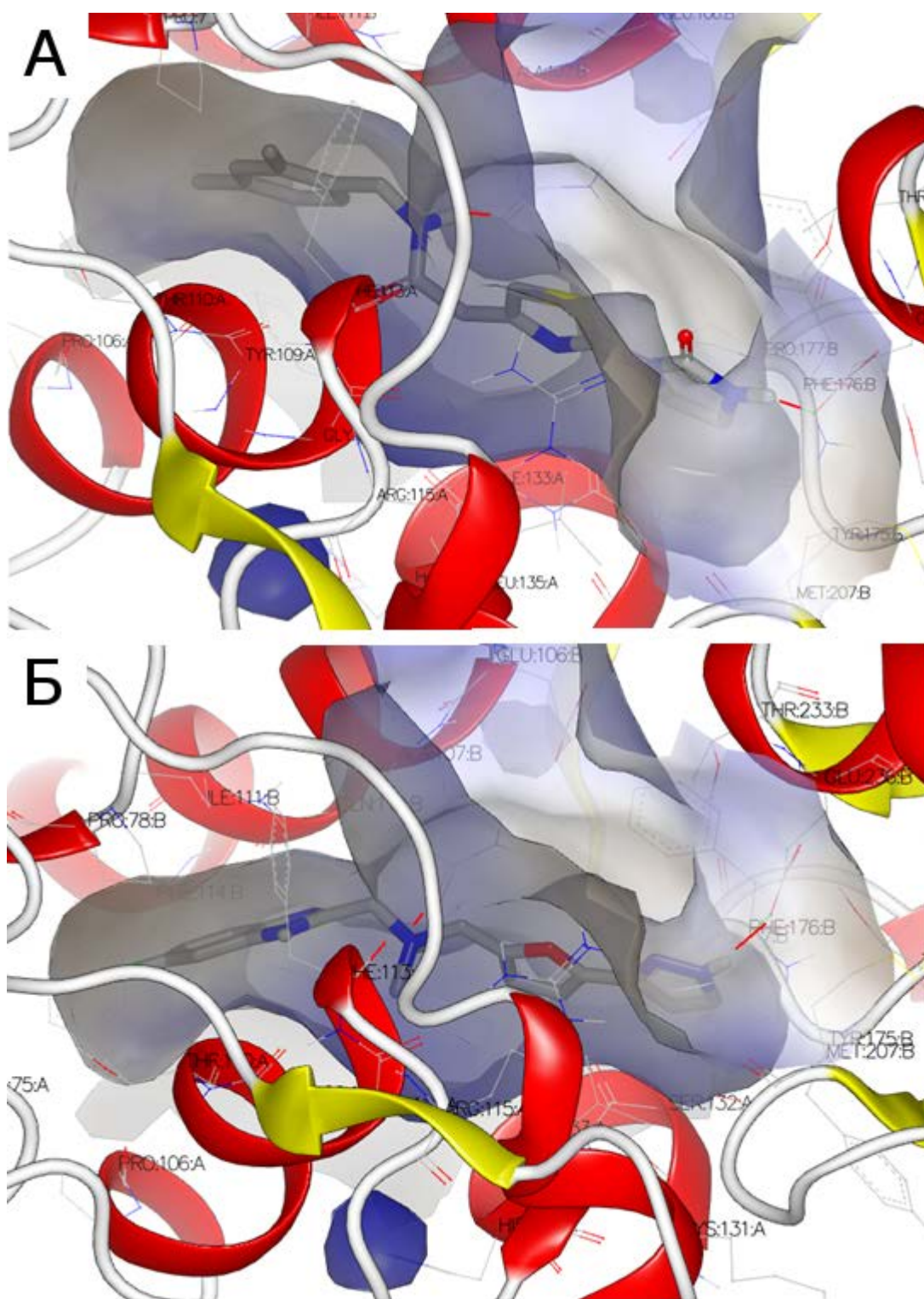


Рисунок 29. Способы связывания лигандов **48** (А) и **45** (Б).

Взаимодействие соединения **45** с рецептором должно осуществляться за счет водородных связей между пиразольным фрагментом лиганда и Glu236 и между третичной аминогруппой и Gln110, а также за счет гидрофобных взаимодействий бензимидазольного фрагмента с карманом 1 (рис. 12).

Данные лиганды относятся к совершенно новым, не представленным в литературе структурным классам, однако их  $IC_{50}$  не очень высоко. Поэтому для них можно предложить набор модификаций, которые позволят усилить сродство к рецептору. Для соединения **48** наблюдается неполное заполнение кармана 1. Поэтому можно, например, добавить метильную группу в положение 3 или заменить весь 2,4-диметилфенильный фрагмент на 2-нафтильный фрагмент. В случае соединения **45** в кармане 1 связывается не очень гидрофобный фрагмент бензимидазола, который стоит заменить на бензфурильный или бензтиофеновый фрагменты для повышения гидрофобности данного лиганда.

Таким образом, были построены структурные модели аминоконцевых доменов рецепторов состава GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D, выявлены особенности связывания ифенпродила в данных комплексов, с помощью метода молекулярной динамики, метода докинга и с применением анализа количественных соотношений «структура-активность» классифицированы способы связывания высокоаффинных лигандов и выработана общая концепция действия отрицательных модуляторов - аналогов ифенпродила. Некоторые из предложенных по результатам виртуального скрининга соединения проявили активность как отрицательные аллостерические модуляторы NMDA-рецептора.

## Глава 3. Идентификация сайтов связывания лигандов NMDA-рецептора

### 3.1. Описание протокола слепого докинга

Для некоторых лигандов NMDA-рецептора отсутствуют структурные данные о положении сайта связывания. Успешное нахождение их положения может помочь предоставить новые данные о механизмах активации рецептора. При этом использование данных молекулярного моделирования может уменьшить издержки на проведение эксперимента.

Для процедуры поиска сайтов использовали протокол, общая схема которого представлена на рис. 30.

Протокол слепого докинга включает в себя использование комплекса программ: `frocket` [227] для поиска карманов связывания, программы комплекса Rosetta 3.5 [228] для выполнения докинга, OMEGA2 для генерации конформаций докируемых молекул, а также `bash`-скрипты для автоматизации запуска и анализа результатов.

Для нахождения карманов связывания в программе `frocket` использовали параметры по умолчанию. На выходе каждый из найденных карманов представлен набором так называемыми альфа-сфер (сферы некоторого радиуса (от 3.0 до 6.0 Å), с центром в заданной точке, которые касаются ван-дер-ваальсовых поверхностей 4 атомов и при этом никакой атом белка не находится внутри этой сферы). Алгоритм докинга лигандов программой Rosetta 3.5 работает следующим образом: во-первых, лиганд помещается на некотором расстоянии относительно макромолекулы, затем происходит серия шагов, включающих (1) случайное изменение положения лиганда, (2) изменение конформаций окружающих боковых цепей, (3) минимизацию энергии комплекса, при этом оптимизации внутренних координат белка и лиганда не происходит. Стартовые позиции выбирались следующим образом: первая точка — центр масс всех сфер, определяющих карман, следующая точка — наиболее удаленная от центра масс сфера. И, наконец, третья сфера - та, для которой максимальна сумма расстояний до двух предыдущих сфер. Такой подход к выбору отправных точек позволяет в

значительной степени покрыть пространство кармана при докинге. Генерация конформаций выполнялась в программе Omega2, расчет зарядов на атомах лигандов выполняли с помощью тулkitов OpenEye [229]. Перед докингом была проведена переупаковка боковых цепей рецептора. Для докинга использовали следующие параметры: число траекторий — 1000, радиус сферы, в которой осуществляются трансляции — 5 Å. Расчет значения оценочной функции осуществляется по разности между энергией комплекса и индивидуальными энергиями его компонентов.

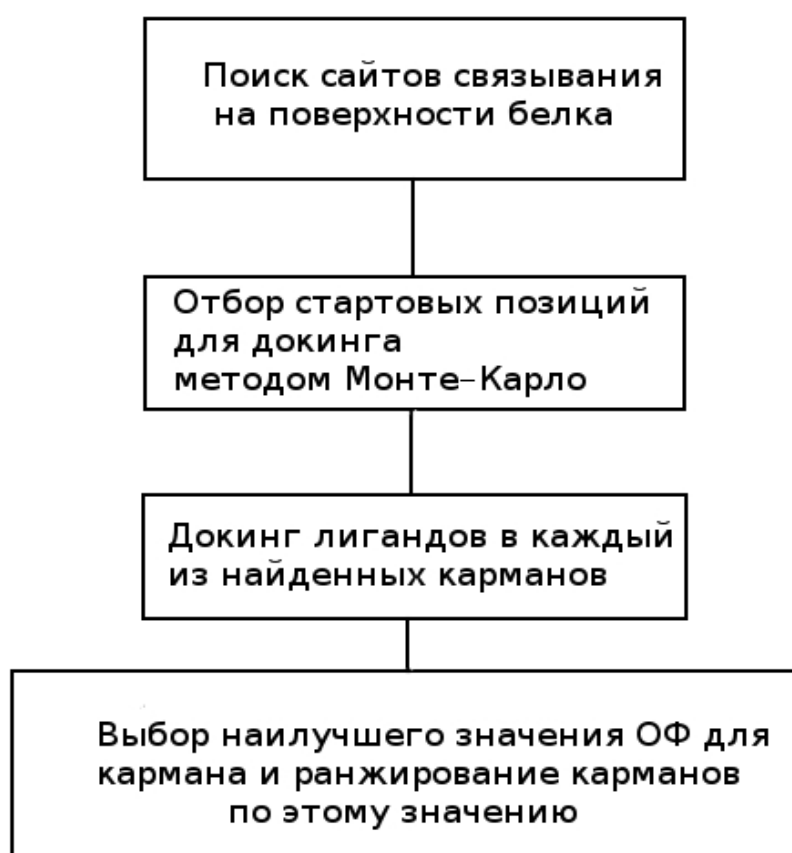


Рисунок 30. Схема применения программного обеспечения для реализации протокола слепого докинга.

### **3.2. Применения протокола слепого докинга для идентификации сайтов связывания лигандов NMDA-рецептора**

Метод слепого докинга может применяться в случаях, когда местонахождение сайта связывания лигандов не известно с достаточной точностью. Наиболее широкое применение данный метод находит в определении

конформаций комплексов макромолекул [230]. К настоящему моменту имеется значительное число лигандов NMDA-рецептора, для которых отсутствуют данные о местонахождении сайтов связывания или оно известно лишь приблизительно [231].

Валидация данного подхода была выполнена на небольшой выборке лигандов NMDA-рецептора (глутаминовая кислота, глицин, ифенпродил (4), D-AP5 (7), DСКА (6), стр. 8), для которых имеются кристаллические структуры комплексов с доменами этого белка (таблица 1). Гистограммы распределения значений оценочной функции Talaris2013 [232] для 1000 независимых запусков протокола представлены на рис. 31. Линии выделяют значение оценочной функции для правильно найденного кармана связывания лиганда.

Для докинга использовали полные структуры рецепторов GluN1/GluN2B и GluN1/GluN2D, включающие аминоконцевые, лиганд-связывающие и трансмембранные домены. В свободном доступе находится структура рецептора GluN1/GluN2B (таблица 1, код PDB 4PE5), при этом в данной структуре отсутствуют петли в трансмембранном домене, образующие так называемый «фильтр селективности». Так как данные петли участвуют в связывании блокаторов канала, то их структура была восстановлена методом моделирования по гомологии с использованием структуры калиевого канала KirBac1.1 (код PDB 2WLL), которая имеет аналогичное расположение трансмембранных спиралей и близкие по длине петли, образующие «фильтр селективности». Впервые построена полная структурная модель рецептора GluN1/GluN2D с использованием структур с кодами PDB 4PE5 и 2WLL. Выравнивания приведены в Пр. 1А и 1Б

Глицин докируется в свой карман (рис. 31 А) с наивысшим значением оценочной функции по сравнению с другими карманами. При этом значения оценочной функции для обоих карманов, переводимых друг в друга операцией симметрии  $C_2$ , оказываются очень близкими. Для всех других лигандов, использованных для валидации, такого согласования не наблюдалось, видимо вследствие недостаточного сэмплирования. При докинге глутаминовой кислоты (рис. 31 В) также удалось отыскать верный карман связывания и конформацию,

близкую к наблюдаемой в кристаллической структуре. В результате докинга D-AP5 (рис. 31 Б), антагониста глутаматного сайта, наилучшим по значению оценочной функции неожиданно оказался карман связывания глутамата, хотя D-AP5 связывается в открытой форме лиганд-связывающего домена. При этом, однако, абсолютная величина значения оценочной функции D-AP5 (-13.7), меньше чем соответствующее значение у глутамата (-15.0). Результаты докинга ифенпродила (рис. 31 Г) также продемонстрировали успешность данного подхода для определения сайта связывания на поверхности белка. Карман связывания дихлоркинуреновой кислоты ДСКА (глициновый сайт) в этой структуре NMDA-рецептора оказывается в значительной степени уменьшен в размере и значения ОФ для докинга в эти карманы ДСКА составляет -8.5; -7.5 (для глицина -13.0) наилучшее значение ОФ для ДСКА составляет -15.7 (карман связывания глутаминовой кислоты).

Таблица 8. Статистические параметры распределений значений оценочной функции Talaris2013 для результатов докинга некоторых лигандов NMDA-рецептора.

Лиганд	Выборочное среднее значение оценочной функции	Несмещенная оценка дисперсии значения ОФ	Нормальность по Шапиро-Уилку, значение P	p <sup>a</sup>
глицин	-4.85	2.54	$2.1 \times 10^{-4}$	0.0006
глутамат	-6.50	2.95	0.1269	0.032
ифенпродил	-10.36	4.69	$2.2 \times 10^{-16}$	0.13
D-AP5	-6.79	2.88	$1.74 \times 10^{-12}$	0.047

<sup>a</sup> - вероятности случайного отклонения значения ОФ от выборочного среднего для истинного кармана, при условии нормальности распределения

В случае лигандов с неизвестными карманами связывания результатом применения данного подхода будет распределение значений оценочной функции для всех найденных карманов. При этом оценки математического ожидания и дисперсии данного распределения, если карманов достаточно много, будут характеристикой самого лиганда и зависеть от числа атомов и формы молекулы.

Рис. 31 подтверждает данное утверждение: например, ифенпродил состоит из большего числа атомов, чем глутамат, и среднее значение для данного распределения значений ОФ действительно ниже, чем для глутамата. Гипотеза о нормальности отвергается для большинства распределений (кроме глутамата) согласно критерию Шапиро-Уилка [232] (таблица 8). Для визуального анализа возможности аппроксимации найденных распределений нормальным были пос-

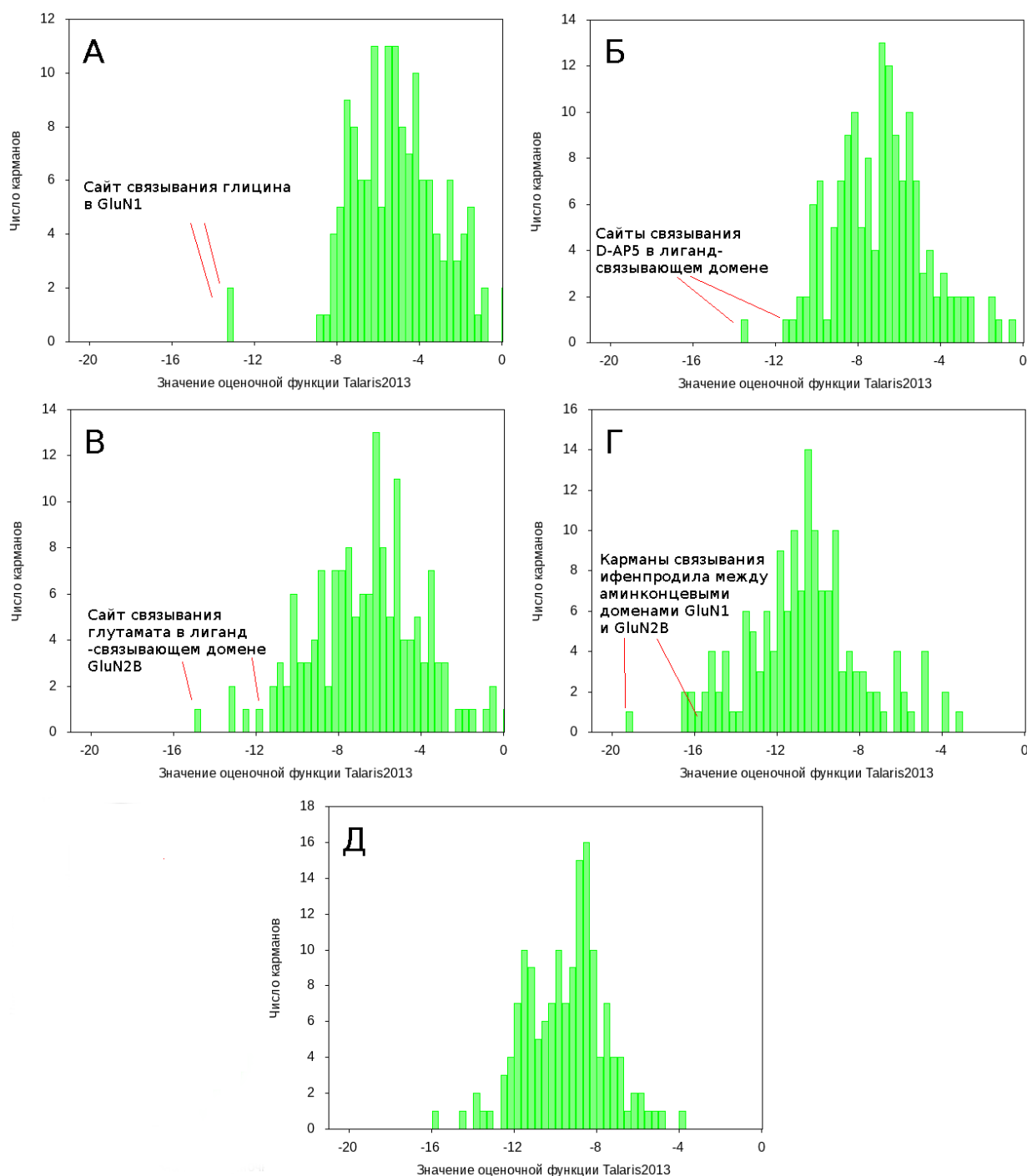


Рисунок 31. Гистограммы значений оценочной функции для докинга в карманы структуры GluN1/GluN2B. (А), (Б), (В), (Г), (Д) — результаты докинга глицина, D-AP5, глутамата, ифенпродила и DCKA, соответственно.

троены графики соотношений квантили центрированного нормированного распределения значений ОФ и квантили стандартного нормального распределения (рис. 32). Следует отметить, что полученные графики демонстрируют хорошую аппроксимацию данных нормальным распределением.

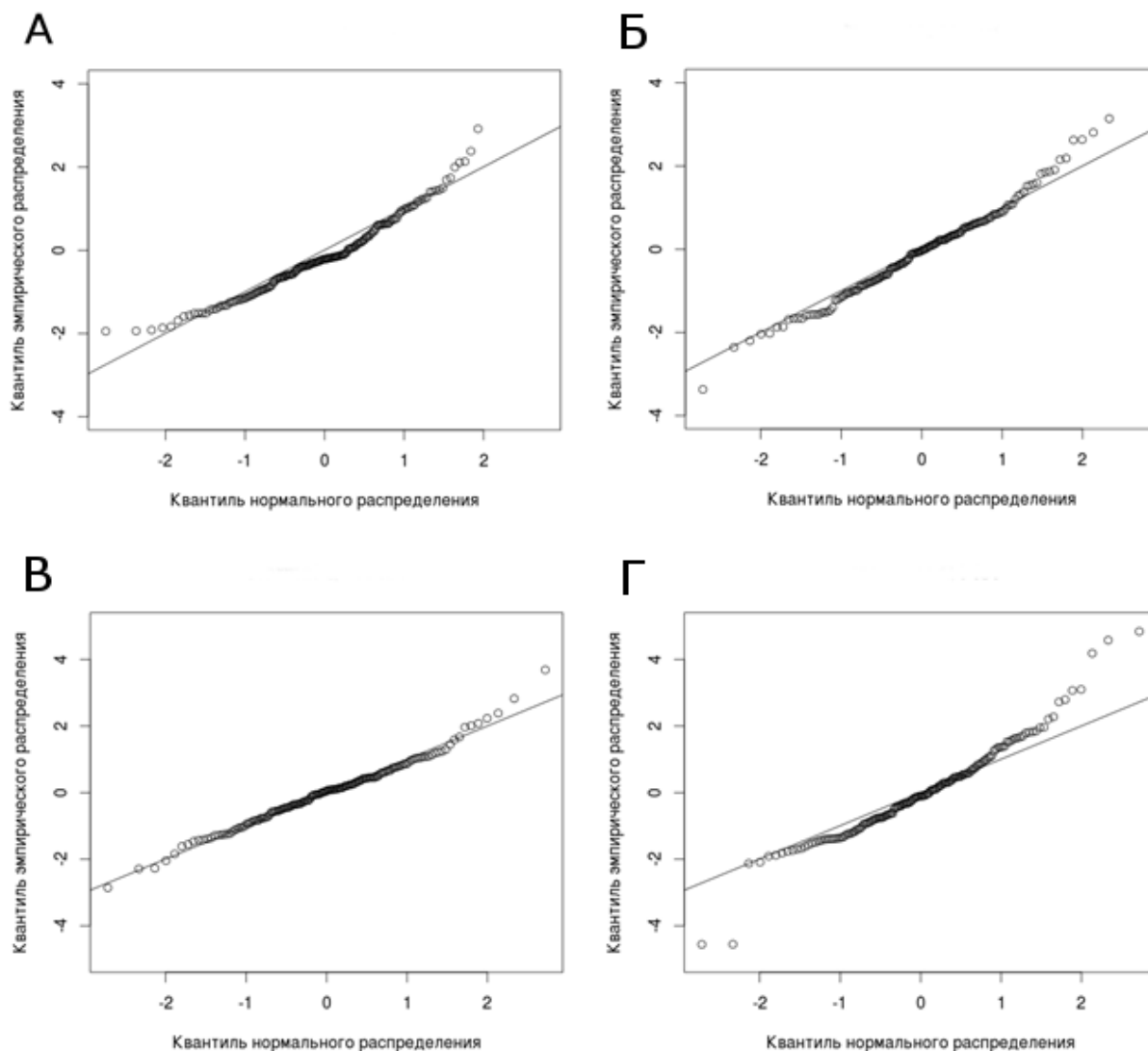


Рисунок 32. Графики отношения квантилей для распределений значений ОФ лигандов для ифенпродила (А), D-AP5 (Б), глутамата (В), глицина (Г) и стандартного нормального распределения.

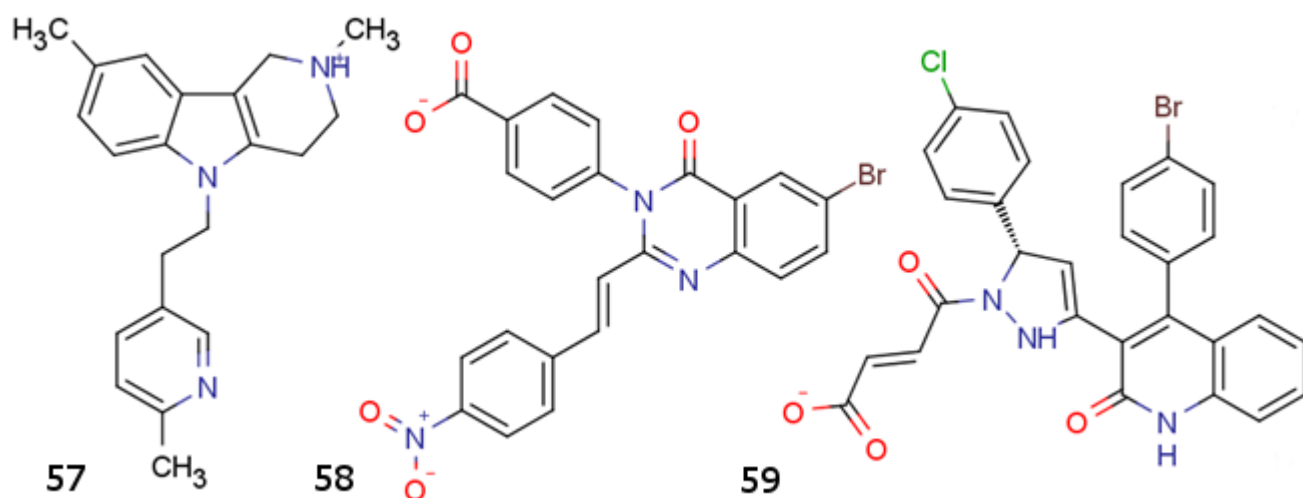
Для поиска карманов связывания неизвестных соединений необходимо выработать критерий отбора кандидатов на роль истинного кармана: например, подобрать пороговое значение вероятности отклонения значения ОФ для данного кармана от среднего. В таблице 8 приведены значения вероятности случайного отклонения значения истинного кармана от среднего значения оценочной функции при условии нормальности распределения этих значений.



Как следует из таблицы 9, максимальное значение вероятности отклонения от среднего значения оценочной функции составляет около 10%. Это значение использовали в дальнейшем в качестве порога для отбора карманов для визуального анализа. Результаты докинга ДСКА (антагониста, связывающегося с глициновым сайтом) не включали в рассмотрение вследствие значительного несоответствия между нативной структурой области связывания и структурой рецептора, используемой для докинга. Примечательно, что наиболее высокооцененным карманом связывания ДСКА является карман связывания глутамата, отличающийся от кармана связывания глицина большими размерами.

Разработанный подход демонстрирует эффективность для нахождения карманов связывания лигандов NMDA-рецептора и устойчивость к небольшим конформационным изменениям в белке (докинг D-AP5), но лишь до определенных пределов, так как для сокращения времени расчетов основные цепи белка были неподвижны (что, видимо, объясняет проблемы с ДСКА). Использование нескольких существенно различающихся конформаций рецептора может существенно улучшить результаты.

Поскольку в структуре NMDA-рецептора имеется два идентичных сайта связывания всех лигандов, то для оценки порогового значения вероятности отклонения брали худшее значение из двух значений оценочной функции.



Описанный здесь подход был применен для определения карманов связывания димебона (57), антигистаминного препарата, который считается

перспективным для лечения болезни Альцгеймера, а также веществ (58, 59) – селективных антагонистов GluN1/GluN2C и GluN1/GluN2D рецепторов из работ [113,231].

### 3.3. Поиск сайта связывания димебона

Результаты докинга димебона представлены на рис. 33 и 34 в виде гистограммы распределения значений оценочной функции и найденных карманов связывания с указанием их положения на полной структуре рецептора. Следует отметить, что в настоящее время NMDA-рецептор не считается основной мишенью данного препарата, за счет действия на которую димебон проявляет нейропротекторные эффекты. Наиболее вероятно, что эти эффекты проявляются за счет антагонистического действия на серотониновый 5-HT<sub>6</sub> рецептор [233].

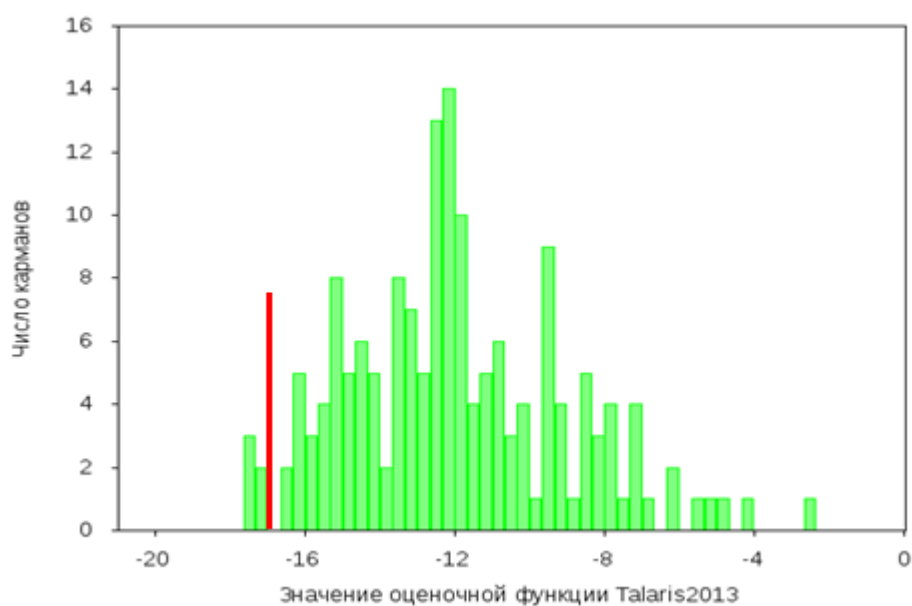


Рисунок 33. Гистограмма значений оценочной функции для докинга димебона в структуру NMDA-рецептора, красным цветом отмечено пороговое значение оценочной функции.

Примечательно, что удовлетворительные (вероятность отклонения от среднего меньше 1%) значения оценочной функции для карманов отсутствуют, что свидетельствует об отсутствии высокоаффинного связывания димебона с NMDA-рецептором. Были рассмотрены пять наиболее высокооцениваемых комплексов, для которых вероятность отклонения значений оценочной функции от среднего меньше 10%.

Наиболее интересен как с точки зрения высокого значения оценочной функции, так и с точки зрения возможного механизма действия карман А на рис. 34, находящийся на поверхности контакта между лиганд-связывающим доменом и аминоконцевым доменом GluN2В субъединицы. Связывающий карман образован остатками M394, Y392, H162, N161 со стороны аминоконцевого домена и остатками S766, P767, R763 со стороны лиганд-связывающего домена. При этом

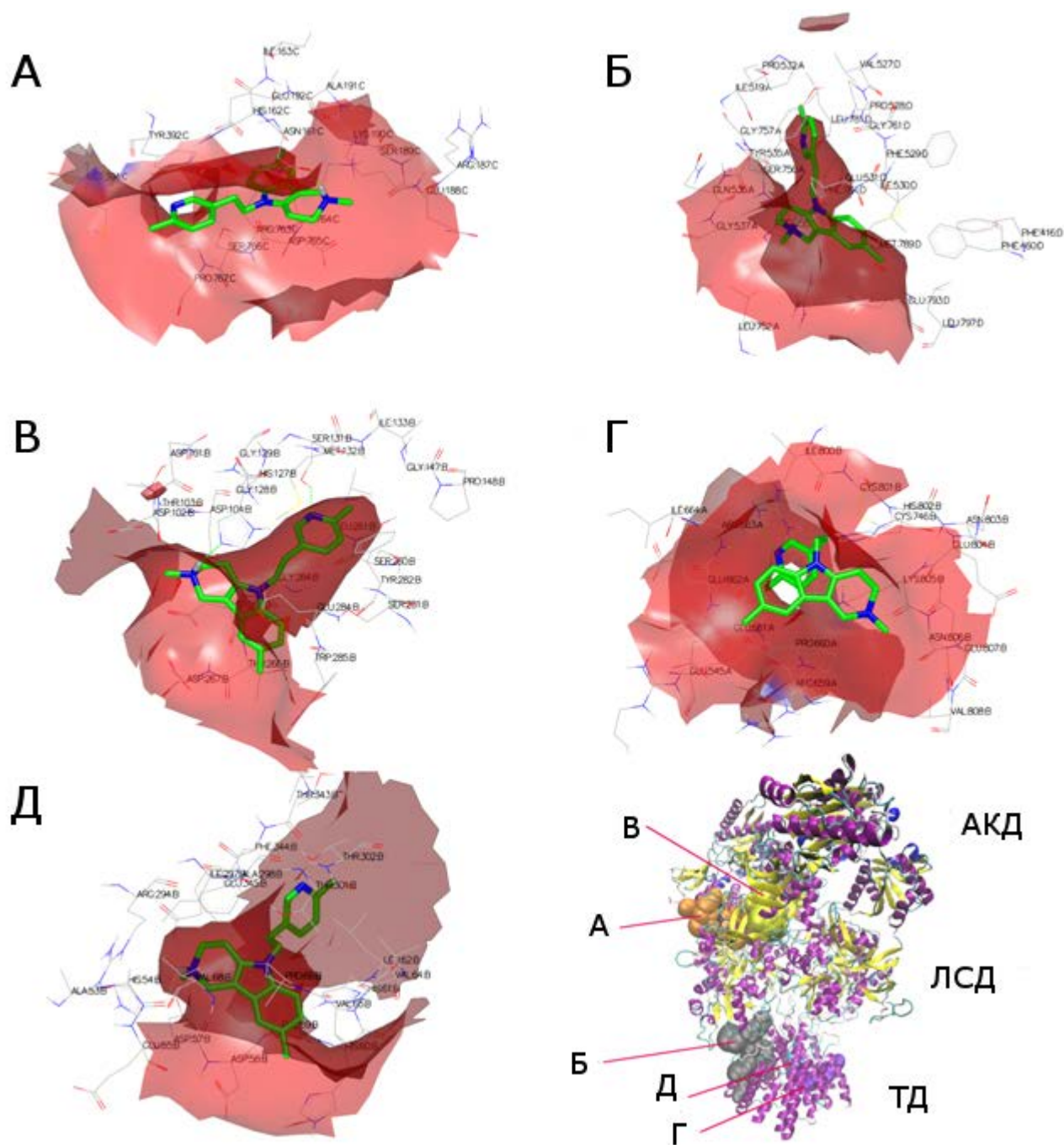


Рисунок 34. Пять наиболее высокооцениваемых результатов докинга димебона в карманы NMDA-рецептора. АКД - аминоконцевой домен, ЛСД - лиганд-связывающий домен, ТД - трансмембранный домен.

пиридиновый фрагмент димебона участвует в стекинг-взаимодействии с ароматическим фрагментом боковой цепи Y392, а заряженный протонированный атом азота димебона образует водородную связь с карбонилем боковой цепи N161. В целом, такой способ связывания лиганда может влиять на взаимодействия между лиганд-связывающим доменом и аминоконцевым доменом, который выполняет регуляторную роль.

Высокие значения оценочной функции для результатов докинга в карманы Б, Д и Г, по-видимому, являются артефактами расчетов, так как эти области в нативном состоянии погружены в мембрану. Карман Д большей частью образован петлей, соединяющей аминоконцевой домен с лиганд-связывающим доменом GluN1, и имеет много некомпенсированных водородных связей, что объясняет высокое значение оценочной функции.

Таким образом, полученные результаты согласуются с данными о том, что NMDA-рецептор не является основной мишенью нейропротекторного действия димебона, хотя, как известно, димебон является слабым антагонистом NMDA-рецептора, что до некоторой степени обуславливает его нейропротекторное действие.

#### **3.4. Докинг модуляторов, селективно ингибирующих NMDA-рецепторы, содержащие субъединицы GluN2C, GluN2D**

Для веществ **58** и **59** докинг проводили в структуры GluN1/GluN2D и GluN1/GluN2B для сравнения, так как эти вещества обладают относительно высоким сродством к подтипам, содержащим субъединицы GluN2D, а структура GluN1/GluN2B рецептора полностью известна из литературных данных (табл. 1).

Данные лиганды обладают наивысшим значением  $IC_{50}$  среди исследованных веществ данных классов, хотя в целом данные классы лигандов обладают невысоким сродством ко всем подтипам NMDA-рецептора. По данным мутагенеза критичными для связывания остатками являются Q801, L705, A752, K779 в субъединице GluN2D [234]. Следует отметить, что эти остатки не образуют оформленного кармана в известных структурах NMDA-рецептора, а находятся в

районе петель, соединяющих лиганд-связывающий и трансмембранный домены. Для локализации кармана связывания аллостерических модуляторов был применен разработанный подход.

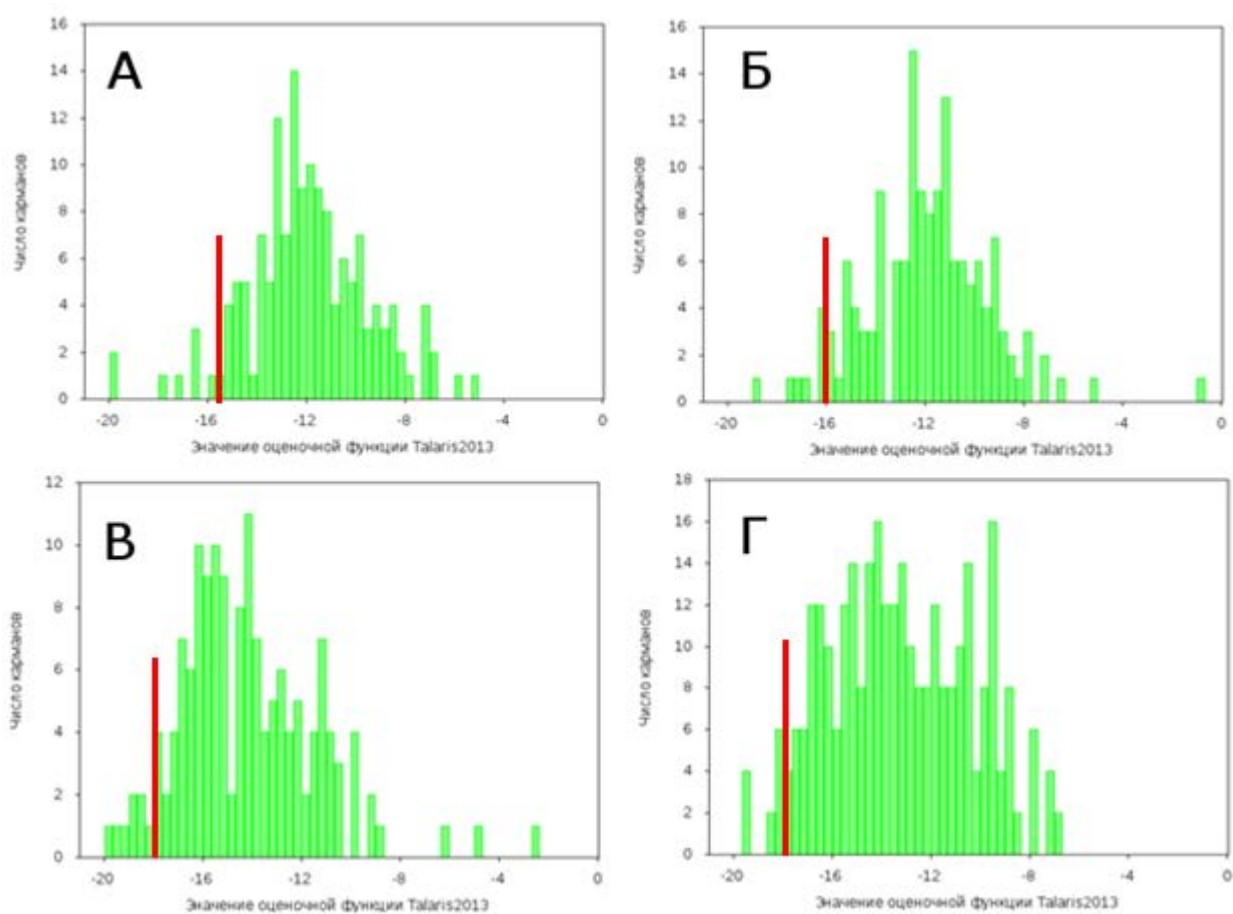


Рисунок 35. Гистограммы распределений значений оценочных функций для результатов докинга вещества **58** в структуры GluN1/GluN2B (А) и GluN1/GluN2D (Б) и вещества **59** в структуры GluN1/GluN2B (В) и GluN1/GluN2D (Г).

В таблице 9 представлены статистические параметры распределения значений оценочной функции Talaris2013 для результатов докинга веществ **58** и **59** в структуры двух подтипов NMDA-рецептора. Исходя из полученных значений ОФ при докинге в NMDA-рецептор и гипотезы о нормальности их распределения было рассчитано пороговое значение ОФ для облегчения визуального анализа. В результате докинга соединения **59** были найдены 4 высокооцененных кармана, представленных на рис. 36. Карман А находится между лиганд-связывающими доменами GluN1 и GluN2B. При связывании образуется водородная связь между атомом водорода амидной группы 2-хинолонового фрагмента и атомом кислорода

карбоксовой группы Asp787 (GluN1). В то же время имеет место водородная связь между атомом водорода заряженной аминогруппы K755 и атомом кислорода в амидной группе, образованной остатком фумаровой кислоты в соединении **59**. Следует отметить, что остаток K755, вносящий значительный вклад в связывание аллостерических модуляторов [234], находится в непосредственной близости от лиганда и участвует в поддержании структуры данного кармана.

Таблица 9. Параметры распределения рассчитанных значений оценочной функции (ОФ) для докинга соединений **58** и **59** в структуры некоторых подтипов NMDA-рецептора.

Подтип рецептора	Соединение	Выборочное среднее значение оценочной функции	Несмещенная оценка дисперсии значения ОФ	Нормальность по Шапиро-Уилку, значение P	Пороговые значения оценочной функции
GluN1/ GluN2D	<b>58</b>	-11.7	3.4	$1.6 \times 10^{-15}$	-16.1
	<b>59</b>	-12.9	4.0	$1.6 \times 10^{-13}$	-18.0
GluN1/ GluN2B	<b>58</b>	-11.9	2.5	0.1	-15.2
	<b>59</b>	-14.3	2.9	$2.9 \times 10^{-4}$	-18.0
	димебон ( <b>57</b> )	-11.47	4.3	$1.6 \times 10^{-14}$	-17.0

Карман Б образован спиралью трансмембранного домена. Высокое значение оценочной функции достигается за счет стекинг-взаимодействия хлорфенильного фрагмента лиганда и ароматического фрагмента боковой цепи F554. Также вносит вклад водородная связь между карбоксилем лиганда и кислым атомом водорода боковой цепи W610.

Карманы В и Г (рис. 36) образованы петлями, соединяющими аминоконцевой и лиганд-связывающий домены. Высокое значение оценочной функции при докинге в эти карманы, видимо, является артефактом расчетов и связано с наличием множества некомпенсированных водородных связей. При докинге соединения **59** в структуру рецептора GluN1/GluN2D для

подробного рассмотрения были отобраны пять карманов, значение оценочной функции для которых ниже порогового.

Карманы Б и Г (рис. 37) находятся между лиганд-связывающим и аминоконцевым доменом и образованы соединяющими их петлями. Высокое значение оценочной функции при докинге в данный карман, по-видимому, также

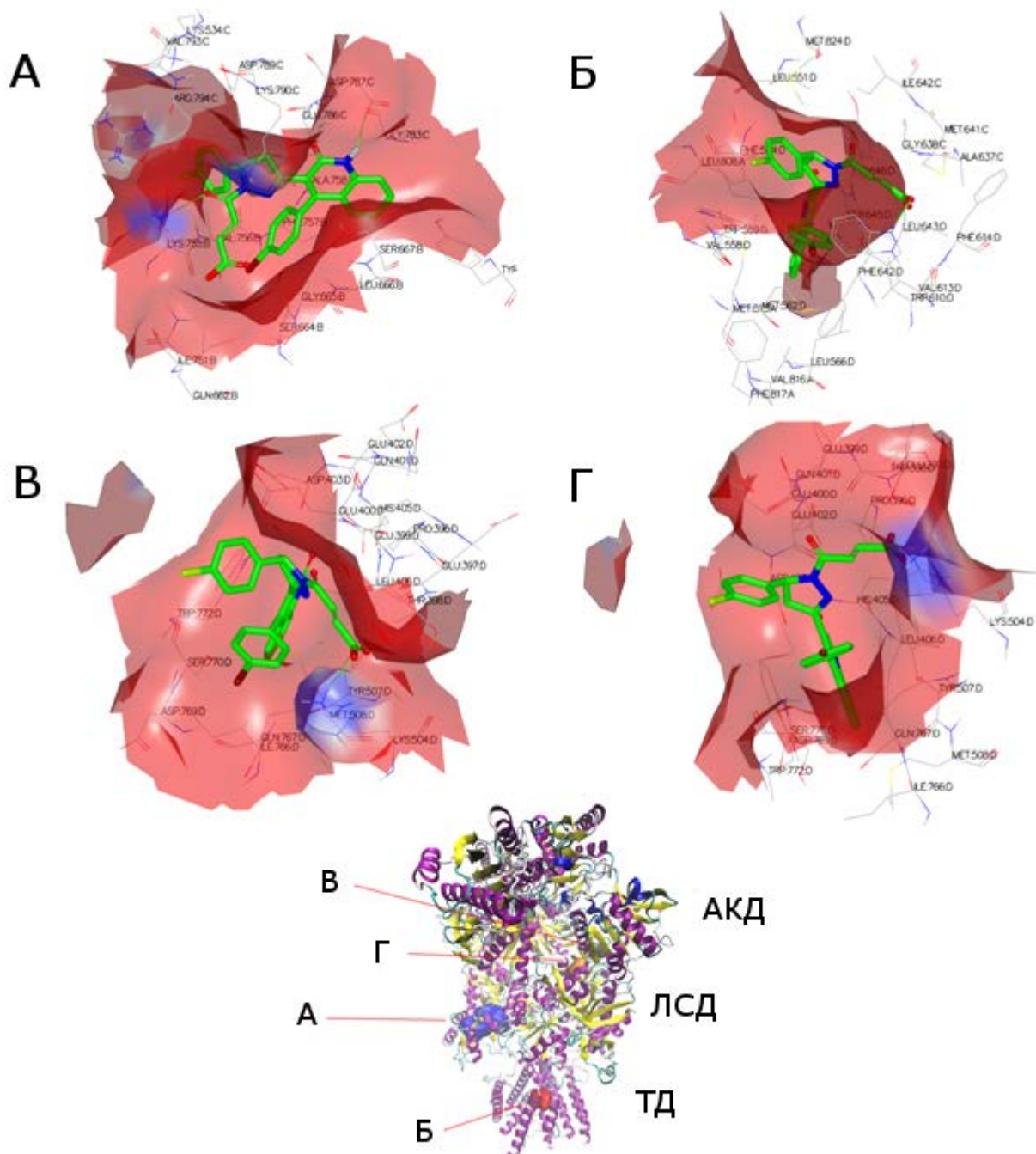


Рисунок 36. Результаты докинга соединения **59** в найденные карманы структуры GluN1/GluN2B. А, Б, В, Г — высокооцениваемые карманы связывания.

является артефактом расчетов вследствие большого числа нескомпенсированных водородных связей в данной структуре.

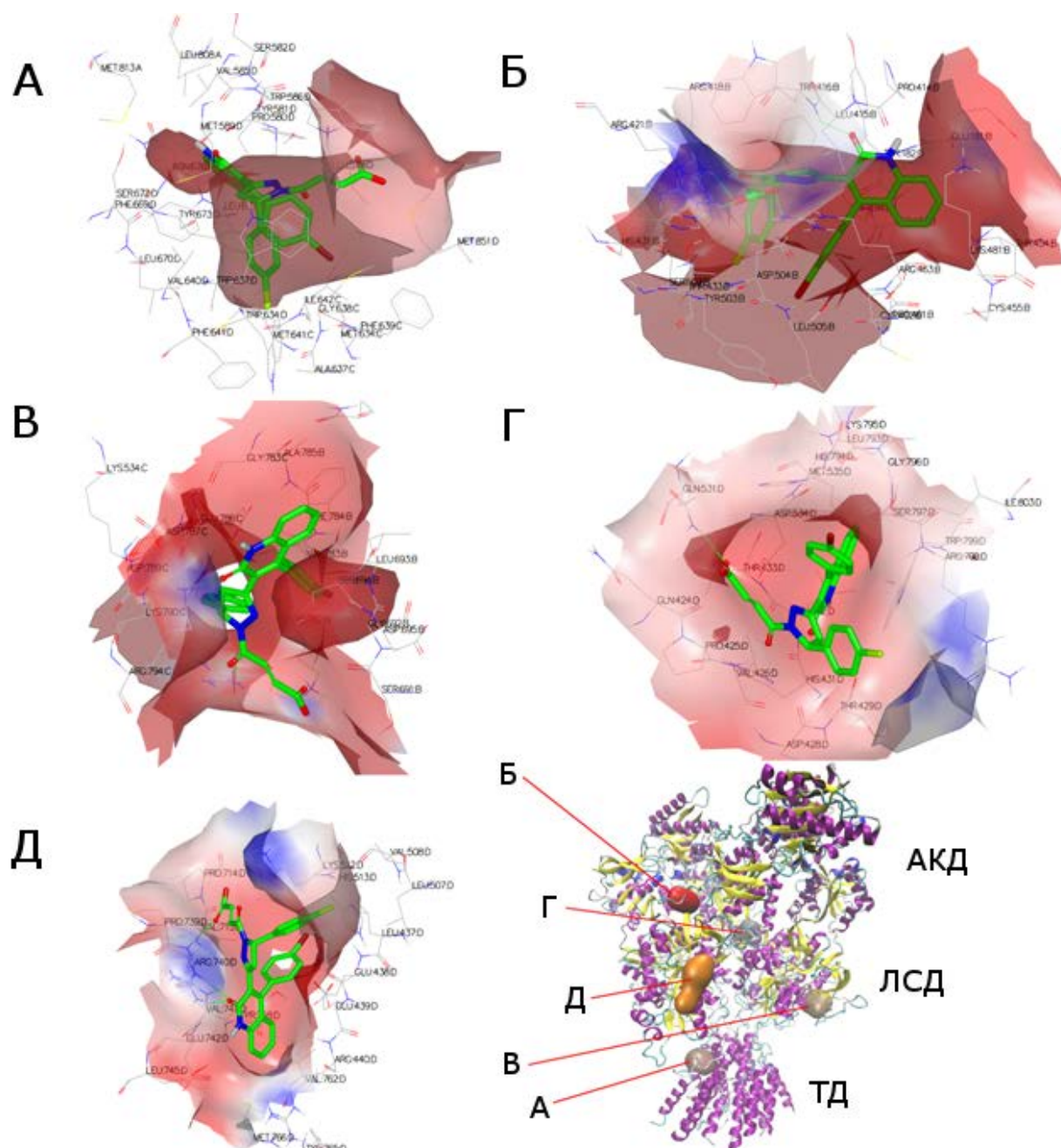


Рисунок 37. Результаты докинга соединения **59** в найденные карманы структуры GluN1/GluN2D. А, Б, В, Г, Д — высокооцениваемые карманы связывания.

Карман А находится на поверхности трансмембранного домена и соответствует карману Б для GluN1/GluN2В (рис. 36). Карман В находится между лиганд-связывающими доменами GluN2D и GluN1 и соответствует карману А на рис. 36. В этом случае карбонильная группа 2-хинолонового фрагмента образует водородную связь с протонированной аминогруппой боковой цепи K790 (GluN1), а атом кислорода амидной группы, образованной остатком фумаровой кислоты, с боковой цепью Arg794 (GluN1).



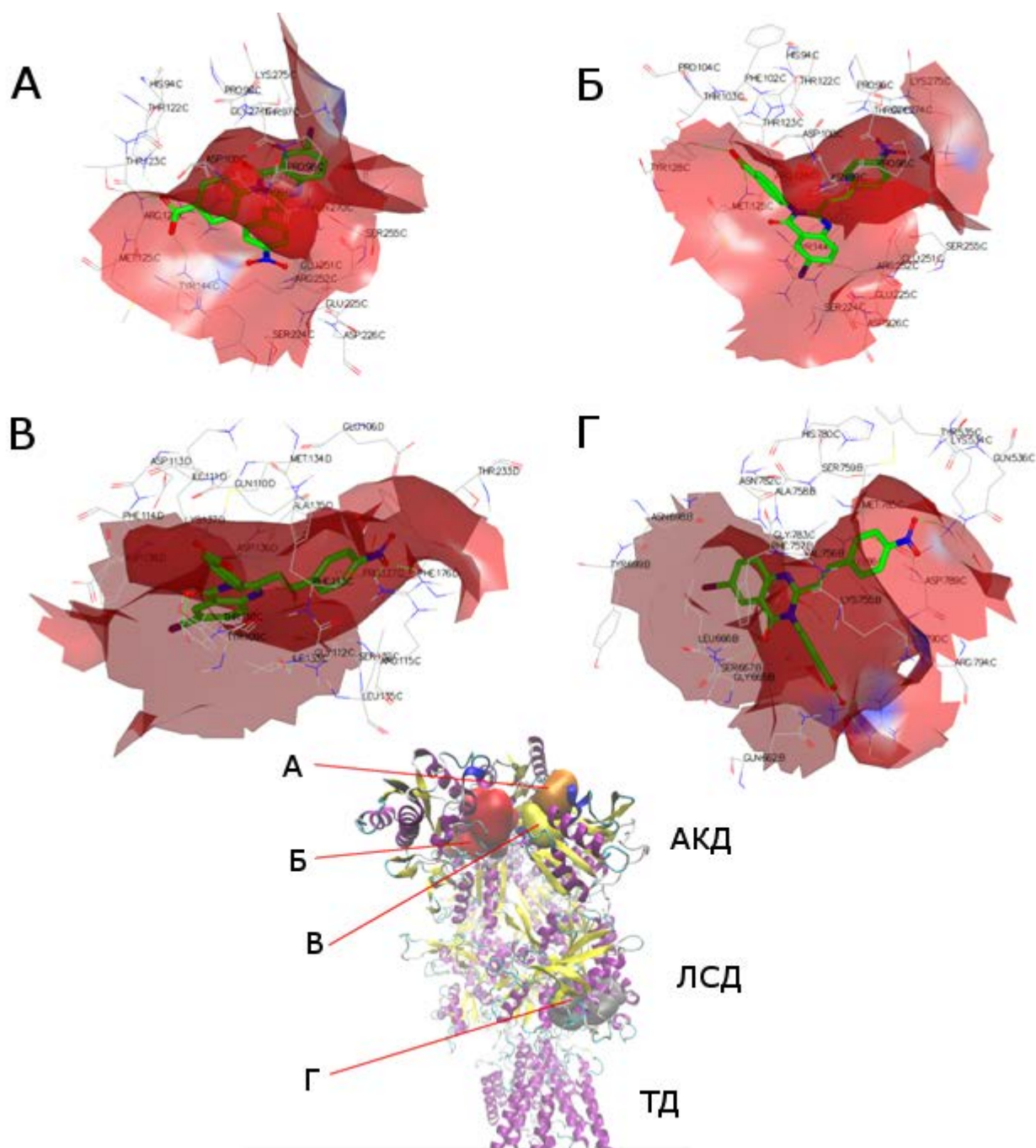


Рисунок 38. Результаты докинга соединения **58** в найденные карманы структуры GluN1/GluN2B. А, Б, В, Г — некоторые высокооцениваемые карманы связывания.

Карман Д представляет собой карман связывания глутамата и высокое значение оценочной функции для этого кармана также является артефактом расчетов.

При докинге соединения **58** в структуру GluN1/GluN2B были отобраны четыре из наиболее высокооцениваемых карманов для подробного рассмотрения.

Карман А (рис. 38) частично перекрывается с областью связывания ифенпродила и его аналогов на поверхности контакта аминоконцевых доменов

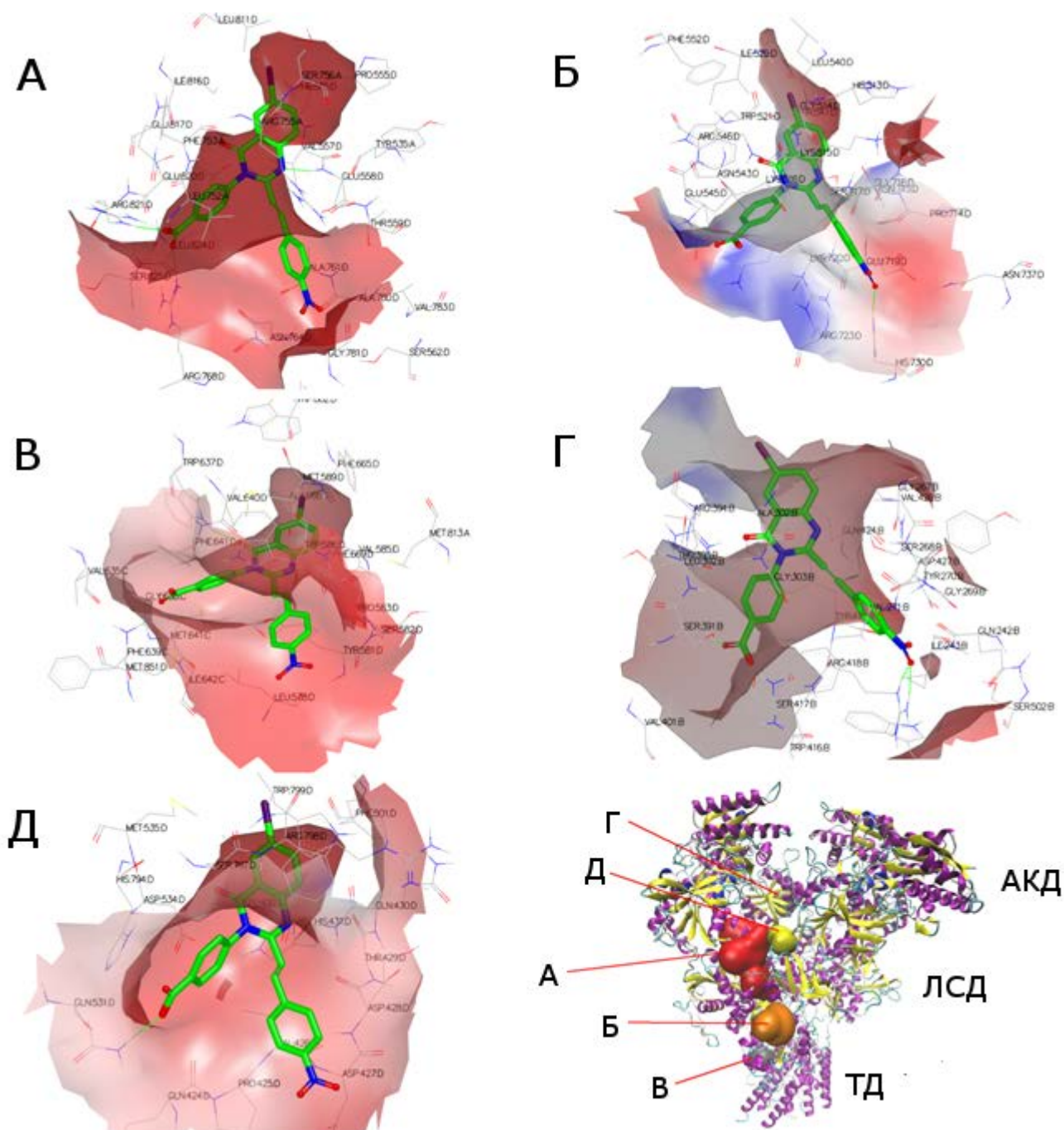


Рисунок 39. Результаты докинга соединения **58** в найденные карманы структуры GluN1/GluN2D. А, Б, В, Г —высокооцениваемые карманы связывания.

GluN1 и GluN2B. При этом отсутствуют характерные для аналогов ифенпродила контакты и взаимодействия, например, с боковой цепью Q110. Карманы Б и В расположены между долями аминоконцевого домена GluN1 и прикрыты петлей, начинающейся с Р96 и заканчивающейся на D100, при этом области связывания каждой из конформаций в значительной степени перекрываются. В случае кармана Б взаимодействия осуществляются за счет водородных связей

карбоксовой группы с боковыми цепями T123, Y128 и амидным водородом боковой цепи M125. В кармане В конформация вещества **58** совершенно иная: нитрогруппа пара-нитрофенильного фрагмента взаимодействует с Arg115 (GluN2B).

Карман Г находится между лиганд-связывающими доменами GluN1/GluN2B в связывании лиганда участвуют остатки K534 (боковая цепь которого образует водородную связь с нитрогруппой пара-нитрофенильного фрагмента), R794 (боковая цепь которого образует солевой мостик с карбоксовой группой лиганда) и, наконец, S667 (боковая цепь которого образует водородную связь с атомом кислорода карбонила гетероциклического фрагмента лиганда).

При докинге соединения **58** в структуру рецептора GluN1/GluN2D для подробного рассмотрения были отобраны пять из наиболее высокооцениваемых карманов (рис. 39). Карманы Г и Д находятся на стыке между аминоконцевым и лиганд-связывающим доменами и образованы соединяющими их петлями. Карман Б представляет собой сайт связывания глицина, который частично заполняется бромфенильным фрагментом лиганда и, скорее всего, не является истинным сайтом связывания. Карман А (рис. 39) находится на поверхности контакта лиганд-связывающих доменов GluN1 и GluN2D, однако несколько отличается от ранее рассмотренных тем, что находится ближе к оси симметрии второго порядка в рецепторе. Структура лиганд-рецепторного комплекса поддерживается за счет водородных связей между карбоксовой группой лиганда и боковыми цепями R768 и R821 (GluN2D). Также имеет место водородная связь между амидным атомом водорода боковой цепи E558 (GluN2D) и третичной аминогруппой гетероцикла лиганда.

Таким образом, следует отметить, что найденные сайты связывания согласуются с данными мутагенеза о местонахождении области связывания лигандов данных классов. Эти результаты можно использовать для дизайна лигандов с более высокой активностью.

### **3.5. Построение модели MFTA для анализа выборки отрицательных модуляторов**

Несмотря на то, что удалось добиться определенного успеха в нахождении сайта связывания соединений **58** и **59**, построение модели связи структура – активность методами 3D-QSAR оказывается затруднительным вследствие сложности нахождения оптимального наложения трехмерных структур лигандов. Поэтому анализ выборки отрицательных модуляторов, селективных к GluN2C- и GluN2D-содержащим рецепторам был проведен топологическими методами.

Применение топологических подходов, в частности, метода MFTA [235], целесообразно в случае большого числа возможных конформаций исследуемых молекул, а также при возможности существования индуцированного соответствия лиганда. Программа MFTA разработана на Химическом факультете МГУ. В отличие от методов 3D QSAR, в методе MFTA производится построение молекулярного суперграфа, при этом каждая структура из исследуемой выборки представляет собой подграф построенного суперграфа. В зависимости от размеров суперграфа строится матрица дескрипторов и производится статистический анализ методом PLS. Размер выборки составил 94 структуры [113]. В качестве дескрипторов использовались атомные заряды Гастайгера и ван-дер-ваальсовы радиусы атомов. Для оценки предсказательной способности модели использовали перекрестный контроль с исключением 25% выборки.

По результатам анализа (рис. 40) можно сделать вывод, что присутствие положительно заряженных объемных групп в стирильном фрагменте может увеличить модулирующую активность к GluN2C-содержащим рецепторам. В то же время присутствие полярных групп, таких как COOH, COOR, CONH<sub>2</sub> в фенильном фрагменте способствует увеличению активности и селективности к GluN2D-содержащим рецепторам.

Статистические характеристики построенных моделей представлены в таблице 10. Следует отметить, что для активности в отношении GluN1/GluN2A и GluN1/GluN2B получаются менее качественные модели вследствие меньшего количества качественных данных и более узкого интервала значений активности.

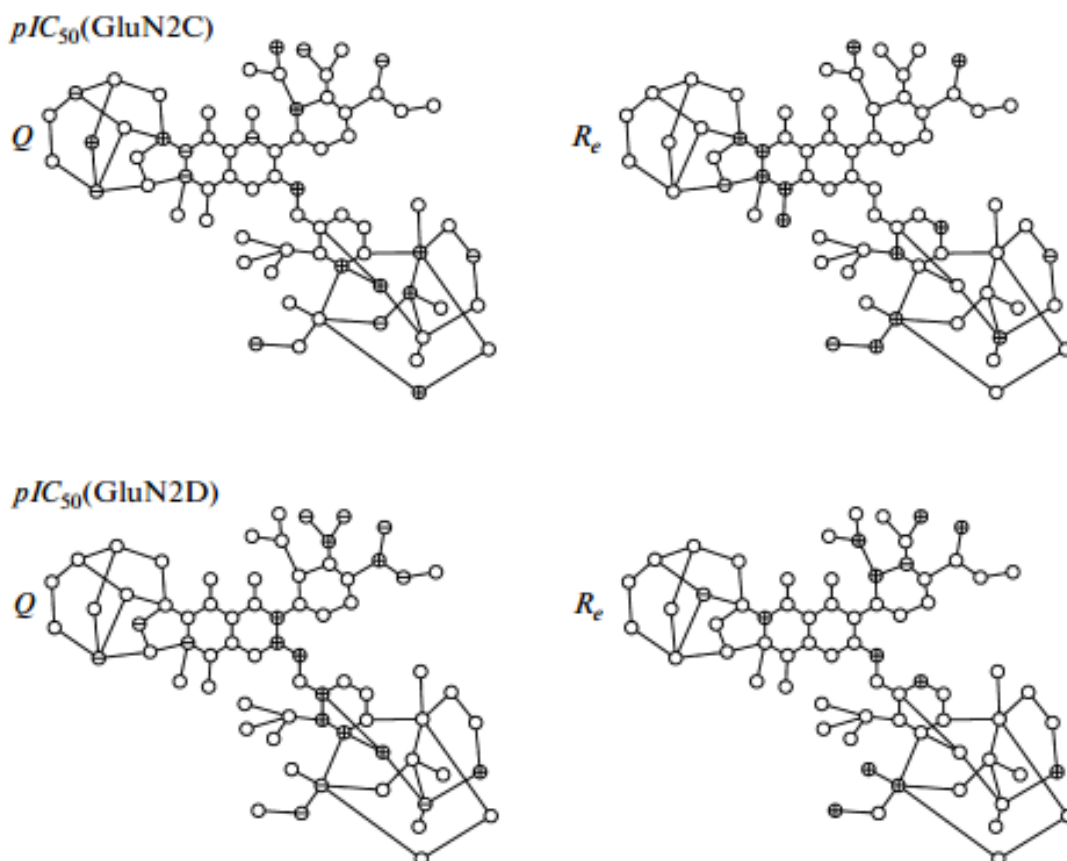


Рисунок 40. Карты влияния локальных молекулярных дескрипторов на модулирующую активность хинозалин-4-онов относительно GluN1/GluN2C и GluN1/GluN2D. Q – эффективный заряд на атоме, рассчитанный методом Гастайгера, а  $R_e$  – ван-дер-ваальсов радиус атома. «+» означает, что для улучшения значения активности необходимо увеличить значение соответствующего дескриптора, а «-» – уменьшить его.

Таблица 10. Статистические параметры построенных MFTA-моделей.

Тип активности	Число компонент	$r^2$	$q^2$	RMSE <sub>cv</sub>
pIC <sub>50</sub> (GluN1/GluN2A)	5	0.69	0.38	0.51
pIC <sub>50</sub> (GluN1/GluN2B)	4	0.58	0.32	0.54
pIC <sub>50</sub> (GluN1/GluN2C)	6	0.78	0.47	0.56
pIC <sub>50</sub> (GluN1/GluN2D)	4	0.70	0.42	0.63

## Глава 4. Фармакофорная гипотеза для положительных аллостерических модуляторов AMPA-рецепторов

### 4.1. Отбор структур для построения фармакофора

В отличие от подтипов NMDA-рецептора подтипы AMPA- и каинатных рецепторов различаются величинами ионных токов для разных ионов [236]. Например, ионы кальция значительно хуже проходят через каналы большинства подтипов AMPA-рецептора по сравнению с NMDA-рецепторами, так что активация данных рецепторов не должна вызывать процессов эксайтотоксичности. Таким образом, для компенсации ингибирования токов через NMDA-рецепторы может быть полезной разработка молекул, усиливающих токи через AMPA-рецептор, так как очень часто данные типы глутаматных рецепторов локализованы совместно. К настоящему моменту накоплено значительное количество данных о скаффолдах, локализации сайтов связывания и фармакологических эффектах таких лигандов. Увеличение токов через AMPA-рецептор ведет к повышению экспрессии факторов роста нервной ткани, что приводит к улучшению памяти и когнитивных функций. Сайт связывания положительных аллостерических модуляторов (ПАМ) находится на поверхности контакта между лиганд-связывающими доменами. К настоящему моменту известно около 25 кристаллических структур ПАМ (таблица 11) в комплексе с лиганд-связывающими доменами. Следует отметить, что активность ПАМ варьируется в достаточно широком диапазоне значений, что должно позволить построение хороших моделей 3D-QSAR.

Как правило, для построения фармакофора используют наложение нескольких наиболее активных лигандов. В случае ПАМ эта задача не так проста, так как неочевидно, при каких условиях (занятость определенных частей сайта связывания, наличие определенных функциональных групп) достигается максимальная активность. Для решения этой задачи было построено несколько моделей CoMFA.

## 4.2. Анализ выборки лигандов методом CoMFA

Для количественной оценки необходимости присутствия определенных элементов в фармакофоре был выполнен статистический анализ данных методом CoMFA. В работе [246] было проведено тщательное изучение влияния метода наложения структур из исследуемой выборки на статистические параметры исследуемой модели. Авторами найдено, что наилучшие значения коэффициентов перекрестного контроля достигаются при наложении кристаллических структур белок-лиганд, тем не менее наибольшее значение  $q^2$  для построенных моделей не превышало 0.4. Нами была поставлена задача улучшить это значение и, таким образом, отобрать необходимые структурные особенности для рационального построения фармакофора ПАМ.

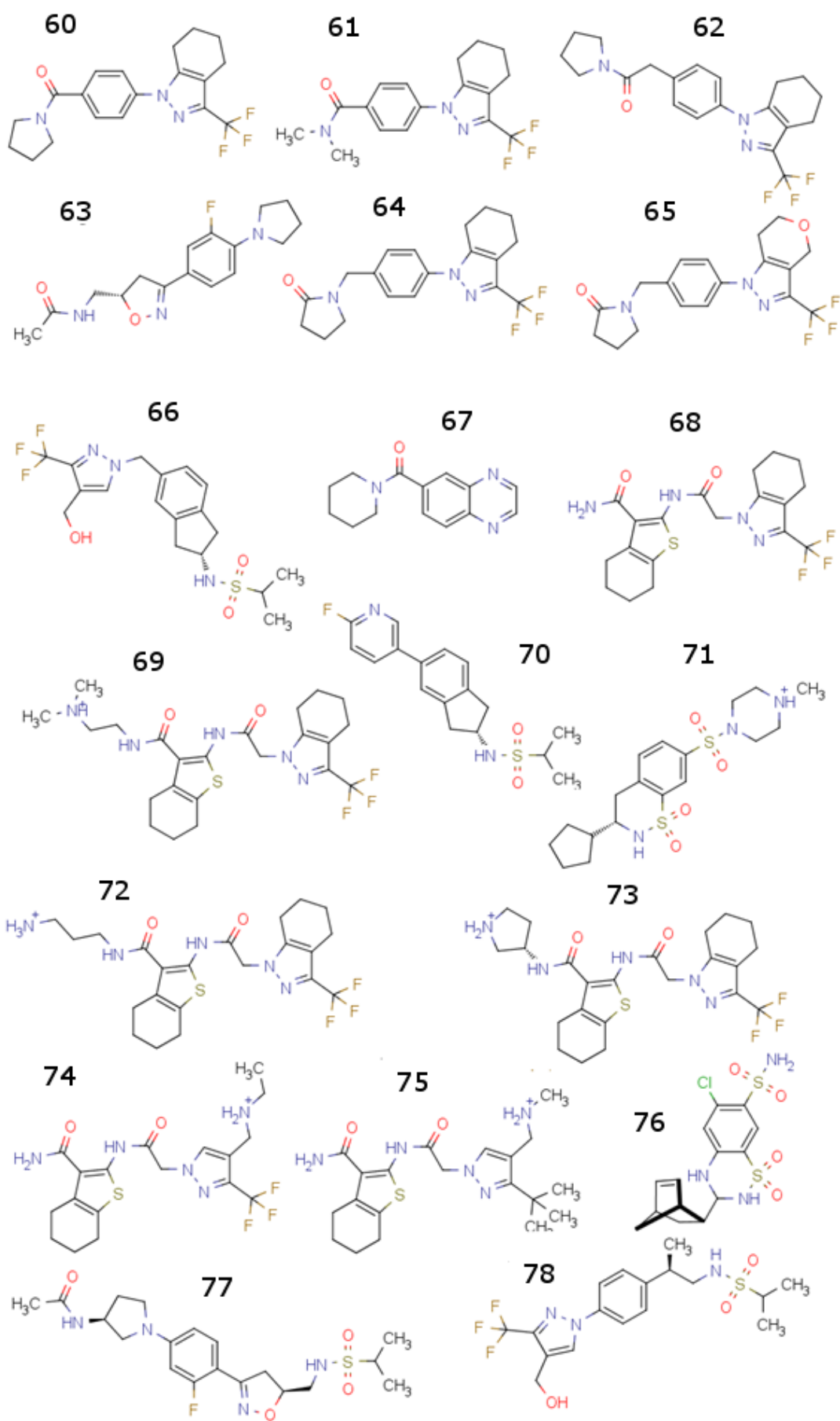
Все известные структуры ПАМ можно разделить условно на 2 группы. К первой можно отнести лиганды, которые образуют комплекс с димером лиганд-связывающего домена в соотношении 1:1, а ко второй — те, которые образуют комплекс с димером лиганд-связывающего домена в соотношении 2:1 (структуры **71, 76, 80, 84**, таблица 11). Простое объединение этих выборок не приводит к хорошим результатам (модели 1-6, таблица 12) - максимальное значение  $q^2$  составляет лишь 0.4. Удаление этих структур из обучающей выборки приводит к значительному улучшению модели и повышению коэффициента перекрестного контроля (модели 13-18, таблица 12). Однако такой подход приводит к ограничению применимости данной модели только к лигандам, относящимся к первой группе. Наконец, так как модель CoMFA учитывает электростатические и дисперсионные вклады в энергию Гиббса связывания белок-лиганд, то энтропийные эффекты этим подходом не учитываются и некоторая доля вариации в данных остается необъясненной.

При связывании одной молекулы лиганда происходит потеря поступательной, вращательной и колебательной энтропии, если же связываются две молекулы — потери возрастают примерно в два раза. При добавлении факторной переменной «число связанных лигандов» и включении ее в регрессион-

Таблица 11. Структуры лигандов, использованные в работе.

Номер соединения	Разрешение, Å	Код PDB	pEC <sub>50</sub> связанного лиганда	Литература
<b>60</b>	2.2	2XX7	5.0	[245]
<b>61</b>	1.55	2XX8	4.6	[245]
<b>62</b>	1.97	2XX9	6.0	[245]
<b>63</b>	2.1	4LZ7	5.35	[237]
<b>64</b>	1.5	2XXH	5.5	[245]
<b>65</b>	1.6	2XXI	5.0	[245]
<b>66</b>	2.2	3PMW	6.3	[242]
<b>67</b>	2.0	4IY5	3.8	[238]
<b>68</b>	2.0	3O28	6.7	[240]
<b>69</b>	2.2	3O29	5.2	[240]
<b>70</b>	1.8	2XHD	5.6	[247]
<b>71</b>	2.1	3H6V	4.4	[239]
<b>72</b>	1.9	3O2A	6.4	[240]
<b>73</b>	1.8	3O6G	6.6	[241]
<b>74</b>	2.1	3O6H	6.1	[241]
<b>75</b>	1.8	3O6I	6.5	[241]
<b>76</b>	2.25	3H6T	5.0	[239]
<b>77</b>	1.85	4LZ8	8.0	[237]
<b>78</b>	1.8	3PMV	6.3	[242]
<b>79</b>	1.87	3PMX	6.0	[242]
<b>80</b>	1.85	3H6U	4.6	[239]
<b>81</b>	1.5	4LZ5	6.5	[237]
<b>82</b>	1.7	3RN8	6.9	[243]
<b>83</b>	1.75	3RNN	7.3	[243]





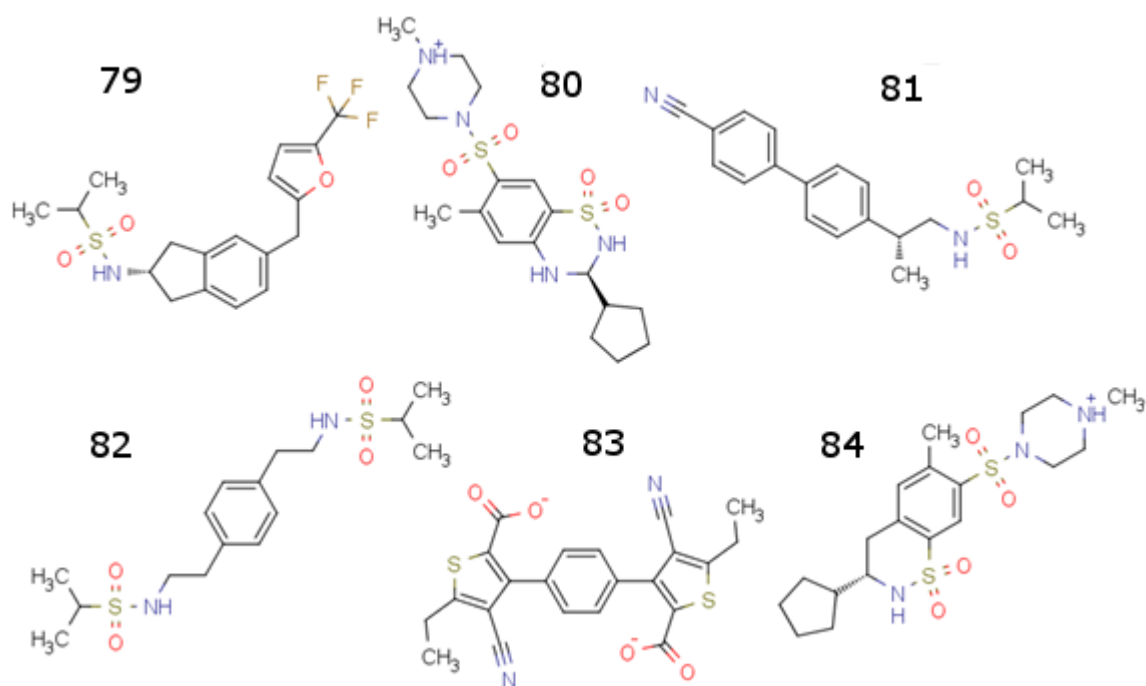


Таблица 12. Построенные модели CoMFA для ПАМ АМРА-рецептора.

Номер модели	Включенные в выборку данные	Схема расчета атомных зарядов	$q^2$	$r^2$	Стандартная ошибка предсказания рЕС50	Примечание
1	Все структуры	Гастайгер	0.40	0.72	0.53	-
2		Гастайгер-Хюккель	0.35	0.72	0.54	
3		Дель Ре	0.39	0.88	0.36	
4		Пюльман	0.35	0.89	0.33	
5		ММFF94	0.38	0.73	0.52	
6		Формальные заряды	0.30	0.64	0.61	
7	Все структуры	Гастайгер	0.53	0.87	0.37	Добавлен член, компенсирующий энтропию
8		Гастайгер-Хюккель	0.51	0.72	0.53	
9		Дель Ре	0.55	0.86	0.39	
10		Пюльман	0.49	0.73	0.53	
11		ММFF94	0.57	0.85	0.37	
12		Формальные заряды	0.39	0.72	0.54	

13	Все структуры кроме <b>71, 76, 80, 84</b>	Гастайгер	0.42	0.67	0.55
14		Гастайгер-Хюккель	0.35	0.66	0.56
15		Дель Ре	0.46	0.81	0.43
16		Пюльман	0.36	0.66	0.56
17		MMFF94	0.53	0.85	0.38
18		Формальные заряды	0.13	0.52	0.67

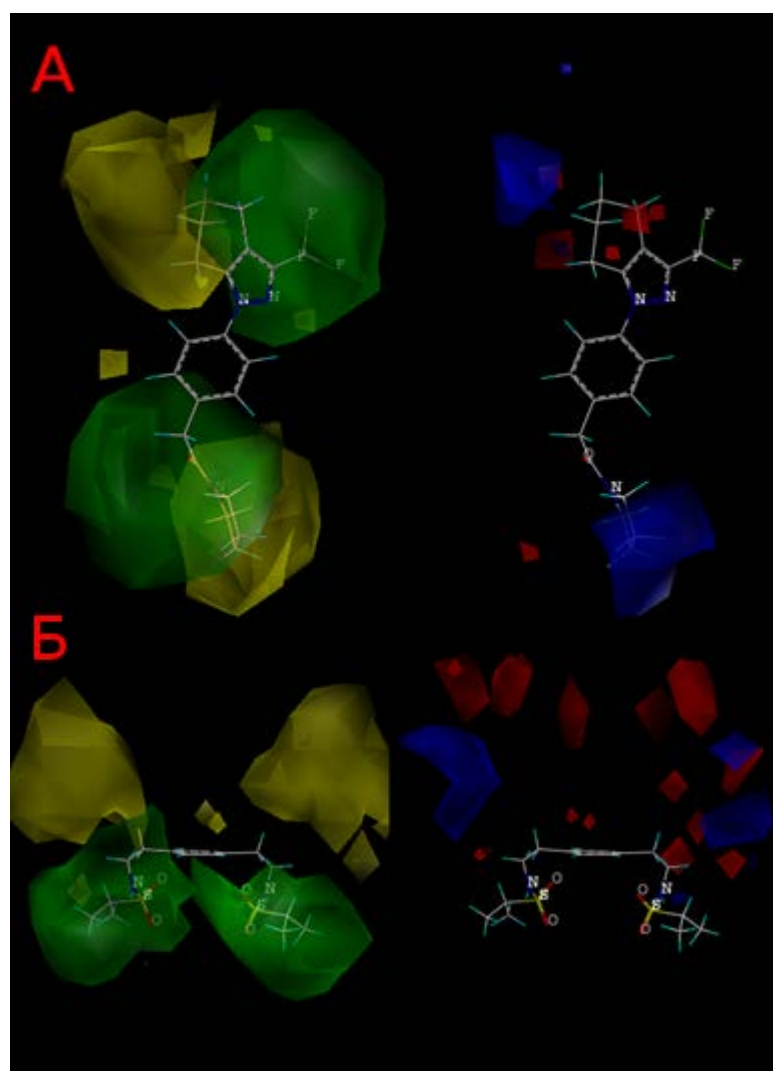


Рисунок 41. Визуализация карт влияния ван-дер-ваальсова и электростатического потенциала с наложением лиганда **62**(А) и симметричного лиганда **83** (Б) . (А — вид «сверху», Б — вид «сбоку») Желтым цветом обозначены неблагоприятные стерические контакты, зеленым — благоприятные. Красным цветом выделены участки, где выгодно наличие отрицательно заряженных групп лиганда, а синим — положительно заряженных.

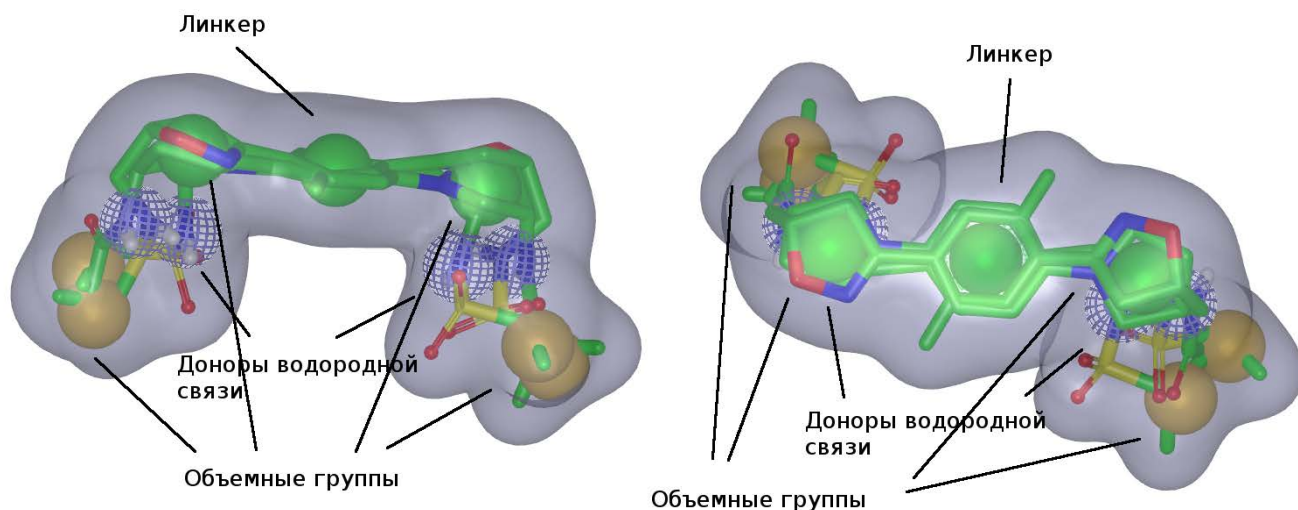


Рисунок 42. Фармакофорное наложение положительных модуляторов AMPA-рецептора.

ное уравнение наилучшее значение  $q^2$  возрастает до величины 0.57 (модели 7-12, таблица 12), что является показателем модели, имеющей достаточно хорошую предсказательную силу.

Далее нами была проведена оценка влияния схемы расчета зарядов на качество построенных моделей. Наилучшей предсказательной силой обладают модели, построенные с применением зарядов MMFF94, что хорошо согласуется с данными работы [247]. Следует отметить, что наихудшие модели получаются с использованием формальных атомных зарядов.

При анализе карт влияния ван-дер-ваальсова и электростатического потенциала (рис. 41) видно, что зоны, где выгодно размещение фрагментов лигандов (зеленый цвет), четко повторяют форму симметричных карманов, образованных остатками I92, K104, P105, K218, L239, N242. А карта нежелательного присутствия атомов лиганда соответствует расположению пар остатков S108 и S217, там же выгодно наличие отрицательного заряда.

### 4.3. Валидация фармакофора

Для построения фармакофора выбирали 2 лиганда, для которых  $pEC_{50} > 7.0$  и которые в наибольшей степени перекрывают область выгодного ван-дер-ваальсова потенциала (рис. 41). На рис. 42 представлено наложение некоторых

структур лигандов и фармакофор, построенный с помощью программы vROCS. При построении фармакофора учитывались доноры водородной связи, которые в кристаллических структурах образуют водородные связи с карбонильным атомом кислорода P105 и присутствуют во всех высокоактивных лигандах.

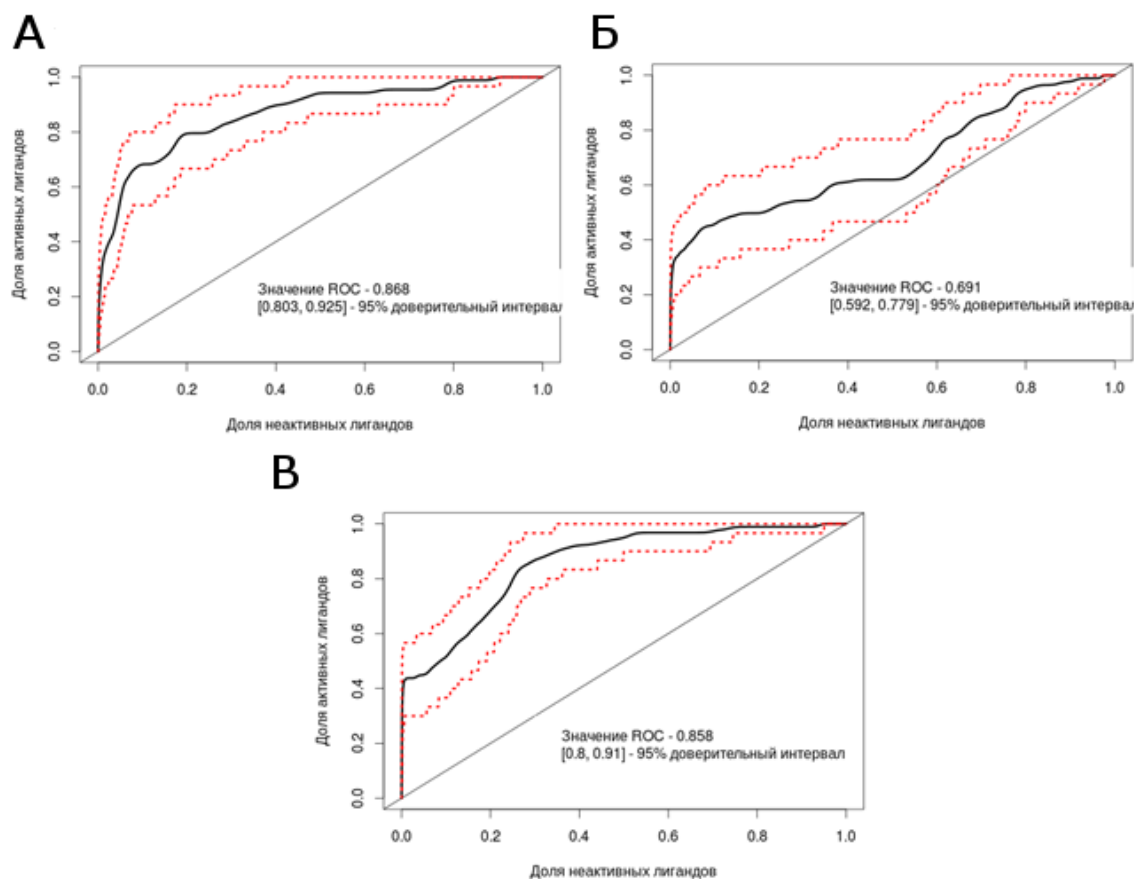


Рисунок 43. ROC-кривые. А — для ранжирования использован классификатор, учитывающий только форму молекул ( $AUC = 0.87$ , TanimotoShape). Б — использован классификатор, учитывающий только данные о положении фармакофорных элементов ( $AUC = 0.69$ , TanimotoColor). В — использован классификатор, учитывающий и форму и положение фармакофорных элементов ( $AUC = 0.86$ , TanimotoCombo).

Как можно видеть на рис. 43, классификация по положению фармакофорных элементов оказывается не очень удачной (значение  $AUC$  равно 0.69), а значения площади под кривой оказываются одинаковыми и для классификатора по форме, и для комбинированного классификатора. Однако ROC-кривая для классификатора по форме возрастает несколько быстрее.

Результаты, представленные в данной главе, позволяют обобщить данные об активности ПАМ АМРА-рецептора для идентификации новых ПАМ.

## Глава 5. Моделирование молекулярной динамики для комплексов ПАМ и лиганд-связывающих доменов GluA2-подтипа AMPA-рецепторов

### 5.1. Расчет энтальпий связывания

Целью данной части работы было выявить различия в динамике поведения различных положительных аллостерических модуляторов AMPA-рецептора и предложить модель, способную предсказать аффинность модуляторов на основании молекулярно-динамических расчетов. В связи с этим методом молекулярной динамики было изучено поведение комплексов ПАМ с димером лиганд-связывающих доменов GluA2 рецептора.

Следует отметить, что практически все рассмотренные комплексы белок-лиганд оказались достаточно стабильными. Среднее значение среднеквадратичного отклонения координат лиганда от своего начального положения лежат в пределах от 0.8 до 1.8 Å, то есть значительные отклонения для координат исследованных лигандов отсутствуют.

С точки зрения молекулярной фармакологии действие ПАМ проявляется за счет замедления процесса деактивации (диссоциации лиганд-рецепторного комплекса) и предотвращения десенситизации (изменения конформации лиганд-рецепторного комплекса, при котором агонист оказывается связанным, а ионный ток протекать не может).

В качестве рассчитываемых величин здесь приводятся энергии MM-PB(GB)SA, факт открытия лиганд-связывающего домена, энергия связывания мономеров лиганд-связывающих доменов в димере. Моделирование молекулярной динамики было проведено для всех комплексов из таблицы 11, а также для димеров лиганд-связывающих доменов как в отсутствии глутамата, так и в комплексе с ним.

В таблице 13 представлены результаты расчета энтальпий связывания ПАМ на поверхности контакта лиганд-связывающих доменов GluA2 рецептора. Были рассчитаны значения энтальпий связывания лиганда и димера, а также мономеров в димере методами MM-PBSA и MM-GBSA. Степень корреляции между

рассчитанными значениями отражена на рис. 43. В таблице 14 приведены статистические параметры построенных моделей.

Таблица 13. Результаты расчета энтальпий связывания лиганд-связывающих доменов GluA2 рецепторов с некоторыми ПАМ методами ММ-PBSA и ММ-GBSA и энтропийных вкладов.

Номер (рис. 44)	Номер структуры	Код PDB	RMSD	pEC <sub>50</sub>	$\Delta H_1^a$	$\Delta H_2^b$	$\Delta H_3^b$	$\Delta H_4^r$	T $\Delta S^d$	$\Delta H_1-$ T $\Delta S^c$	$\Delta H_2-$ T $\Delta S^k$	$\Delta H_2+$ T $\Delta S^3$	$\Delta H_2+$ T $\Delta S^h$
1	<b>60</b>	2XX7	1.00	5.0	-40.5	5.9	-7.6	38.6	-23.1	-17.4	29.0	-63.6	-17.2
2	<b>61</b>	2XX8	0.90	4.6	-36.9	3.3	-9.9	25.9	-21.3	-15.6	24.6	-58.2	-18.0
3	<b>62</b>	2XX9	0.92	6.0	-39.4	4.3	2.5	43.4	-20.6	-18.8	24.9	-60.0	-16.3
4	<b>64</b>	2XXH	0.95	5.5	-39.9	5.7	-0.6	33.0	-21.2	-18.7	26.9	-61.1	-15.5
5	<b>65</b>	2XXI	0.95	5.0	-39.8	4.6	-0.9	41.2	-14.4	-25.4	29.0	-54.2	-9.8
6	<b>76</b>	3H6T		5.0	-30.7	9.5	-15.8	24.6	-28.5	-2.2	38.0	-59.2	-19.0
7	<b>80</b>	3H6U	1.04	4.6	-37.9	22.0	-7.7	28.1	-17.7	-20.2	39.7	-55.6	4.3
8	<b>71</b>	3H6V		4.3	-33.8	17.6	-24.3	10.9	-15.4	-18.4	33.0	-49.2	2.2
9	<b>84</b>	3H6W	1.43	4.3	-16.8	18.3	-17.2	18.2	-18.1	1.3	36.4	-34.9	0.2
10	<b>68</b>	3O28	0.83	6.7	-46.1	-2.3	7.0	38.8	-25.0	-21.1	22.7	-71.1	-27.3
11	<b>69</b>	3O29	1.41	5.2	-48.0	9.4	-12.4	35.1	-25.7	-22.3	35.1	-73.7	-16.3
12	<b>72</b>	3O2A	1.15	6.4	-62.3	-9.0	-10.0	34.3	-19.7	-42.6	10.7	-82.0	-28.7
13	<b>73</b>	3O6G	1.47	6.6	-50.9	0.7	-16.6	25.1	-29.2	-21.7	29.9	-80.1	-28.5
14	<b>74</b>	3O6H	1.25	6.1	-42.8	5.7	-18.4	32.9	-38.2	-4.6	43.9	-81.0	-32.5
15	<b>75</b>	3O6I	1.01	6.5	-43.4	8.1	-11	24.9	-24.1	-19.3	32.2	-67.5	-16.0
16	<b>78</b>	3PMV	1.08	6.3	-46.0	5.1	0.7	39.7	-32.3	-13.7	37.4	-78.3	-27.2
17	<b>66</b>	3PMW	1.08	6.3	-51.4	1.6	-9.9	33.6	-19.5	-31.9	21.1	-70.9	-17.9

18	<b>79</b>	3PMX	1.26	6.0	-47.1	0.8	-2.8	39.7	-19.9	-27.2	20.7	-67.0	-19.1
19	<b>83</b>	3RNN	1.47	7.3	-59.1	-3.7	-17.7	36.6	-26.4	-32.7	22.7	-85.5	-30.1
20	<b>82</b>	3RN8	0.92	6.9	-35.8	5.7	-29.8	7.6	-35.4	-0.4	41.1	-71.2	-29.7
21	<b>63</b>	4LZ7	1.37	5.35	-37.9	-3.7	-6.6	38.0	-18.0	-19.9	14.3	-55.9	-21.7
22	<b>77</b>	4LZ8	0.98	8.0	-55.2	-3.7	2.3	44.2	-30.1	-25.1	26.4	-85.3	-33.8
23	<b>67</b>	4IY5	0.29	3.8	-26.7	0.5	-13.8	46.3	-14.2	-12.5	14.7	-40.9	-13.7
24	<b>70</b>	2XHD	1.74	5.6	-36.5	3.7	-9.8	28.9	-15.7	-20.8	19.4	-52.2	-12.0
25	<b>81</b>	4LZ5	1.59	6.5	-52	-2.7	-0.7	44.0	-25.2	-26.8	22.5	-77.2	-27.9
26	-	Димер без лиганда	-	-	-	-	-21.9	16.6	-	-	-	-	-
27	-	Димер без лиганда и глутамата	-	-	-	-	-2.2	40.1	-	-	-	-	-

<sup>а</sup>  $\Delta H_1$  – Энтальпия связывания лиганда и димера (GBSA), ккал/моль

<sup>б</sup>  $\Delta H_2$  – Энтальпия связывания лиганда и димера (PBSA), ккал/моль

<sup>в</sup>  $\Delta H_3$  – Энтальпия связывания мономеров в димере (GBSA), ккал/моль

<sup>г</sup>  $\Delta H_4$  – Энтальпия связывания мономеров в димере (PBSA), ккал/моль

<sup>д</sup>  $T\Delta S$  – Изменение энтропии при образовании комплекса димера ЛСД с лигандом, ккал/моль

<sup>е</sup>  $\Delta H_1 - T\Delta S$  – Рассчитанное значение  $\Delta G$  (GBSA), ккал/моль

<sup>ж</sup>  $\Delta H_2 - T\Delta S$  – Рассчитанное значение  $\Delta G$  (PBSA), ккал/моль

<sup>з</sup>  $\Delta H_1 + T\Delta S$  – Суммарное значение энтальпии и энтропии (GBSA), ккал/моль

<sup>и</sup>  $\Delta H_2 + T\Delta S$  – Суммарное значение энтальпии и энтропии (PBSA), ккал/моль

Из рис. 44 видна значимая корреляция между рассчитанными значениями величин энтальпий связывания и литературными данными для  $pEC_{50}$  ПАМ. Интересно, что коэффициент корреляции, полученный при расчете энергии сольватации методом GBSA оказывается значительно выше, чем при расчете энергии сольватации более ресурсоемким методом PBSA. Как показано в главе 4, вклад электростатических взаимодействий в построенных QSAR-моделях оказывается невелик. Поэтому низкий коэффициент корреляции при учете



свободной энергии сольватации методом PBSA можно объяснить тем, что в данном случае использовали значение диэлектрической проницаемости  $\epsilon$ , взятое по умолчанию равным единице. При увеличении этого значения электростатический вклад уменьшается. При этом значение угла наклона в линейной модели значимо не различается. Для оценки предсказательных способностей линейных моделей использовали метод перекрестного контроля с удалением по одному. К сожалению, полученные значения стандартных ошибок

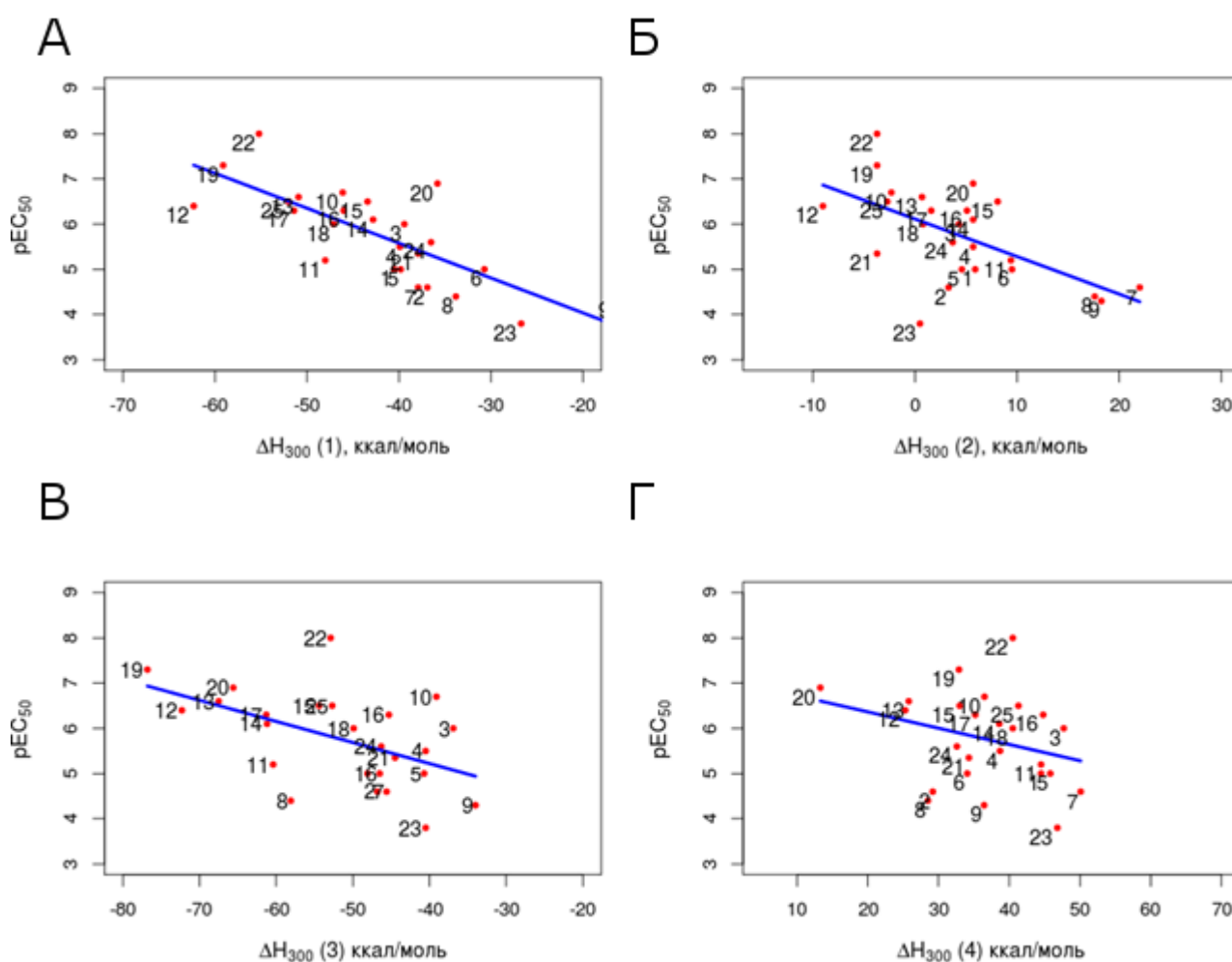


Рисунок 44. Линейные модели, построенные для предсказания  $pEC_{50}$  на основании энтальпий взаимодействия, рассчитанных методами ММ-PBSA и ММ-GBSA. Нумерация точек соответствует табл. 13. А – энтальпии связывания лиганда (ММ-GBSA), Б – энтальпии связывания лиганда (ММ-PBSA), В – сумма значений энтальпий связывания лиганда и взаимодействия мономеров лиганд-связывающего домена (ЛСД) (ММ-GBSA), Г - сумма значений энтальпии связывания лиганда и взаимодействия мономеров ЛСД (ММ-PBSA).

гораздо выше тех, что получаются при предсказании лучшими моделями, построенными методом CoMFA, которые представлены выше (таблица 11).

Следует отметить, что при добавлении к энтальпии связывания лигандов члена, отвечающего за энергию взаимодействия между димерами, уровень шума возрастает, однако при этом стандартные ошибки оказываются распределены более «нормально», судя по рассчитанному расстоянию Куллбака-Лейблера между распределением значений ошибок и стандартным нормальным распределением. Особенно это заметно для значений, рассчитанных методом MM-GBSA. Однако добавленный при этом статистический шум, по-видимому, нивелирует этот выигрыш. Наибольшее значение расстояния Куллбака-Лейблера наблюдается для модели на основе энтропии.

Расстояние Кука [248] используется для расчета влияния каждой порции данных в отдельности на ошибки предсказания всех остальных данных. Для всех четырех моделей наибольшим значением расстояния Кука обладают лиганды под номерами 20 и 21 — лиганды с наибольшим и наименьшим значением  $pEC_{50}$ , соответственно. Это свидетельствует об ограниченности набора данных в выборке лигандов с высокими и низкими значениями  $pEC_{50}$ . В то же время величины расстояния Кука недостаточно велики, чтобы считать эти точки возможными ошибками эксперимента. Для всех моделей вероятность неравенства нулю свободного члена больше 95%.

Таблица 14. Статистические параметры построенных корреляций.

Тип модели	$r^2$	Свободный член <sup>a</sup>	Коды PDB <sup>b</sup>	Наклон	Ст. ошибка. <sup>b</sup>	Расстояние Куллбака - Лейблера <sup>г</sup>
GBSA лиганд/димер	0.55	2.6	3O2A, 3RN8, 4LZ8	-0.08	0.74	0.013
PBSA лиганд/димер	0.28	3.3	4LZ7, 4LZ8, 4IY5	-0.05	0.88	0.009
GBSA	0.32	6.1	3O28, 4LZ8,	-0.08	0.91	0.005

лиганд/димер + GBSA мономер/мономер			4IY5			
PBSA лиганд/димер + PBSA мономер/мономер	0.15	7.6	2XX8, 4LZ8, 4IY5	-0.05	0.98	0.006
GBSA лиганд/димер - энтропия	0.10	5.0	3RN8, 4LZ8, 4IY5	-0.04	0.97	0.009
PBSA лиганд/димер - энтропия	-0.04	6.0	3RN8, 4LZ8, 4IY5	-0.004	1.05	0.010
GBSA лиганд/димер + энтропия	0.71	1.5	3H6W, 3O29, 4LZ8	-0.07	0.55	0.018
PBSA лиганд/димер + энтропия	0.6	4.3	3H6U, 4LZ8, 4IY5	-0.08	0.64	0.010
энтропия	0.34	3.5	3O6H, 4LZ8, 4IY5	-0.10	0.83	0.030

<sup>a</sup> – значение свободного члена линейной модели

<sup>b</sup> – коды PDB трех лигандов с максимальным значением расстояния Кука в данной модели

<sup>B</sup> – стандартная ошибка для перекрестного контроля (LOO)

<sup>r</sup> – расстояние Куллбака - Лейблера между остатками и центрированной нормированной случайной величиной

Следует отметить, что энергия взаимодействия димеров лиганд-связывающих доменов существенно различается для траекторий с ПАМ и для траектории без лиганда. При этом в отсутствие глутамата энергия взаимодействия между мономерами лиганд-связывающего домена оказывается существенно меньше. Корреляция между энергиями взаимодействия димеров и  $rES_{50}$

отсутствует (вероятность равенства нулю коэффициента наклона и свободного члена 0.67 и 0.89 согласно t-тесту, соответственно).

Учет энтропийных вкладов выполнялся в программе NABNMODE, входящей в программный комплекс Amber 14. Вследствие особенностей алгоритма расчета энтропии, таких как низкая эффективность распараллеливания задачи, значительное пиковое потребление оперативной памяти, для усреднения величины энтропийного вклада использовали от 3 до 4 кадров траектории. В

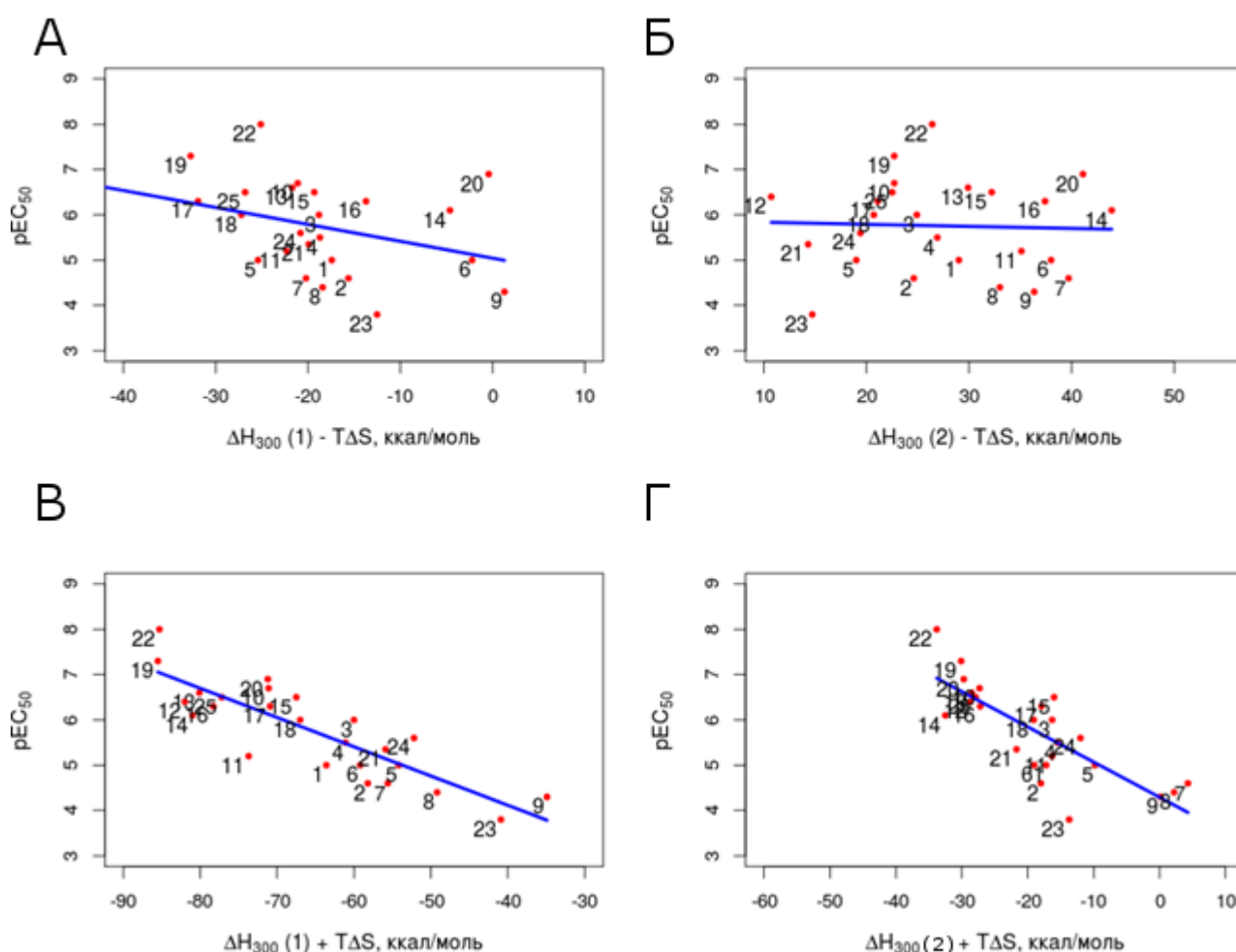


Рисунок 45. Линейные модели, построенные для предсказания  $pEC_{50}$  на основании свободных энергий взаимодействия, рассчитанных методами ММ-PBSA и ММ-GBSA. Нумерация точек соответствует табл. 13. А – свободные энергии связывания лиганда (ММ-GBSA), Б – свободные энергии связывания лиганда (ММ-PBSA), В – сумма значений энтальпии связывания лиганда и взаимодействия мономеров ЛСД (ММ-GBSA), Г - сумма значений энтальпии связывания лиганда и взаимодействия мономеров ЛСД (ММ-PBSA). Нумерация точек соответствует табл. 13.

результате учет энтропийного вклада в свободную энергию связывания не приводит к улучшению коэффициента корреляции, как показано на рис. 44 А, Б. В то же время прибавление энтропийного члена (рис. 44 В, Г) приводит к существенному увеличению коэффициента корреляции. Данный факт можно частично объяснить тем, что для самого активного соединения из этой выборки (77) и наименее активного соединения (78) из-за структурных особенностей потеря в энтропии, случайным образом, оказывается высокой и невысокой, соответственно, что приводит к увеличению коэффициента корреляции. Существенная сложность расчета энтропии и отсутствие улучшения корреляции делает нецелесообразным учет энтропийной составляющей при расчете свободной энергии связывания методами MM-G(P)BSA. Следует отметить, что значения энтропии связывания рассмотренных лигандов имеют вполне значимую корреляцию с величиной  $rEC_{50}$ .

## 5.2. Особенности механизма открытия лиганд-связывающего домена

В процессе моделирования молекулярной динамики димеров лиганд-связывающего домена GluA2 – подтипа AMPA рецептора в комплексе с различными модуляторами в некоторых случаях наблюдаются конформационные изменения, которые могут быть охарактеризованы как процессы открытия/закрытия лиганд-связывающих доменов. В таблице 15 приведены данные о конформационных изменениях в моделируемых структурах.

Таблица 15. Данные о конформационных изменениях лиганд-связывающих доменов. Символы «+» и «-» означают наличие соответствующего конформационного изменения в одном из доменов.

Номер лиганда	Код PDB	Конформация мономер1 / мономер2	Конформационные изменения петли, содержащей остатки 672-674	Конформационные изменения петли, содержащей остатки 745-746	Конформационные изменения петли, содержащей остаток 472
1	2XX7	Частично открыт / закрыт	+ / -	- / +	- / -

2	2XX8	открыт / закрыт	+ / -	- / +	+ / -
3	2XX9	открыт / закрыт	+ / -	- / +	+ / -
4	2XXH	открыт / закрыт	+ / -	+ / +	+ / -
5	2XXI	открыт / закрыт	+ / -	+ / +	+ / -
6	3H6U	частично открыт / закрыт	+ / -	- / +	+ / -
7	3H6W	открыт / закрыт	+ / -	- / +	+ / -
8	3O28	закрыт / закрыт	+ / -	+ / +	- / -
9	3O29	закрыт / закрыт	- / -	- / -	- / -
10	3O2A	открыт / закрыт	- / -	+ / +	+ / -
11	3O6G	открыт / закрыт	+ / -	- / +	+ / -
12	3O6H	Частично открыт / закрыт	+ / -	- / +	- / -
13	3O6I	Частично открыт / закрыт	+ / -	- / +	- / -
14	3PMV	Открыт частично / открыт	- / -	- / +	- / -
15	3PMX	закрыт / закрыт	+ / -	+ / +	+ / -
16	3RNN	открыт / закрыт	+ / -	+ / +	+ / -
17	3RN8	открыт / закрыт	+ / -	- / +	+ / -
18	4LZ5	Частично открыт / закрыт	+ / -	- / +	- / -

19	4LZ7	открыт / закрыт	+ / -	- / +	- / -
20	4LZ8	открыт / открыт	+ / +	- / +	- / -
21	4IY5	открыт / закрыт	+ / -	- / +	+ / -
22	2XND	открыт / открыт	- / -	+ / +	+ / +
23	Димер без лиганда	открыт / закрыт	+ / -	- / +	+ / -
24	Димер без лиганда и глутамата	открыт / закрыт	+ / -	- / -	- / -

Наиболее значительные и визуально заметные конформационные изменения представляют собой процессы открытия лиганд-связывающего домена. Данные события происходят практически во всех случаях моделирования молекулярной динамики. На рис. 46 приведены начальные и конечные конформации. Интересно, что чаще всего процесс открытия наблюдается лишь в одном из доменов. Следует отметить, что вероятность открытия в данном случае никак не зависит от значения  $pEC_{50}$  лиганда. Полностью закрытыми остаются лишь структуры 3O28 и 3O29 (с лигандами **68** и **69**, соответственно).

Конформационные изменения остатков основной цепи происходят в петлях, содержащих остатки 472, 672-674 и 745-746, типичные области изменения значений торсионных углов  $\phi$  и  $\psi$  приведены на картах Рамачандрана на рис. 47. Для остатка G672 изменения значений торсионных углов происходят в среднем на 10-15 градусов, что вносит основной вклад в открытие лиганд-связывающего домена. Для остатка G674 имеет место значительное изменение угла  $\psi$  для открытой формы. Для остатка G745 существенные конформационные изменения происходят для закрытой формы, по-видимому, вследствие меньшей вытянутости конформации этой петли в случае закрытой формы.

На основании анализа траекторий можно установить последовательность событий, приводящих к открытию лиганд-связывающего домена:

Стадия 1. Конформационное изменение в районе остатков D672, S673, G674. Изначально в полностью закрытом домене имеется водородная связь между амидной группой основной цепи S673 и карбонильным кислородом основной цепи G472. После случайного обрыва этой водородной связи за счет теплового движения (G674 облегчает этот обрыв за счет повышения конформационной подвижности основной цепи) начинается отрыв S1 субъединицы от субъединицы S2. После этого события могут происходить колебания субъединиц S1 и S2 друг относительно друга со значительной амплитудой. В некоторых структурах уже в начале моделирования данная водородная связь не существует, что практически сразу же ведет к последующему расхождению областей S1 и S2.

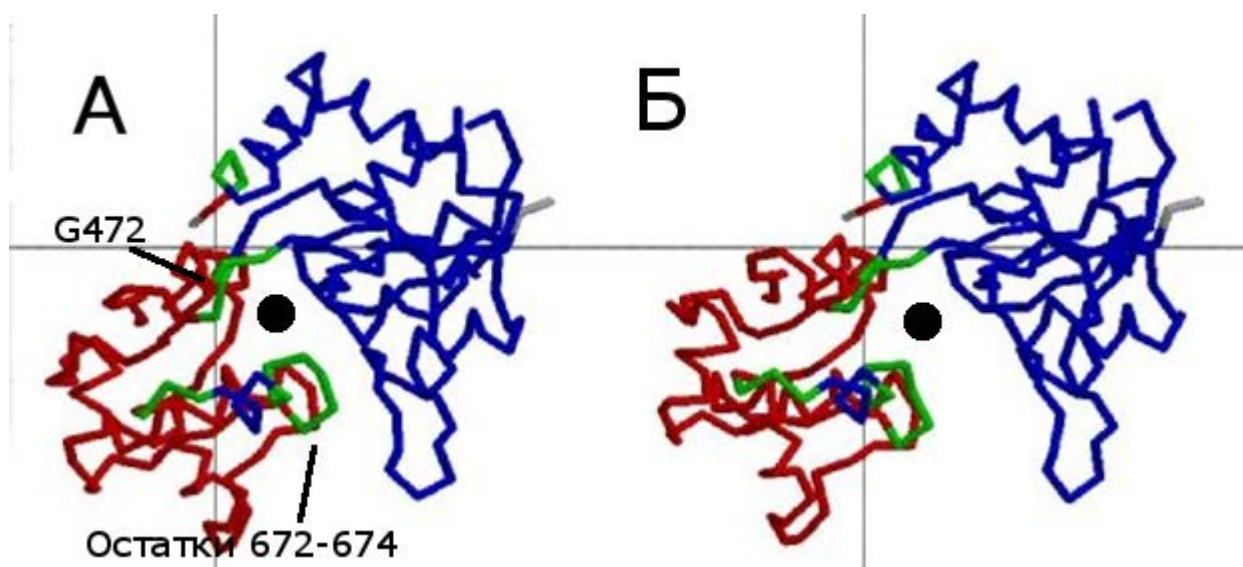


Рисунок 46. Ход основной цепи закрытого (А) и открытого (Б) состояния. Синим цветом выделена условно неподвижная часть структуры, красным — область, которая перемещается без внутренних конформационных изменений, зеленым отмечена область, где происходят конформационные изменения. Черным цветом отмечено место расположения глутамата. Область S1 обозначена красным цветом, S2 – синим цветом. Рисунок построен с использованием сервиса DynDom [249].

Стадия 2. Небольшие конформационные изменения в районе остатков G520, I521, представляющих собой так называемую шарнирную область.

Следует подчеркнуть, что основные конформационные изменения происходят в основном в остатках глицина, как наиболее подвижной из всех протеиногенных аминокислот.



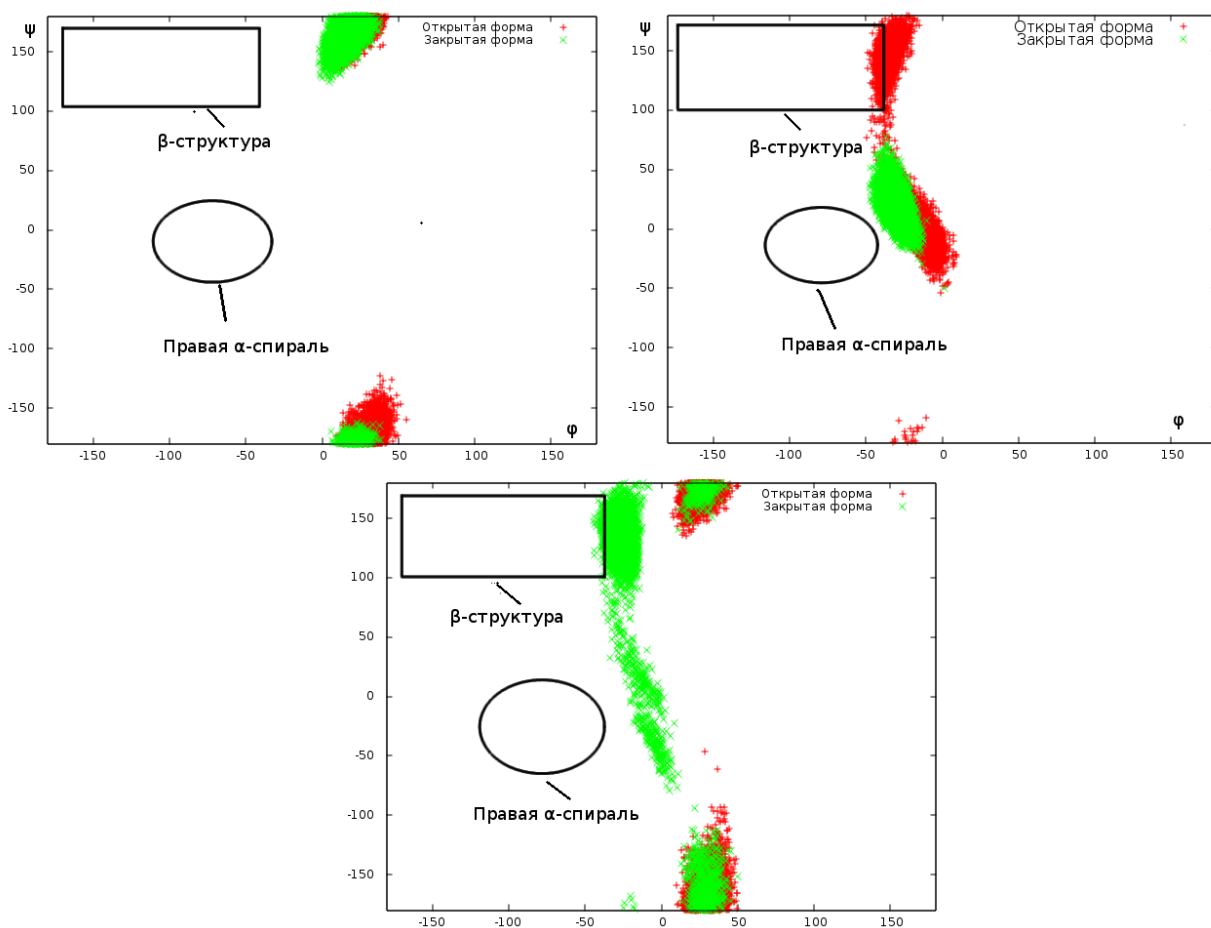


Рисунок 47. Карты Рамачандрана для остатков G674 (слева сверху) и G472 (справа сверху) и G745 (снизу).

Полученные результаты свидетельствуют о наличии корреляционной зависимости между рассчитанным значением энтальпии связывания и величиной  $pEC_{50}$ , однако стандартная ошибка предсказания оказывается весьма высокой по сравнению с 3D QSAR моделью, которая вкуче с существенной длительностью расчетов ограничивает применение данного метода для расчета энтальпии связывания в большом числе комплексов. В то же время данный подход предоставляет дополнительную информацию по сравнению с методами 3D QSAR, при итеративной оптимизации активности ПАМ.

## Выводы

1. Построены структурные модели димерных комплексов аминоконцевых доменов состава GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D по гомологии со структурой димера аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B. Построена полная структурная модель рецептора GluN1/GluN2D на основании структуры комплекса GluN1/GluN2B и калиевого канала KirBac1.1.

2. Выполнено моделирование молекулярной динамики для комплексов аминоконцевых доменов GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D. Выявленные структурные изменения в сайте связывания, происходящие при удалении лиганда, являются следствием внутреннего вращения долей аминоконцевого домена GluN2. Показано, что сайты связывания ифенпродила и  $Zn^{2+}$  аллостерически связаны.

3. Разработан протокол виртуального скрининга для отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора, основанный на методе докинга и фармакофорном подобию. Качество распознавания активных молекул подтверждено статистическими методами. Идентифицированы активные соединения, не относящиеся ни к одному из известных классов отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора.

4. Построены модели 3D QSAR (CoMFA) для различных классов отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора, определены оптимальные зарядовые схемы и наиболее значимые физико-химические дескрипторы.

5. Для положительных аллостерических модуляторов AMPA-рецептора построены модели 3D-QSAR (CoMFA), обладающие высокой предсказательной способностью.

6. Разработана методика предсказания  $EC_{50}$  для положительных аллостерических модуляторов GluA2-подтипа AMPA-рецептора на основе расчета энтальпии связывания в комплексах димера лиганд-связывающих доменов подтипов GluA2 AMPA-рецептора с лигандами методом ММ-GBSA. Для

известных комплексов обнаружена высокая корреляция рассчитанных величин с литературными данными.

7. Разработан протокол поиска сайтов связывания лигандов для белковых комплексов большого размера, включающих в себя тысячи аминокислотных остатков и сотни возможных карманов связывания, сочетающий в себе анализ поверхности белка с выявлением карманов с последующим «гибким» докингом лиганда в идентифицированные карманы. Для данной методики на примере NMDA-рецептора показана эффективность поиска сайтов связывания глутамата, глицина, ифенпродила и некоторых антагонистов с известным способом связывания. Идентифицированы сайты связывания новых отрицательных модуляторов NMDA-рецептора, согласующиеся с литературными данными.

## Список литературы

1. Hayashi T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. // *Keio J. Med.* – 1954. – V. 3. – P. 192–193.
2. McLennan H., Huffman R.D., Marshall K.C. Patterns of excitation of thalamic neurones by amino acids and by acetylcholine. // *Nature (London)*. – 1968. – V. 219. – P. 387–388.
3. Karakas E., Simorowski N., Furukawa H. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. // *Nature*. – 2011. – V. 475. – P. 249–253.
4. Yao Y., Belcher J., Berger A.J., Mayer M.L., Lau A.Y. Conformational analysis of NMDA receptor GluN1, GluN2, and GluN3 ligand binding domains reveals subtype-specific characteristics. // *Structure*. – 2013. – V. 21. – P. 1788–1799.
5. Karakas E., Simorowski N., Furukawa H. Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. // *EMBO J.* – 2009. – V. 28. – P. 3910–3920.
6. Jespersen A., Tajima N., Fernandez-Cuervo G., Garnier-Amblard E.C., Furukawa H. Structural insights into competitive antagonism in NMDA receptors. // *Neuron*. – 2014. – V. 81. – P. 366–378.
7. Kvist T., Steffensen T.B., Greenwood J.R., Tabrizi F.M., Hansen K.B., Gajhede M., Pickering D.S., Traynelis S.F., Kastrop J.S., Bräuner-Osborne H. Crystal structure and pharmacological characterization of a novel *N*-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist at the GluN1 glycine binding site. // *J. Biol. Chem.* – 2013. V. 288. – P. 33124–33135.
8. Lee C.H., Lü W., Michel J.C., Goehring A., Du J., Song X., Gouaux E. NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. // *Nature*. – V. 511. – P. 191–197.
9. Furukawa H., Singh S.K., Mancusso R., Gouaux E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. // *Nature*. – V. 438. – P. 185–192.
10. Furukawa H., Gouaux E. Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. // *EMBO J.* – V. 22. – P. 2873–2885.
11. Vance K.M., Simorowski N., Traynelis S.F., Furukawa H. Ligand-specific deactivation time course of GluN1/GluN2D NMDA receptors. // *Nat. Commun.* – 2011. – V. 2. – P. 294.
12. Farina A.N., Blain K.Y., Maruo T., Kwiatkowski W., Choe S., Nakagawa T. Separation of domain contacts is required for heterotetrameric assembly of functional NMDA receptors // *J. Neuroscience*. – 2011. – V. 31 – P. 3565–3579.

13. Inanobe A., Furukawa H., Gouaux E. Mechanism of partial agonist action at the NR1 subunit of NMDA receptors. // *Neuron*. – 2005. – V. 47. – P. 71–84.
14. Hansen K.B., Tajima N., Risgaard R., Perszyk R.E., Jørgensen L., Vance K.M., Ogden K.K., Clausen R. P., Furukawa H., Traynelis S.F. Structural determinants of agonist efficacy at the glutamate binding site of *N*-Methyl-d-Aspartate receptors. // *Mol. Pharm.* – 2013. – V. 84. – P. 114–127.
15. Yao Y., Harrison C.B., Freddolino P.L., Schulten K., Mayer M.L. Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. // *EMBO J.* – 2008. – V. 27. – P. 2158–2170.
16. Sobolevsky A.I., Rosconi M.P., Gouaux E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. // *Nature*. – 2009. – V. 462. – P. 745–756.
17. O'Hara P.J., Sheppard P.O., Thøgersen H., Venezia D., Haldeman B.A., McGrane V., Houamed K.M., Thomsen C., Gilbert T.L., and Mulvihill E.R. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. // *Neuron*. – 1993. – V. 11. – P. 41–52.
18. Safferling M., Tichelaar W., Kümmerle G., Jouppila A., Kuusinen A., Keinänen K., and Madden D.R. First images of a glutamate receptor ion channel: oligomeric state and molecular dimensions of GluRB homomers. // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – P. 13948–13953.
19. Midgett C.R., Madden D.R. The quaternary structure of a calcium permeable AMPA receptor: conservation of shape and symmetry across functionally distinct subunit assemblies. // *J. Mol. Biol.* – 2008. – V. 382. – P. 578–584.
20. Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B., and Seeburg P.H. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. // *Science*. – 1992. – V. 256. – P. 1217–1221.
21. Ulbrich M.H., Isacoff E.Y. Rules of engagement for NMDA receptor subunits. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2008. – V. 105. – P. 14163–14168.
22. Vandenberg R.J., Ryan R.M. Mechanisms of glutamate transport. // *Physiol. Rev.* – 2013. – V. 93. – P. 1621–1657.
23. Rose C.F., Verkhratsky A., Parpura V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2013. – V. 41. – P. 1518–1524.
24. Ashby M.C., Daw M.I., Isaac J.T.R. *The Glutamate Receptors*. Humana Press, Totowa, NJ, P. 1–44.
25. Lu W., Shi Y., Jackson A.C., Bjorgan K., Doring M.J., Sprengel R., Seeburg P.H., Nicoll R.A. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. // *Neuron*. – 2009. – V. 62. – P. 254–268.

26. Pickard L., Noel J., Henley J.M., Collingridge G.L., Molnar E. Developmental changes in synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor subunit composition in living hippocampal neurons. // *J. Neurosci.* – 2000. – V. 20. – P. 7922–7931.
27. Isaac J.T., Ashby M., McBain C.J. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. // *Neuron.* – 2007. – V. 54. – P. 859–871.
28. Tóth K., McBain C.J. Target-specific expression of pre- and postsynaptic mechanisms. // *J. Physiol.* – 2000. – V. 525. – P. 41–51.
29. Monaghan D.T., Cotman C.W. The distribution of [3H]kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. // *Brain Res.* – 1982. – V. 252. – P. 91–100.
30. Kidd F.L., Isaac J.T. Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. // *Nature.* – 1999. – V. 400 – P. 569–573.
31. Melyan Z., Wheal H.V., Lancaster B. Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of IsAHP and excitability in pyramidal cells. // *Neuron.* – 2002. – V. 34 – P. 107–114.
32. Petralia R.S., Wenthold R.J. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. // *J. Comp. Neurol.* – 1992. – V. 318. – P. 329–354.
33. van Zundert B, Yoshii A, Constantine-Paton M. Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. // *Trends Neurosci.* – 2004. – V. 27. – P. 428–437.
34. Perez-Otano I., Lujan R., Tavalin S.J., Plomann M., Modregger J., Liu X.B., Jones E.G., Heinemann S.F., Lo D.C., Ehlers M.D. Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. // *Nat. Neurosci.* – 2006. – V. 9. – P. 611–621.
35. Roberts A.C., Díez-García J., Rodriguiz R.M., Lopez I.P., Lujan R., Martínez-Turrillas R., Pico E., Henson M.A., Bernardo D.R., Jarrett T.M. Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation. // *Neuron.* – 2009. – V. 63. – P. 342–356.
36. Lei S., McBain C.J. Distinct NMDA receptors provide differential modes of transmission at mossy fiber-interneuron synapses. // *Neuron.* – 2002. – V. 33. – P. 921–933.
37. Liu L., Wong T.P., Pozza M.F., Lingenhoehl K., Wang Y., Sheng M., Auberson Y.P., Wang Y.T. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. // *Science.* – 2004. – V. 304. – P. 1021–1024.

38. Lee C.J., Mannaioni G., Yuan H., Woo D.H., Gingrich M.B., Traynelis S.F. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. // *J. Physiol.* – 2007. – V. 581. – P. 1057–1081.
39. Davenport R. Glutamate receptors in plants. // *Annals of Botany.* – 2002. – V. 90. – P. 549–557.
40. Tapken D., Anschutz U., Liu L.H., Huelsken T., Seebohm G., Becker D., Hollmann M. A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids. // *Sci. Signal.* – 2013. – V. 6. – P. RA47.
41. Kang S., Kim H.B., Lee H., Choi J.Y., Heu S., Oh C.J., Kwon S.I. Overexpression in Arabidopsis of a plasma membrane-targeting glutamate receptor from small radish increases glutamate-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  influx and delays fungal infection. // *An CS Mol. Cells.* – 2006. – V. 21. – P. 418–427.
42. Li F., Wang J., Ma C., Zhao Y., Wang Y., Hasi A., Qi Z. Glutamate receptor-like channel3.3 is involved in mediating glutathione-triggered cytosolic calcium transients, transcriptional changes, and innate immunity responses in Arabidopsis. // *Plant Physiol.* – 2013. – V. 162. – P. 1497–509.
43. Benton R., Vannice K.S., Gomez-Diaz C., Vosshall L.B. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. // *Cell.* – 2009. – V. 136. – P. 149–162.
44. Croset V., Rytz R., Cummins S.F., Budd A., Brawand D., Kaessmann H., Gibson T.J., Benton R. Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. // *PLoS Genet.* 2010. – V. 6. – P. E1001064.
45. Smith E.G., Deligiannidis K.M., Ulbricht C.M., Landolin C.S., Patel J.K., Rothschild A.J. Antidepressant augmentation using the N-methyl-D-aspartate antagonist memantine: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. // *J. Clin. Psychiatry.* – 2013. – V. 74 – P. 966–973.
46. Petri M., Naqibuddin M., Sampedro M., Omdal R., Carson K.A. Memantine in systemic lupus erythematosus: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. // *Semin. Arthritis Rheum.* – 2011. – V. 41. – P. 194–202.
47. de Lucena D., Fernandes B.S., Berk M., Dodd S., Medeiros D.W., Pedrini M., Kunz M., Gomes F.A., Giglio L.F., Lobato M.I., Belmonte-de-Abreu P.S., Gama C.S. Improvement of negative and positive symptoms in treatment-refractory schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with memantine as add-on therapy to clozapine. // *J. Clin. Psychiatry.* – 2009. – V. 70. – P. 1416–1423.
48. Orgogozo J.M., Rigaud A.S., Stöfler A., Möbius H.J., Forette F. Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a

- randomized, placebo-controlled trial (MMM 300). // *Stroke*. – 2002. – V. 33. – P. 1834–1839.
49. Lindelof K., Bendtsen L. Memantine for prophylaxis of chronic tension-type headache - a double-blind, randomized, crossover clinical trial. // *Cephalalgia*. – 2009. – V. 29. – P. 314–321.
  50. Newport D.J., Carpenter L.L., McDonald W.M., Potash J.B., Tohen M., Nemeroff C.B. Ketamine and other NMDA antagonists: early clinical trials and possible mechanisms in depression. // *Am. J. Psychiatry*. – 2015. – V. 172. – P. 950–966.
  51. Gomez-Mancilla B., Brand R., Jürgens T.P. Randomized, multicenter trial to assess the efficacy, safety and tolerability of a single dose of a novel AMPA receptor antagonist BGG492 for the treatment of acute migraine attacks. // *Cephalalgia*. – 2014. – V. 34. – P. 103–113.
  52. Krauss G.L., Serratosa J.M., Villanueva V., Endziniene M., Hong Z., French J., Yang H., Squillacote D., Edwards H.B., Zhu J., Laurenza A. Randomized phase III study 306: Adjunctive perampanel for refractory partial-onset seizures. // *Neurology*. – 2012. – V. 78. – P. 1408–1415.
  53. Pascuzzi R.M., Shefner J., Chappell A.S., Bjerke J.S., Tamura R., Chaudhry V., Clawson L., Haas L., Rothstein J.D. A phase II trial of talampanel in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. // *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. – 2009. – V. 11. – P. 266–271.
  54. Kantrowitz J.T., Woods S.W., Petkova E., Cornblatt B., Corcoran C.M., Chen H., Silipo G., Javitt D.C. D-serine for the treatment of negative symptoms in individuals at clinical high risk of schizophrenia: a pilot, double-blind, placebo-controlled, randomised parallel group mechanistic proof-of-concept trial. // *Lancet Psychiatry*. – 2015. – V.2 – P. 403–412.
  55. Ikonomidou C., Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? // *Lancet Neurology*. – 2002. – V. 1 – P. 383–386.
  56. Parsons C.G., Danysz W., Lodge D. Ionotropic glutamate receptors as therapeutic targets, Graham Publishing Co., Johnson City, TN, P. 1-30.
  57. Green T., Rogers C.A., Contractor A., Heinemann S.F. NMDA receptors formed by NR1 in *Xenopus laevis* oocytes do not contain the endogenous subunit XenU1. // *Mol. Pharmacol*. – 2002. – V. 61. – P. 326–333.
  58. Dyker A.G., Edwards K.R., Fayad P.B., Hormes J.T., Lees K.R. Safety and tolerability study of aptiganel hydrochloride in patients with an acute ischemic stroke. // *Stroke*. – 1999. – V. 30. – P. 2038–2042.
  59. Lees K.R., Asplund K., Carolei A., Davis S.M., Diener H.C., Kaste M., Orgogozo J.M., Whitehead J. Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection



- (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. GAIN International Investigators. // *Lancet*. – 2000. – V. 355. – P. 1949–1954.
60. Small D.L., Tauskela J.S. Glutamate receptors in peripheral tissue: Excitatory transmission outside the CNS, Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, P. 27-45
  61. Green A.R. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – V. 153. – P. S325–338.
  62. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. // *Trends. Neurosci.* – 1999. – V. 22. – P. 391–397.
  63. Kessler R.C., Berglund P., Demler O., Jin R., Koretz D., Merikangas K.R., Rush A.J., Walters E.E., Wang P.S. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). // *JAMA* – 2003. – V. 289. – P. 3095–3105.
  64. Trivedi M.H., Rush A.J., Wisniewski S.R., Nierenberg A.A., Warden D., Ritz L., Norquist G., Howland R.H., Lebowitz B., McGrath P.J. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. // *Am. J. Psychiatry.* – 2006. – V. 163. – P. 28–40
  65. Paul I.A., Skolnick P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2003. – V. 1003. – P. 250–272.
  66. Preskorn S.H., Baker B., Kolluri S., Menniti F.S., Krams M., Landen J.W. An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. // *J. Clin. Psychopharmacol.* – 2008. – V. 28. – P. 631–637.
  67. Lynch G. and Gall C.M. Ampakines and the threefold path to cognitive enhancement. // *Trends. Neurosci.* – 2006. – V. 29. – P. 554–562.
  68. Danysz W. CX-516 Cortex pharmaceuticals. // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* – 2002. – V. 3. – P. 1081–1088.
  69. Ingvar M., Ambros-Ingerson J., Davis M., Granger R., Kessler M., Rogers G.A., Schehr R.S., Lynch G. Enhancement by an ampakine of memory encoding in humans. // *Exp. Neurol.* – 1997. – V. 146. – P. 553–559.
  70. Goff D.C., Lamberti J.S., Leon A.C., Green M.F., Miller A.L., Patel J., Manschreck T., Freudenreich O., and Johnson S.A. A placebo-controlled add-on trial of the Ampakine, CX516, for cognitive deficits in schizophrenia. // *Neuropsychopharmacol.* 2008. – V. 33. – P. 465–472.
  71. Berry-Kravis E., Krause S.E., Block S.S., Guter S., Wu J., Leurgans S., Declerck P., Potanos K., Cook E., Salt J. Effect of CX516, an AMPA-modulating

- compound, on cognition and behavior in fragile X syndrome: a controlled trial. // *J. Child. Adolesc. Psychopharmacol.* – 2006. – V. 16. – P. 525–540.
72. Luby E.D., Cohen B.D., Rosenbaum G., Gottlieb J.S., Kelley R. Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. // *AMA Arch. Neurol. Psychiatry.* – 1959. – V. 81. – P. 363–369.
73. Olney J.W., Newcomer J.W., Farber N.B. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. // *J. Psychiatr. Res.* – 1999. – V. 33. – P. 523–533.
74. Coyle J.T. and Tsai G. The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. // *Psychopharmacology (Berl.)* – 2004. – V. 174 – P. 32–38.
75. Lane H.Y., Chang Y.C., Liu Y.C., Chiu C.C., Tsai G.E. Sarcosine or D-serine add-on treatment for acute exacerbation of schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. // *Arch. Gen. Psychiatry.* – 2005. – V. 62. – P. 1196–1204.
76. Lane H.Y., Lin C.H., Green M.F., Helleman G., Huang C.C., Chen P.W., Tun R., Chang Y.C., Tsai G.E. Add-on treatment of benzoate for schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of D-amino acid oxidase inhibitor. // *JAMA Psychiatry.* – 2013. – V. 70. – P. 1267–1275
77. Gong X.Q., Frandsen A., Lu W.Y., Wan Y., Zabek R.L., Pickering D.S., Bai D. D-aspartate and NMDA, but not L-aspartate, block AMPA receptors in rat hippocampal neurons. // *Br. J. Pharmacol.* – 2005. – V. 145. – P. 449–459.
78. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. // *Pharmacol. Rev.* – 2010. – V. 62. – P. 405–496.
79. Armstrong N., Gouaux E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. // *Neuron.* – 2000. – V. 28. – P. 165–181.
80. Kleckner N.W., Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. // *Science.* – 1988. – V. 241. – P. 835–837.
81. Hood W.F., Compton R.P., Monahan J.B. D-Cycloserine: a ligand for the N-methyl-D-aspartate coupled glycine receptor has partial agonist characteristics. // *Neurosci. Lett.* – 1989. – V. 98. – P. 91–95.
82. Priestley T. and Kemp J.A. Kinetic study of the interactions between the glutamate and glycine recognition sites on the N-methyl-D-aspartic acid receptor complex. // *Mol. Pharmacol.* – 1994. – V. 46. – P. 1191–1196.
83. Kalia L.V., Kalia S.K., Salter M.W. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. // *Lancet. Neurol.* – 2008. – V. 7. – P. 742–755.

84. Kuryatov A., Laube B., Betz H., Kuhse J. Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. // *Neuron*. – 1994. – V. 12. – P. 1291–1300.
85. Yao Y., Mayer M.L. Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. // *J. Neurosci.* – 2006. – V. 26. – P. 4559–4566.
86. Naur P., Hansen K.B., Kristensen A.S., Dravid S.M., Pickering D.S., Olsen L., Vestergaard B., Egebjerg J., Gajhede M., Traynelis S.F. Ionotropic glutamate-like receptor delta 2 binds D-serine and glycine. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V. 104. – P. 14116–14121.
87. Kakegawa W., Kohda K., Yuzaki M. The delta2 ionotropic glutamate receptor functions as a non-ionotropic receptor to control cerebellar synaptic plasticity. // *J. Physiol.* – 2007. – V. 584. – P. 89–96.
88. Kakegawa W., Miyazaki T., Hirai H., Motohashi J., Mishina M., Watanabe M., and Yuzaki M. Ca<sup>2+</sup> permeability of the channel pore is not essential for the delta2 glutamate receptor to regulate synaptic plasticity and motor coordination. // *J. Physiol.* – 2007. – V. 579. – P. 729–735.
89. Hogner A., Kastrop J.S., Jin R., Liljefors T., Mayer M.L., Egebjerg J., Larsen I.K., Gouaux E. Structural basis for AMPA receptor activation and ligand selectivity: crystal structures of five agonist complexes with the GluR2 ligand-binding core. // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 322. – P. 93-109.
90. Jin R., Horning M., Mayer M. L., Gouaux, E. Mechanism of activation and selectivity in a ligand-gated ion channel: structural and functional studies of GluR2 and quisqualate. // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41. – P. 15635–15643.
91. Ramanoudjame G., Du M., Mankiewicz K.A., Jayaraman V. Allosteric mechanism in AMPA receptors: a FRET-based investigation of conformational changes. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103. – P. 10473–10478.
92. Dolino D.M., Cooper D., Ramaswamy S., Jaurich H., Landes C.F., Jayaraman V. Structural Dynamics of the Glycine-Binding Domain of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor. // *J. Biol. Chem.* – 2014. – V. 290. – P. 797–804.
93. Birch P.J., Grossman C.J., Hayes A.G. Kynurenic acid antagonises response to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. // *Eur. J. Pharmacol.* – 1988. – V. 154. – P. 85–87.
94. Kemp J.A., Foster A.C., Leeson P.D., Priestley T., Tridgett R., Iversen L.L., Woodruff G.N. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1988. – V. 85. – P. 6547–6550.

95. Erhardt S., Schwieler L., Nilsson L., Linderholm K., Engberg G. The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia. // *Physiology & Behavior*. – 2007. – V. 92. – P. 203–209.
96. Ikeda K., Nagasawa M., Mori H., Araki K., Sakimura K., Watanabe M., Inoue Y., Mishina M. Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. // *FEBS Lett.* – 1992. – V. 313. – P. 34–38.
97. Buller A.L., Larson H.C., Schneider B.E., Beaton J.A., Morrisett R.A., Monaghan D.T. The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. // *J. Neurosci.* – 1994. – V. 14. – P. 5471–5484.
98. Jespersen A., Tajima N., Fernandez-Cuervo G., Garnier-Amblard E.C., Furukawa H. Structural insights into competitive antagonism in NMDA receptors. // *Neuron*. – 2014. – V. 81. – P. 366–378.
99. de Sousa S.L., Dickinson R., Lieb W.R., Franks N.P. Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. // *Anesthesiology*. – 2000. – V. 92. – P. 1055–1066.
100. Dickinson R., Peterson B.K., Banks P., Simillis C., Martin J.C., Valenzuela C.A., Maze M., Franks N.P. Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor by the anesthetics xenon and isoflurane: evidence from molecular modeling and electrophysiology. // *Anesthesiology*. – 2007. – V. 107. – P. 756–767.
101. Andrijchenko N.N., Ermilov A.Y., Khriachtchev L., Räsänen M., Nemukhin A.V. Toward molecular mechanism of xenon anesthesia: a link to studies of xenon complexes with small aromatic molecules. // *J. Phys. Chem. A*. – 2015. – V. 119. – P. 2517–2521.
102. Davies J., Evans R.H., Herrling P.L., Jones A.W., Olverman H.J., Pook P., Watkins J.C. CPP, a new potent and selective NMDA antagonist. Depression of central neuron responses, affinity for [3H]D-AP5 binding sites on brain membranes and anticonvulsant activity. // *Brain Res.* – 1986. – V. 382. – P. 169–173.
103. Lester R.A., Clements J.D., Westbrook G.L., Jahr C.E. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. // *Nature*. – 1990. – V. 346. – P. 565–567.
104. Kinarsky L., Feng B., Skifter D.A., Morley R.M., Sherman S., Jane D.E., Monaghan D.T. Identification of subunit- and antagonist-specific amino acid residues in the N-methyl-D-aspartate receptor glutamate-binding pocket. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – V. 313. – P. 1066–1074.

105. Williams K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. // *Mol. Pharmacol.* – 1993. – V. 44. – P. 851–859.
106. Hatton C.J. and Paoletti P. Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. // *Neuron.* – 2005. – V. 46. – P. 261–274.
107. Kew J.N., Trube G., and Kemp J.A. A novel mechanism of activity-dependent NMDA receptor antagonism describes the effect of ifenprodil in rat cultured cortical neurones. // *J. Physiol.* – 1996. – V. 497. – P. 761–772.
108. Perin-Dureau F., Rachline J., Neyton J., Paoletti P. Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. // *J. Neurosci.* – 2002. – V. 22. – P. 5955–5965.
109. Lynch D.R., Gallagher M.J. Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by haloperidol: developmental and pharmacological characterization in native and recombinant receptors. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1996. – V. 279. – P. 154–161.
110. Fischer G., Mutel V., Trube G., Malherbe P., Kew J.N., Mohacsi E., Heitz M.P., Kemp J.A. Ro25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1997. – V. 283. – P. 1285–1292.
111. Kawai M., Ando K., Matsumoto Y., Sakurada I., Hirota M., Nakamura H., Ohta A., Sudo M., Hattori K., Takashima T. Discovery of (X)-6-[2-[4-(3-fluorophenyl)-4-hydroxy-1-piperidinyl]-1-hydroxyethyl]-3, 4-dihydro-2(1H)-quinolinone — a potent NR2B-selective N-methyl D-aspartate (NMDA) antagonist for the treatment of pain. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – V. 17. – P. 5558–5562.
112. Mosley C.A., Myers S.J., Murray E.E., Santangelo R., Tahirovic Y.A., Kurtkaya N., Mullasseril P., Yuan H., Lyuboslavsky P., Le P. Synthesis, structural activity-relationships, and biological evaluation of novel amide-based allosteric binding site antagonists in NR1A/NR2B N-methyl-D-aspartate receptors. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – V. 17. – P. 6463–6480.
113. Mosley C.A., Acker T.M., Hansen K.B., Mullasseril P., Andersen K.T., Le P., Vellano K.M., Bräuner-Osborne H., Liotta D.C., Traynelis S.F. Quinazolin-4-one Derivatives: A Novel Class of Noncompetitive NR2C/D Subunit-Selective N-Methyl-D-aspartate Receptor Antagonists. // *J. Med. Chem.* – 2010. – V. 53. – P. 5476–5490.
114. Acker T.M., Yuan H., Hansen K.B., Vance K.M., Ogden K.K., Jensen H.S., Burger P.B., Mullasseril P., Snyder J.P., Liotta D.C., Traynelis S.F. Mechanism for Noncompetitive Inhibition by Novel GluN2C/D N-Methyl-D-aspartate Receptor Subunit-Selective Modulators. // *Mol. Pharm.* – 2011. – V. 80. – P. 5782–5795.

115. Mirshahi T., Woodward J.J. Ethanol sensitivity of heteromeric NMDA receptors: effects of subunit assembly, glycine and NMDAR1 Mg<sup>2+</sup>-insensitive mutants. // *Neuropharmacology* – 1995. – V. 34. – P. 347–355.
116. Kash T.L., Matthews R.T., Winder D.G. Alcohol inhibits NR2B-containing NMDA receptors in the ventral bed nucleus of the stria terminalis. // *Neuropsychopharmacology*. – 2008. – V. 33. – P. 1379–1390.
117. Kuner T., Schoepfer R., Korpi E.R. Ethanol inhibits glutamate-induced currents in heteromeric NMDA receptor subtypes. // *Neuroreport* – 1993. – V. 5. – P. 297–300.
118. Peoples R.W., Weight F.F. Differential alcohol modulation of GABA(A) and NMDA receptors. // *Neuroreport*. – 1999. – V. 10. – P. 97–101.
119. Lovinger D.M. NMDA receptors lose their inhibitions. // *Nat. Neurosci.* – 2002. – V. 5. – P. 614–616.
120. Huettner J.E., Bean B.P. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* – 1988. – V. 85. – P. 1307–1311.
121. Parsons C.G., Quack G., Bresink I., Baran L., Przegalinski E., Kostowski W., Krzascik P., Hartmann S., Danysz W. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. // *Neuropharmacology*. – 1995. – V. 34. – P. 1239–1258.
122. Blanpied T.A., Clarke R.J., Johnson J.W. Amantadine inhibits NMDA receptors by accelerating channel closure during channel block. // *J. Neurosci.* – 2005. – V. 25. – P. 3312–3322.
123. Parsons C.G., Danysz W., Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist — a review of preclinical data. *Neuropharmacology*. – 1999. – V. 38. – P. 735–767.
124. Chen H.S., Lipton S.A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. // *J. Neurochem.* – 2006. – V. 97. – P. 1611–1626.
125. Dravid S.M., Erreger K., Yuan H., Nicholson K., Le P., Lyuboslavsky P., Almonte A., Murray E., Mosely C., Barber J. Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. // *J Physiol.* – 2007. – V. 581. – P. 107–128.
126. Yamakura T., Mori H., Masaki H., Shimoji K., and Mishina M. Different sensitivities of NMDA receptor channel subtypes to non-competitive antagonists. // *Neuroreport*. – 1993. – V. 4. – P. 687– 690.
127. Peters S., Koh J., Choi D.W. Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. // *Science*. – 1987. – V. 236. – P. 589–593.

128. Paoletti P., Vergnano A.M., Barbour B., Casado M. Zinc at glutamatergic synapses. // *Neuroscience*. – 2009. – V. 158. – P. 126–136.
129. Choi Y.B. Lipton S.A. Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity  $Zn^{2+}$  inhibition of the NMDA receptor. // *Neuron*. – 1999. – V. 23. – P. 171–180.
130. Fayyazuddin A., Villarroel A., Le Goff A., Lerma J., Neyton J. Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity  $Zn^{2+}$  binding to NMDA receptors. // *Neuron*. – 2000. – V. 25. – P. 683–694.
131. Yuan H., Hansen K.B., Vance K.M., Ogden K.K., Traynelis S.F. Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. // *J. Neurosci*. – 2009. – V. 29. – P. 12045–12058.
132. Legendre P., Westbrook G.L. The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. // *J. Physiol*. – 1990. – V. 429. – P. 429–449.
133. Traynelis S.F., Burgess M.F., Zheng F., Lyuboslavsky P., Powers J.L. Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. // *J. Neurosci*. – 1998. – V. 18. – P. 6163–6175.
134. Gielen M., Retchless S.B., Mony L., Johnson J.W., Paoletti P. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. // *Nature*. – 2009. – V. 459. – P. 703–707.
135. Gielen M., Le Goff A., Stroebel D., Johnson J.W., Neyton J., Paoletti P. Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. // *Neuron*. – 2008. – V. 57. – P. 80–93.
136. Yu X.M. and Salter M.W. Gain control of NMDA-receptor currents by intracellular sodium. // *Nature*. – 1998. – V. 396. – P. 469–474.
137. Christensen B.N., Hida E. Protonation of histidine groups inhibits gating of the quisqualate kainate channel protein in isolated catfish cone horizontal cells. // *Neuron*. – 1990. – V. 5. – P. 471–478.
138. Banke T.G., Dravid S.M., Traynelis S.F. Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. // *J. Neurosci*. – 2005. – V. 25. – P. 42–51.
139. Low C.M., Lyuboslavsky P., French A., Le P., Wyatte K., Thiel W.H., Marchan E.M., Igarashi K., Kashiwagi K., Gernert K. Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. // *Mol. Pharmacol*. – 2003. – V. 63. – P. 1212–1222.
140. Ransom R.W., Deschenes N.L. Polyamines regulate glycine interaction with the N-methyl-D-aspartate receptor. // *Synapse*. – 1990. – V. 5. – P. 294–298.
141. Han X., Tomitori H., Mizuno S., Higashi K., Full C., Fukiwake T., Terui Y., Leewanich P., Nishimura K., Toida T. Binding of spermine and ifenprodil to a

- purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor. // *J. Neurochem.* – 2008. – V. 107. – P. 1566–1577.
142. Johnson T.D. Modulation of channel function by polyamines. // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1996. – V. 17. – P. 22–27.
143. Weaver C.E., Land M.B., Purdy R.H., Richards K.G., Gibbs T.T., Farb D.H. Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation and cell death. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2000. – V. 293. – P. 747–754.
144. Wu F.S., Gibbs T.T., Farb D.H. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. // *Mol. Pharmacol.* – 1991. – V. 40. – P. 333–336.
145. Park-Chung M., Wu F.S., Purdy R.H., Malayev A.A., Gibbs T.T., Farb D.H. Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. // *Mol Pharmacol.* – 1997. – V. 52. – P. 1113–1123.
146. Malayev A., Gibbs T.T., Farb D.H. Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – V. 135. – P. 901–909.
147. Jang M.K., Mierke D.F., Russek S.J., Farb D.H. A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – V. 101. – P. 8198–8203.
148. Horak M., Vlcek K., Chodounska H., Vyklicky L. Jr. Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. // *Neuroscience.* – 2006. – V. 137. – P. 93–102.
149. Petrovic M., Sedlacek M., Horak M., Chodounska H., and Vyklicky L. Jr. 20-Oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. // *J. Neurosci.* – 2005. – V. 25. – P. 8439–8450.
150. Nishikawa M., Kimura S., Akaike N. Facilitatory effect of docosahexaenoic acid on N-methyl-D-aspartate response in pyramidal neurons of rat cerebral cortex. // *J. Physiol.* – 1994. – V. 475. – P. 83–93.
151. Paoletti P., Ascher P. Mechanosensitivity of NMDA receptors in cultured mouse central neurons. // *Neuron.* – 1994. – V. 13. – P. 645–655.
152. Guilarte T.R., McGlothan J.L. Selective decrease in NR1 subunit splice variant mRNA in the hippocampus of  $\text{Pb}^{2+}$ -exposed rats: implications for synaptic targeting and cell surface expression of NMDAR complexes. // *Mol. Brain Res.* – V. 113. – P. 37–43.
153. Kloda A., Clements J.D., Lewis R.J., Adams D.J. Adenosine triphosphate acts as both a competitive antagonist and a positive allosteric modulator at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. // *Mol. Pharmacol.* – 2004. – V. 65. – P. 1386–1396.



154. Bekkers J.M. Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. // *Science*. – 1993. – V. 261. – P. 104–106.
155. Palangsuntikul R., Berner H., Berger M.L., Wolschann P. Holographic Quantitative structure-activity relationships of tryptamine derivatives at NMDA, 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>2A</sub> receptors. // *Molecules*. – 2013. – V. 18. – P. 8799–8811.
156. Ring J.R., Zheng F., Haubner A.J., Littleton J.M., Crooks P.A. Improving the inhibitory activity of arylidenaminoguanidine compounds at the *N*-methyl-d-aspartate receptor complex from a recursive computational-experimental structure-activity relationship study. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2013. – V. 21. – P. 1764–1774.
157. Abreu P.A., Castro H.C., Paes-de-Carvalho R., Rodrigues C.R., Giongo V., Paixão I.C.N.P., Santana M.V., Ferreira J.M., Caversan O.M., Leão R.A.C., Marins L.M.S., Henriques A.M., Farias F.M.C., Albuquerque M.G., Pinheiro S. Molecular modeling of a phenyl-amidine class of NMDA receptor antagonists and the rational design of new triazolyl-amidine derivatives. // *Chemical Biology & Drug Design*. – 2013. – V. 81. – P. 185–197.
158. Gronwald C., Vegh V., Hollmann M.W., Hahnenkamp A., Garaj V., Hahnenkamp K. The inhibitory potency of local anesthetics on NMDA receptor signalling depends on their structural features. // *Eur. J. Pharm.* – 2012. – V. 674. – P. 13–19.
159. Krueger B.A., Weil T., Schneider G. Comparative virtual screening and novelty detection for NMDA-Glycine<sub>B</sub> antagonists. // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. – 2009. – V. 23. – P. 869–881.
160. Buyukbingol E., Sisman A., Akyildiz M., Alparslan F.N., Adejare A. Adaptive neuro-fuzzy inference system (ANFIS): A new approach to predictive modeling in QSAR applications: A study of neuro-fuzzy modeling of PCP-based NMDA receptor antagonists. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2007. – V. 15. – P. 4265–4282.
161. Borza I., Bozó É., Barta-Szalai G., Kiss C., Tárkányi G., Demeter A., Gáti T., Háda V., Kolok S., Gere A., Fodor L., Nagy J., Galgóczy K., Magdó I., Ágai B., Fetter J., Bertha F., Keserü G., Horváth C., Farkas S., Greiner I., Domány G. Selective NR1/2B *N*-Methyl-d-aspartate receptor antagonists among Indole-2-carboxamides and benzimidazole-2-carboxamides. // *J. Med. Chem.* – 2007. – V. 50. – P. 901–914.
162. Hans-Peter Buchstaller H.-P., Siebert C.D., Steinmetz R., Frank I., Berger M.L., Gottschlich R., Leibrock J., Krug M., Steinhilber D., Noe C.R. Synthesis of thieno[2,3-*b*]pyridinones acting as cytoprotectants and as inhibitors of [<sup>3</sup>H]glycine binding to the *N*-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor. // *J. Med. Chem.* – 2006. – V. 49. – P. 864–871.

163. Baron B.M., Cregge R.J., Farr R.A., Friedrich D., Gross R.S., Harrison B.L., Janowick D.A., Matthews D., McCloskey T.C., Meikrantz S., Nyce P.L., Vaz R., Metz W.A. CoMFA, synthesis, and pharmacological evaluation of (*E*)-3-(2-carboxy-2-arylvinyl)-4,6-dichloro-1*H*-indole-2-carboxylic acids: 3-[2-(3-aminophenyl)-2-carboxyvinyl]-4,6-dichloro-1*H*-indole-2-carboxylic acid, a potent selective glycine-site NMDA receptor antagonist. // *J. Med. Chem.* – 2005. – V. 48. – P. 995–1018.
164. Patankar S.J., Jurs P.C. Prediction of glycine/NMDA receptor antagonist inhibition from molecular structure. // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 2002. – V. 42. – P. 1053–1068.
165. Tedesco G., Feriani A., Mor M. Statistical analysis on a series of glycine antagonists. // *Il Farmaco.* – 2000, -V. 55. – P. 194–196.
166. Balsamini C., Bedini A., Diamantini G., Spadoni G., Tontini A., Tarzia G. (*E*)-3-(2-(*N*-Phenylcarbamoyl)vinyl)pyrrole-2-carboxylic acid derivatives. A novel class of glycine site antagonists. // *J. Med. Chem.* – V. 1998. – P. 41. – P. 808–820.
167. Kroemer R.T., Koutsilieris E., Hecht P., Liedl K., Riederer P., J. Quantitative analysis of the structural requirements for blockade of the *N*-methyl-d-aspartate receptor at the phencyclidine binding site. // *J. Med. Chem.* – 1998. – V. 41. – P. 393–400.
168. Di Fabio R., Capelli A.M., Conti N., Cugola A., Donati D., Feriani A., Gastaldi P., Gaviraghi G., Hewkin C.T., Micheli F., Missio A., Mugnaini M., Pecunioso A., Quaglia AM., Ratti E., Rossi L., Tedesco G., Trist D.G., Reggiani A. Substituted indole-2-carboxylates as in vivo potent antagonists acting as the strychnine-insensitive glycine binding site. // *J. Med. Chem.* – 1997. – V. – 40. – P. 841–850.
169. Tikhonova I.G., Baskin I.I., Palyulin V.A., Zefirov N.S. CoMFA and homology-based models of the glycine binding site of *N*-methyl-d-aspartate receptor. // *J. Med. Chem.* – 2003. – V. 46. – P. 1609–1616.
170. Tikhonova I.G., Baskin I.I., Palyulin V.A., Zefirov N.S. 3D-model of the ion channel of NMDA receptor: qualitative and quantitative modeling of the blocker binding. // *Dokl. Biochem. Biophys.* – V. 2004. – V. 396. – P. 181–186.
171. Патент США № 5751605. 1998
172. Kvist T., Greenwood J.R., Hansen K.B., Traynelis S.F., Bräuner-Osborne H. Structure-based discovery of antagonists for GluN3-containing *N*-methyl-D-aspartate receptors. // *Neuropharmacology.* – 2013. – V. 75. – P. 324–336.
173. Mony L., Triballeau N., Paoletti P., Acher F.C., Bertrand H.-O. Identification of a novel NR2B-selective NMDA receptor antagonist using a virtual screening approach. // *BMCL.* – 2010. – V. 20. – P. 5552–5558.

174. Ma X.H., Wang R., Yang S.Y., Li Z.R., Xue Y., Wei Y.C., Low B.C., Chen Y.Z. Evaluation of virtual screening performance of support vector machines trained by sparsely distributed active compounds. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2008. – V. 48. – P. 1227–1237.
175. Kaye S.L., Sansom M.S., Biggin P.C. Molecular dynamics simulations of the ligand-binding domain of an N-methyl-D-aspartate receptor. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – P. 12736–12742.
176. Kaye S.L., Sansom M.S., Biggin P.C. In silico mutation of cysteine residues in the ligand-binding domain of an N-methyl-D-aspartate receptor. // *Biochemistry.* – 2007. – V. 46. – P. 2136–2145.
177. Liu L.T., Xu Y., Tang P. Mechanistic insights into xenon inhibition of NMDA receptors from MD simulations. // *J. Phys. Chem. B.* – 2010. – V. 114. – P. 9010–9016.
178. Omotuyi O.I., Ueda H. Molecular dynamics study-based mechanism of nefiracetam-induced NMDA receptor potentiation. // *Comput. Biol. Chem.* – 2015. – V. 55. – P. 14–22.
179. Anfinsen C.B. Principles that govern the folding of protein chains. // *Science.* – 1973. – V. 181. – P. 223–230.
180. Marti-Renom M.A., Stuart A., Fiser A., Sánchez R., Melo F., Sali A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2000. – V. 29. – P. 291–325.
181. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. // *Bioinformatics.* – 2007. – V. 23. – P. 2947–2948.
182. Henikoff S.S., Henikoff J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89. – P. 10915–10919.
183. Shen M.Y., Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. // *Protein Sci.* – 2006. – V. 15. – P. 2507–2524.
184. Tikhonova I.G., Baskin I.I., Palyulin V.A., Zefirov N.S. Molecular modeling of N-terminal domains of NMDA-receptor. Study of ligand binding to N-terminal domains. // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2004. – V. 397. – P. 242–250.
185. Zhao S., Zhu K., Li J., Friesner R.A. Progress in super long loop prediction. // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* – 2011. – V. 79. – P. 2920–2935.
186. Ponder J.W., Case D.A. Force fields for protein simulations. // *Adv. Prot. Chem.* – 2003. – V. 66. – P. 27–85.

187. H. J. C. Berendsen<sup>1</sup>, J. P. M. Postma<sup>1</sup>, W. F. van Gunsteren<sup>1</sup>, A. DiNola<sup>1</sup> and J. R. Haak<sup>1</sup>. Molecular dynamics with coupling to an external bath. // *J. Chem. Phys.* – 1984. – V. 81. – P. 3684–3690.
188. Kollman P.A., Massova I., Reyes C., Kuhn B., Huo S., Chong L., Lee M., Lee T., Duan Y., Wang W., Donini O., Cieplak P., Srinivasan J., Case D. A., Cheatham T.E. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. // *Acc. Chem. Res.* – 2000. – V. 33. – P. 889–897.
189. Luo R., David L., Gilson M.K. Accelerated Poisson–Boltzmann calculations for static and dynamic systems. // *J. Comput. Chem.* – 2002. – V. 23. – P. 1244–1253.
190. Tsui V., Case D. A. Theory and applications of the generalized born solvation model in macromolecular simulations. // *Biopolymers.* – 2000. – V. 56. – P. 275–291.
191. Sirrieh R.E., MacLean D.M., Jayaraman V. A conserved structural mechanism of NMDA receptor inhibition: A comparison of ifenprodil and zinc. // *J. Gen. Physiol.* – 2015. – V. 146. – P. 173–181.
192. McCauley J.A., Theberge C.R., Romano J.J., Billings S.B., Anderson K.D., Claremon D.A., Freidinger R.M., Bednar R.A., Mosser S.D., Gaul S.L., Connolly T.M., Condra C.L., Xia M., Cunningham M.E., Bednar B., Stump G.L., Lynch J.J., Macaulay A., Wafford K.A., Koblan K.S., Liverton N.J. NR2B-Selective N-Methyl-d-aspartate Antagonists: Synthesis and Evaluation of 5-Substituted Benzimidazoles // *J. Med. Chem.* – 2004. – V. 47. – P. 2089-2096.
193. Pinard E., Alanine A., Bourson A., Büttelmann B., Heitz M.-P., Mutel V., Gill R., Trube G., Wyler R. 4-Aminoquinolines as a novel class of NR1/2B subtype selective NMDA receptor antagonists. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2002. – V. 12. – P. 2615–2619.
194. Curtis N.R., Diggle H.J., Kulagowski J.J., London C., Grimwood S., Hutson P.H., Murray F., Richards P., Macaulay A., Wafford K.A. Novel N1-(benzyl)cinnamamide derived NR2B subtype-selective NMDA receptor antagonists. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2003. – V. 13. – P. 693–696.
195. Claiborne C.F., McCauley J.A., Libby B.E., Curtis N.R., Diggle H.J., Kulagowski J.J., Michelson S.R., Anderson K.D., Claremon D.A., Freidinger R.M., Bednar R.A., Mosser S.D., Gaul S.L., Connolly T.M., Condra C.L., Bednar B., Stump G.L., Lynch J.J., Macaulay A., Wafford K.A., Koblan K.S. Orally Efficacious NR2B-Selective NMDA Receptor Antagonists. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2003. – V. 13. – P. 697–700.
196. Büttelmann B., Alanine A., Bourson A., Gill R., Heitz M.-P., Mutel V., Pinard E., Trube G., Wyler R. 2-(3,4-Dihydro-1H-isoquinolin-2-yl)-pyridines as a novel

- class of NR1/2B subtype selective NMDA receptor antagonists. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2003. – V. 13. – P. 829–832.
197. Büttelmann B., Alanine A., Bourson A., Gill R., Heitz M.-P., Mutel V., Pinard E., Trube G., Wyler R. 4-(3,4-Dihydro-1H-isoquinolin-2-yl)-pyridines and 4-(3,4-Dihydro-1H-isoquinolin-2-yl)-quinolines as potent NR1/2B subtype selective NMDA receptor antagonists. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2003. – V. 13. – P. 1759–1762.
198. Barta-Szalai G., Borza I., Bozó E., Kiss C., Ágai B., Proszenyák A., Keserű G.M., Gere A., Kolok S., Galgóczy K., Horváth C., Farkas S., Domány G. Oxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2004. – V. 14. – P. 3953–3956.
199. Borza I., Kolok S., Gere A., Nagy J., Fodor L., Galgóczy K., Fetter J., Bertha F., Ágai B., Horváth C., Farkas S., Domány G. Benzimidazole-2-carboxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2006. – V. 16. – P. 4638–4640.
200. Grant J.A., Pickup B., Nicholls A. A Smooth Permittivity Function for Poisson-Boltzmann Solvation Methods // *J. Comp. Chem.* – 2001. – V. 22. – P. 608–640.
201. Cramer R.D., Patterson D.E., Bunce J.D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1988. – V. 110. – P. 5959–5967.
202. Clark M., Cramer III R.D., Van Opdenbosch N. Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. // *J. Comput. Chem.* – 1989. – V. 10. – P. 982–1012.
203. Gasteiger J., Marsili M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges. // *Tetrahedron.* – 1980. – V. 36. – P. 3219–3228.
204. Del Re G. A simple MO-LCAO method for the calculation of charge distributions in saturated organic molecules. // *J. Chem. Soc.* – 1958. – P. 4031–4040.
205. Berthod H., Giessner-Prettre C., Pullman A. Sur les rôles respectifs des électrons  $\sigma$  et  $\pi$  dans les propriétés des dérivés halogénés des molécules conjuguées. Application à l'étude de l'uracile et du fluorouracile. // *Theor. Chim. Acta.* – 1967. – V. 8. – P. 212–222.
206. Halgren T.A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. // *J. Comp. Chem.* – V. 17. – P. 490–519.
207. Muegge I., Oloff S. Advances in virtual screening. // *Drug Discovery Today: Technologies.* – 2006. – V. 3 – P. 405–411.

208. OpenEye Scientific Software. 9 Bisbee Court, Suite D. Santa Fe. New Mexico. 87508. USA.
209. McGaughey G.B., Sheridan R.P., Bayly C.I., Culberson J.C., Kreamsoulas C., Lindsley S., Maiorov V., Truchon J.-F., Cornell W.D. Comparison of Topological, Shape, and Docking Methods in Virtual Screening. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2007. – V. 47. – P. 1504–1519.
210. Hawkins P.C.D., Skillman A.G, Warren G.L., Ellingson B.A., Stahl M.T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2010. – V. 50. – P. 572-584.
211. Rush T.S., Grant J.A., Mosyak L., Nicholls A. A Shape-Based 3-D Scaffold Hopping Method and Its Application to a Bacterial Protein–Protein Interaction. // *J. Med. Chem.* – 2005. – V. 48. – P. 1489–1495.
212. <http://docs.eyesopen.com/toolkits/python/dockingtk/scoring.html#chemgauss4>
213. <http://docs.eyesopen.com/toolkits/python/dockingtk/scoring.html#chemgauss3>
214. Verkhivker G.M., Bouzida D., Gehlhaar D.K., Rejto P.A., Arthurs S., Colson A.B., Freer S.T., Larson V., Luty B.A., Marrone T., Rose R.W. Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. // *J. Comp.-Aided Molec. Des.* – 2000. – V. 14. – P. 731–751.
215. Eldridge M. D., Murray C.W., Auton T.R., Paolini G.V., Mee R.P., // *J. Comp.-Aided Molec. Des.*, – 1997. – V. 11. – P. 425–445.
216. McGann M., Almond H.R, Nicholls A., Grant J.A., Brown F.K., Gaussian Docking Functions. // *BioPolymers.* – 2003. – V. 68. – P. 76–90.
217. Jones G., Willett P., Glen R., Leach A.R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking // *J. Mol. Biol.* – 1997. – V. 267 – P. 727–748.
218. Kuntz I.D., Blaney J.M., Oatley S.J., Langridge R., Ferrin T.E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. // *J. Mol. Biol.* – 1982. – V. 161. – P. 269–288.
219. Muegge I., Martin Y.C. A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach. // *J. Med. Chem.* – 1999. – V. 42. – P. 791–804.
220. [trypos.com](http://trypos.com)
221. Fawcett T. An introduction to ROC analysis // *Pattern Recognition Letters.* – 2006. V. 27. – P. 861–874.
222. Hanczar B., Hua J., Sima C., Weinstein J., Bittner M., Dougherty E.R. Small-sample precision of ROC-related estimates. // *Bioinformatics.* – 2010. – V. 26. – P. 822–830.

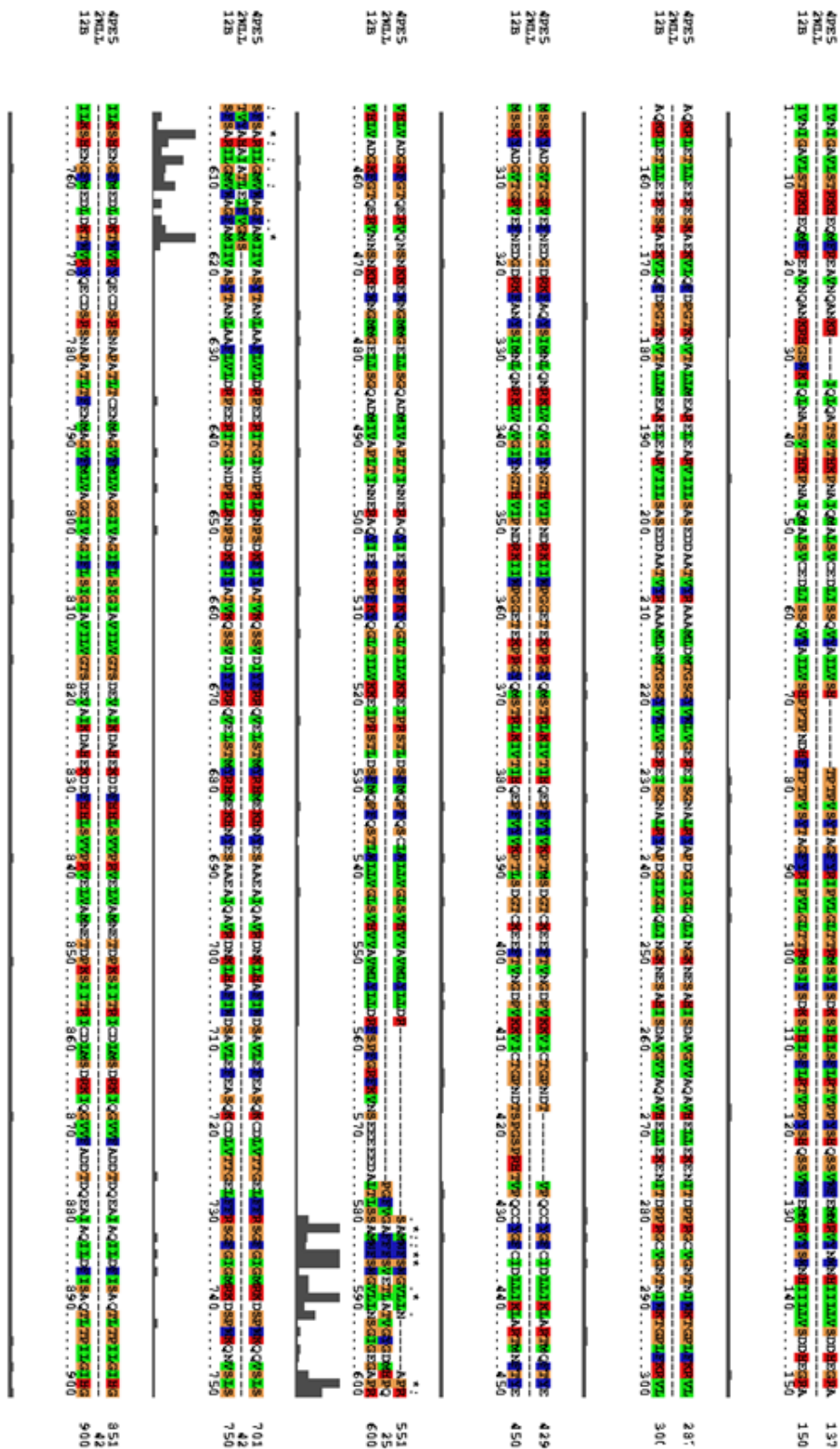
223. Huang N., Shoichet B.K., Irwin J.J. Benchmarking sets for molecular docking. // *J. Med. Chem.* – 2006. – V. 49. – P. 6789–6801.
224. Irwin J.J., Sterling T., Mysinger M.M., Bolstad E.S., Coleman R.G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2012. – V. 52. – P. 1757–1768.
225. Teague D., Leeson O. The design of leadlike combinatorial libraries. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1999. – V. 38 – P. 3743–3748.
226. [http://docs.eyesopen.com/omega/filter\\_theory.html](http://docs.eyesopen.com/omega/filter_theory.html)
227. Le Guilloux V., Schmidtke P., Tuffery P. Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. // *BMC Bioinformatics.* – 2009. – V. 10. – P. 168–179.
228. Davis I.W., Raha K., Head M.S., Baker D. Blind docking of pharmaceutically relevant compounds using RosettaLigand. // *Protein Sci.* – 2009. – V. 18. – P. 1998–2002.
229. <http://www.eyesopen.com/toolkits>
230. Ben-Shimon A., Niv M.Y. AnchorDock: blind and flexible anchor-driven peptide docking. // *Structure.* – 2015. – V. 23. – P. 929–940.
231. Acker T.M., Khatri A., Vance K.M., Slabber C., Bacsa J., Snyder J.P., Traynelis S.F., Liotta D.C. Structure-activity relationships and pharmacophore model of a noncompetitive pyrazoline containing class of GluN2C/GluN2D selective antagonists. // *J. Med. Chem.* – 2013. – V. 56. – P. 6434–6456.
232. Leaver-Fay A., O'Meara M.J., Tyka M., Jacak R., Song Y., Kellogg E.H. Scientific Benchmarks for Guiding Macromolecular Energy Function Improvement. In: Keating AE, editor. *Methods in Protein Design. Methods in Enzymology.* – 2013. – V. 523. – P. 109–43.
233. Royston P. An extension of Shapiro and Wilk's *W* test for normality to large samples. // *Applied Statistics.* – 1982. – V. 31. – P. 115–124.
234. Schaffhauser H., Mathiasen J.R, DiCamillo A., Huffman M.J., Lu L.D., McKenna B.A., Qian J., Marino M.J. Dimebolin is a 5-HT<sub>6</sub> antagonist with acute cognition enhancing activities. // *Biochemical Pharmacology.* – 2009. – V. 78. – P. 1035–1042.
235. Hansen K.B., Traynelis S.F. Structural and mechanistic determinants of a novel Site for noncompetitive inhibition of GluN2D-containing NMDA receptors. // *J. Neuroscience.* – 2011. – V. 31. – P. 3650–3661.
236. Palyulin V.A., Radchenko E.V., Zefirov N.S. Molecular Field Topology Analysis Method in QSAR Studies of Organic Compounds. // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 2000. – 40. – P. 659–667.
237. Burnashev N., Monyer H., Seeburg P.H., Sakmann B. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. // *Neuron.* – 1992. – V. 8. – P. 189–198.

238. Patel N.C., Schwarz J., Hou X.J., Hoover D.J., Xie L., Fliri A.J., Gallaschun R.J., Lazzaro J.T., Bryce D.K., Hoffmann W.E., Hanks A.N., McGinnis D., Marr E.S., Gazard J.L., Hajós M., Scialis R.J., Hurst R.S., Shaffer C.L., Pandit J., O'Donnell C.J. Discovery and characterization of a novel dihydroisoxazole class of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor potentiators. // *J. Med. Chem.* – 2013. – V. 56. – P. 9180–9191
239. Krintel C., Harpsøe K., Zachariassen L.G., Peters D., Frydenvang K., Pickering D.S., Gajhede M., Kastrup J.S. Structural analysis of the positive AMPA receptor modulators CX516 and Me-CX516 in complex with the GluA2 ligand-binding domain. // *Acta Cryst.* – 2013. – V. D69. – P. 1645–1652.
240. Hald H., Ahring P.K., Timmermann D.B., Liljefors T., Gajhede M., Kastrup J.S., Distinct structural features of cyclothiazide are responsible for effects on peak current amplitude and desensitization kinetics at iGluR2 // *J. Mol. Biol.* – 2009 – V. 391. – P. 906–917.
241. Jamieson C., Basten S., Campbell R.A., Cumming I.A., Gillena K.J., Gillespie J., Kazemier B., Kiczun M., Lamont Y., Lyons A.J., Maclean J.K.F., Moir E.M., Morrow J.A., Papakosta M., Rankovic Z., Smith L. A novel series of positive modulators of the AMPA receptor: Discovery and structure based hit-to-lead studies. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – V. 20. – P. 5753–5756.
242. Jamieson C., Campbell R.A., Cumming I.A., Gillen K.J., Gillespie J., Kazemier B., Kiczun M., Lamont Y., Lyons A.J., Maclean J.K.F., Martin F., Moir E.M., Morrow J.A., Pantlinga J., Rankovic Z., Smith L. A novel series of positive modulators of the AMPA receptor: Structure-based lead optimization. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – V. 20. – P. 6072–6075.
243. Jamieson C., Maclean J.K.F., Brown C.I., Campbell R.A., Gillen K.J., Gillespie J., Kazemier B., Kiczun M., Lamont Y., Lyons A.J., Moir E.M., Morrow J.A., Pantling J., Rankovic Z., Smith L. Structure based evolution of a novel series of positive modulators of the AMPA receptor. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – V. 21. – P. 805–811.
244. Timm D.E., Benveniste M., Weeks A.M., Nisenbaum E.S., Partin K.M. Structural and functional analysis of two new positive allosteric modulators of GluA2 desensitization and deactivation. // *Mol. Pharm.* – 2011. – V. 80. – P. 267–280.
245. Ward S.E, Harries M., Aldegheri L., Andreotti D., Ballantine S., Bax B.D., Harris A.J., Harker A.J., Lund J., Melarange R., Mingardi A., Mookherjee C., Mosley J., Neve M., Oliosi B., Profeta R., Smith K.J., Smith P.W., Spada S., Thewlis K.M., Yusaf S.P. Discovery of N-[(2S)-5-(6-Fluoro-3-pyridinyl)-2,3-dihydro-1H-inden-2-yl]-2-propanesulfonamide, a novel clinical AMPA receptor positive modulator. // *J. Med. Chem.* – 2010. – V. 53. – P. 5801–5812.



246. Ward S.E., Harries M., Aldegheri L., Austin N.E., Ballantine S., Ballini E., Bradley D.M., Bax B.D., Clarke B.P., Harris A.J., Harrison S.A., Melarange R.A., Mookherjee C., Mosley J., Dal Negro G., Oliosi B., Smith K.J., Thewlis K.M., Woollard P.M., Yusaf S.P. Integration of lead optimization with crystallography for a membrane-bound ion channel target: discovery of a new class of AMPA receptor positive allosteric modulators. // *J. Med. Chem.* – 2011. – V. 54. – P. 78–94.
247. Urniaż R.D., Józwiak K. X-ray Crystallographic Structures as a Source of Ligand Alignment in 3D-QSAR. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2013. – V. 53. – P. 1406–1414.
248. Mittal R.R., Harris L., McKinnon R.S., Sorich M.J. Partial Charge Calculation Method Affects CoMFA QSAR Prediction Accuracy. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2009. – V. 49. – P. 704–709.
249. Cook R.D. Detection of Influential Observation in Linear Regression. // *Technometrics.* – 1977. – V. 19. – P. 15–18.
250. Hayward S., Berendsen H.J.C. Systematic Analysis of Domain Motions in Proteins from Conformational Change; New Results on Citrate Synthase and T4 Lysozyme. // *Proteins, Structure, Function and Genetics.* – 1998. – V. 30. – P. 144154.

Приложение 1А. Выравнивание аминокислотных последовательностей GluN1/GluN2B (Код PDB – 4PE5, *Rattus norvegicus*), калиевого канала Kirbac1.1 (Код PDB - 2WLL, *Burkholderia pseudomallei*) и GluN1/GluN2B (*Homo sapiens*)







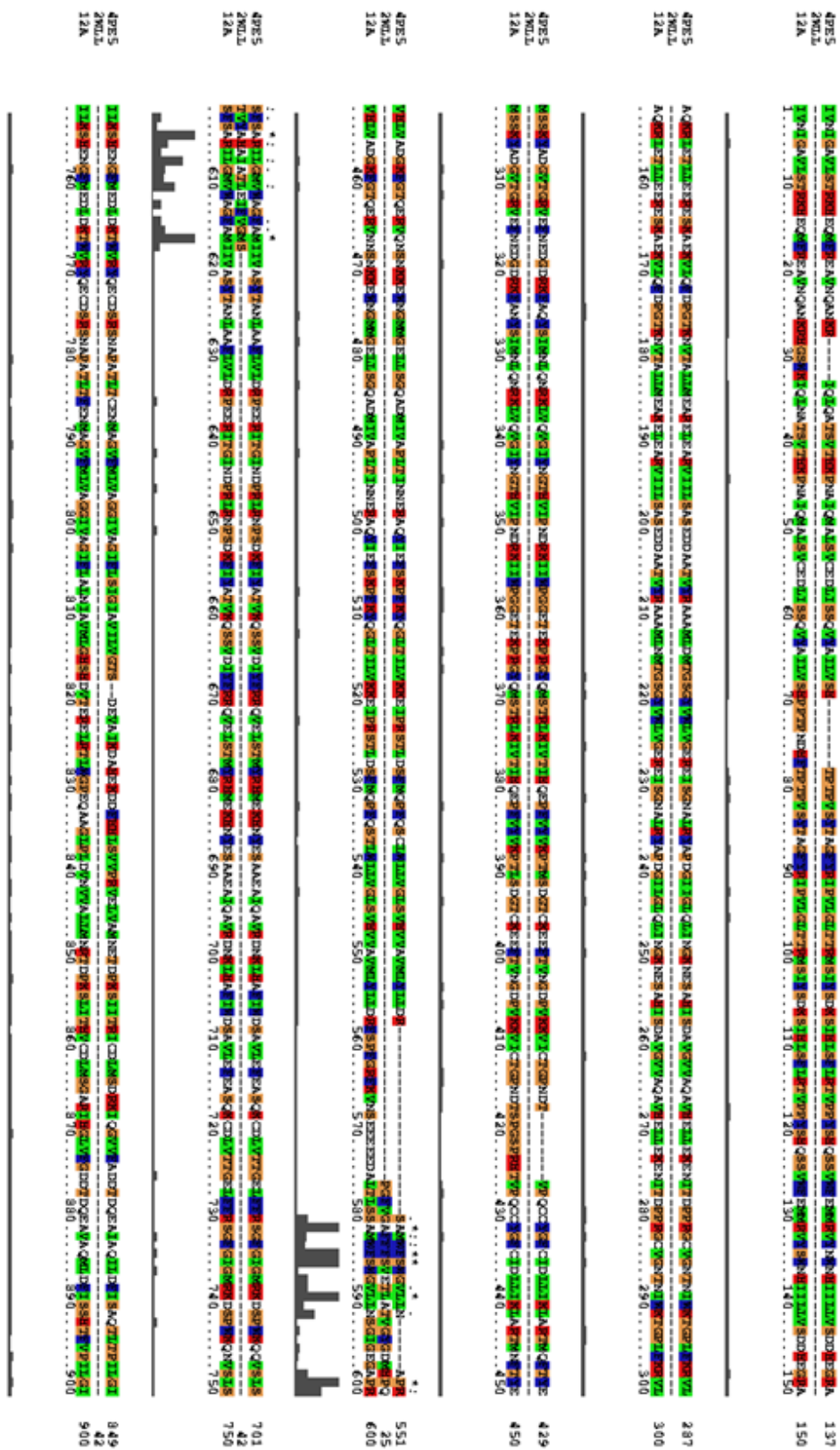
4PE5 290.L 12B  
 NHTDEG...  
 2670  
 146  
 2850

4PE5 290.L 12B  
 NHTDEG...  
 2779  
 148  
 3000

4PE5 290.L 12B  
 NHTDEG...  
 2921  
 168  
 3150

4PE5 290.L 12B  
 NHTDEG...  
 3220

Приложение 1Б. Выравнивание аминокислотных последовательностей GluN1/GluN2B (Код PDB – 4PE5, *Rattus norvegicus*), калиевого канала Kirbac1.1 (Код PDB - 2WLL, *Burkholderia pseudomallei*) и GluN1/GluN2D (*Homo sapiens*)









4PE5  
2MULT  
12D

P D E L A L I T T T A A S D M S E S E S P E R S S C Q V T I E K I I Q S N D N Y R K I N V T E C E D T S S E D C Q E P E L V I I I I N E I E R Q E P V C E Q D S K C K R C V Y A P E N T  
 A A G V A V F A S K Q A L D S E P E S D C E K Q N T H E G E S T A E R E N D I D N D S E N D S E L I N P S L V I S L N G D P E P S V S Q C H E L K P L S E X C E R Q P D D C E L V A T I E E P E V I Y P A D P E L S G T C R D S V P C S Q L N E  
 2710.....2730.....2740.....2750.....2760.....2770.....2780.....2790.....2800.....2810.....2820.....2830.....2840.....2850

4PE5  
2MULT  
12D

I I K C C K E Q C D I I A K I S K S V E A I D P L V I N E R E C K I N E I I N E M I G E V Y W E A V M A V S S I T I N E R S E V Y D S V E P T C G I S W M A S E I D P S R A V W W E W M C I T V W A V T V E I I D V I S E Y G P R S I A N  
 T S P P P D A P R P P E R C C K E G C D I I A K I A E T I G E S P D L V I N E R E C K I D S V P E M I G E P E P C A A M A V S S I T I N E R S E V Y D S V E P T C G I S W M A S E I D P S R A V W W E W M C I T V W A V T V E I I D V I S E Y G P R S I A N  
 2860.....2880.....2890.....2900.....2910.....2920.....2930.....2940.....2950.....2960.....2970.....2980.....2990.....3000

4PE5  
2MULT  
12D

K A I T I A I G I V E T I N V S P A E R A I T P A S E P I N K A L Q M E S I D Q S G S I D E K C Q P N D S P P E S G I W P N G S S E R Y I P N K A E R A E P G E N C S D N A I P S I X E C I D A E I P D A K V N S A E  
 G R P G S S T P I K E S I I L M A V Y A M S Y P C A P R G I T S I V A V P A S E I P A S E I P A S E Q M E C P D T Y S G S I D E R E C P E Q C P P E R S G I W P N G S S E R Y I P N K A E R A E P G E N C S D N A I P S I X E C I D A E I P D A K V N S A E  
 3010.....3020.....3030.....3040.....3050.....3060.....3070.....3080.....3090.....3100.....3110.....3120.....3130.....3140.....3150

4PE5  
2MULT  
12D

P D E C C I L V T Y T G S C K V A S T C G S A M Q I D S C S Q G Q I D E A I N Q E G D E P E E P E A L I N K C I N E K N E V W S S Q I D C D N I A G V E S I P I G A A M A I S I L T I S  
 K D E G C I L V T Y T G S C K V A S T C G S A L I N G S S I K P P I D A L I C E G D D E P E M P E L I S G I C I N D K I E V W S S I D I D N I A G V E S I P I G A A M A I S I L T I S  
 3160.....3170.....3180.....3190.....3200.....3210.....3220.....3230.....3240.....3250

