

ПРЕДСКАЗАНИЕ АКТИВНОСТИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНГИБИТОРОВ АКТИВАЦИИ КЛАССИЧЕСКОГО ПУТИ КОМПЛЕМЕНТА МЕТОДОМ КОМПЬЮТЕРНОГО СКРИНИНГА

*Д.М. Карлинский, аспирант, *А.П. Каплун, профессор,

**М.Е. Попов, старший научный сотрудник

*кафедра Биотехнологии и нанобиотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

**Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
e-mail: karlinskyd@mail.ru

С помощью молекулярного докинга оценена свободная энергия связывания низкомолекулярных лигандов с белком первого компонента комплемента C1q *in silico*. Теоретически рассчитанная константа IC_{50} позволяет отобрать наиболее перспективные ингибиторы активации комплемента.

Ключевые слова: C1q, IgG, низкомолекулярные ингибиторы, компьютерная модель, молекулярный докинг, скрининг.

Введение

Система комплемента является частью иммунной системы, она осуществляет неспецифическую защиту от бактерий и других антигенов. Комплемент дополняет и усиливает действие антител, вследствие чего и получил свое название. Система комплемента состоит из ~20 различных белков – факторов (компонентов) комплемента, которые находятся в плазме крови и составляют около 4% от всех белков плазмы.

Первым этапом активации системы комплемента по классическому пути является связывание глобулярной части C1q, одного из белков в составе первого компонента системы комплемента C1, с Fc-доменами антител IgG или IgM. При некоторых патологических состояниях чрезмерная или несвоевременная активация комплемента может нанести вред организму. Ее предотвращение актуально при лечении таких болезней, как инфаркт миокарда, бронхиальная астма, болезнь Альцгеймера, отторжение органов при трансплантациях, рассеянный склероз и др. [1–6]. Ведется поиск новых, более эффективных ингибиторов этого взаимодействия для использования в лекарственных препаратах. Перспективными ингибиторами являются низкомолекулярные отрицательно заряженные лиганды с гидрофобным ядром [1].

В последнее время получили большое распространение расчеты взаимодействий макромолекул с низкомолекулярными лигандами *in silico*, то есть компьютерными методами – они обычно быстрее и дешевле методов *in vitro*, т.е. эксперимента в пробирке [7–9]. В случае взаимодействия C1q с низко-

молекулярными лигандами расчет осложняется отсутствием структурно обособленного сайта связывания. Глобула C1q состоит из трех цепей (A, B, C) и равномерно покрыта положительно заряженными остатками Lys и Arg, боковые цепи которых экспонированы в раствор и могут участвовать в связывании отрицательно заряженных лигандов [4].

В предыдущей работе [10] мы выполнили поиск возможного сайта связывания низкомолекулярных лигандов, который ответствен за ингибирование взаимодействия C1q с антителами. Для поиска этого сайта мы использовали метод «слепого докинга» («blind docking») [11].

Сотрудниками группы проф. А.П. Каплуна кафедры БТ и НБТ МИТХТ был предоставлен набор формул лигандов с экспериментальными значениями IC_{50} [1, 2, устные и письменные сообщения]. IC_{50} – это концентрация полумаксимального ингибирования [мкМ], то есть концентрация ингибитора, при которой активность его мишени составляет 50% от исходной. Из этого набора мы выбрали 22 лиганда, отображающих спектр активности – от высокой до низкой.

Непосредственным результатом докинга этих 22-х отрицательно заряженных низкомолекулярных лигандов на поверхность глобулы C1q явились компьютерные трехмерные модели с 500 вариантами возможного связывания каждого из исследованных лигандов. Для каждой из этих моделей связывания лиганда с рецептором нами была определена расчетная свободная энергия связывания (Estimated Free Energy of Binding).

Таблица 1. Потенциальные сайты связывания C1q с низкомолекулярными лигандами (А, В, С – обозначения полипептидных цепей в составе глобулы gC1q) [10].

№ сайта связывания	Число лигандов, связывающихся на данном сайте (из 22 исследованных)	R ²	Ближайшие положительно заряженные аминокислоты
1 (без Ca ²⁺)	22	0.55	Lys ^{A173} , His ^{C167} , Lys ^{C170}
1 (с Ca ²⁺)	22	0.33	Lys ^{A173} , His ^{C167} , Lys ^{C170}
2	22	0.37	Arg ^{A163} , Lys ^{A197} , Lys ^{A201}
3	22	0.30	Arg ^{B101} , Arg ^{B108} , Arg ^{B150} , Lys ^{B202}
4	22	0.42	Arg ^{C98} , His ^{C101}
5	19	0.50	Lys ^{A197} , His ^{A203}
6	19	0.15	Arg ^{C98} , Arg ^{C111} , Lys ^{C129} , Lys ^{C160}
7	19	0.06	Arg ^{C98} , His ^{C101} , Arg ^{C111} , Lys ^{C129}
8	20	0.30	Arg ^{A158} , Arg ^{A162} , Arg ^{A163}
9	19	0.34	Arg ^{A92} , Arg ^{B159} , Arg ^{B161} , Arg ^{B163} , Lys ^{B166} , Lys ^{B188}
10	21	0.14	Arg ^{B101} , His ^{B117} , Arg ^{C156} , Lys ^{C160} , Arg ^{C182}
11	22	0.49	Lys ^{B94} , Lys ^{B136} , Arg ^{C156} , Arg ^{C182}
12	22	0.03	Arg ^{B101} , Arg ^{B108} , Arg ^{B114} , Arg ^{B129} , Lys ^{B132}
13	19	0.05	Arg ^{B150} , Lys ^{C160} , His ^{C167}

Сайты, на которых происходило связывание не менее 80% лигандов, были рассмотрены на предмет минимального значения свободной энергии связывания. Нами была проанализирована корреляция значений расчетной свободной энергии связывания лигандов с рецептором и экспериментальной IC₅₀ (табл. 1).

В работе [10] мы указывали, что наилучшая корреляция (R² = 0.55) свободной энергии связывания и IC₅₀ соответствует сайту на “вершине” C1q в отсутствие иона Ca²⁺ (R² – коэффициент определения, квадрат коэффициента корреляции).

Материалы и методы

Оборудование

Расчет был произведен на вычислительных мощностях лаборатории химии ферментов ИБХ (рабочие станции: Athlon 2000+ и вычислительный кластер).

Программы

Операционная система: Linux. Программы: программный пакет Autodock 3.0.5 [12–14], JME Editor, Dundee PRODRG2.5 Server beta, SWISS PDB VIEWER (Deep View), Microsoft Word, Microsoft Excel и др.

Материалы

– Файл с моделью рецептора в формате .pdb (protein data bank). Файл формата .pdb, содержащий трехмерную модель глобулярной части C1q (структура 1PK6 в PDB разрешение 1.85Å, 2003 г. [4]). Из файла с трехмерной структурой gC1q удалены модели молекул кристаллизационной воды и иона кальция. Наименование файла: 1pk6.pdb.

– Файлы с моделями лигандов в формате .pdbq (protein data bank with partial charges).

Для каждого лиганда на Dundee PRODRG2 Server (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/>) на основе структурных формул лигандов получены трехмерные структуры в формате PDB с парциальными зарядами. При этом задавались следующие параметры: Chirality – Yes (хиральность учитывается), Charges – Full (заряды полные), EM – Yes (минимизация энергии проводится), Force field – GROMOS96.1.

Обсуждение результатов

Был проведен компьютерный скрининг ряда лигандов на C1q, то есть последовательный докинг лигандов на заданные сайты связывания, и на основе этого была предсказана их IC₅₀. Структуры лигандов были выбраны на основе сведений об активности их аналогов, а также лабораторных возможностей для синтеза этих веществ. Среди моделируемых для скрининга сайтов связывания

Для конкурентного невалентного ингибирования соотношение между Гиббсовой свободной энергией связывания и IC₅₀ (концентрацией ингибитора, вызывающей 50% ингибирование) выражается следующей формулой:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_i \quad (1)$$

$$IC_{50} = K_i \cdot \left(\frac{[IgG]}{K_d} \right) \quad (2)$$

где ΔG – Гиббсова свободная энергия связывания; T – температура (T = 298.15 K); R – универсальная газовая постоянная (R = 8.314 Дж/(моль·K)); K_d – константа диссоциации комплекса gC1q с IgG; K_i – константа ингибирования. Таким образом, поскольку

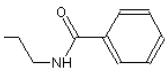
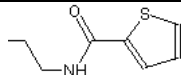
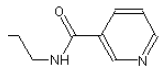
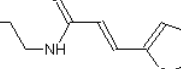
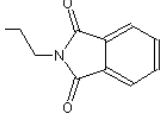
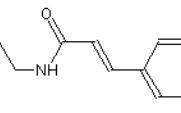
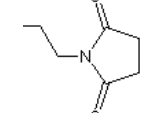
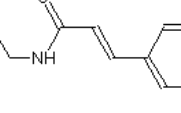
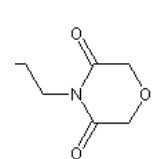
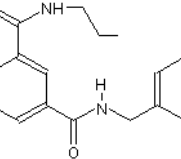
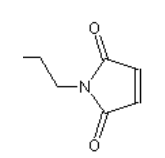
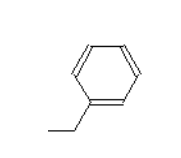
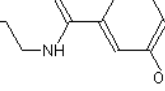
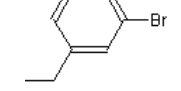
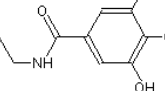
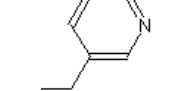
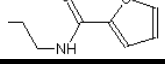
при переходе от одного лиганда к другому значение в скобках формулы (2) неизменно, то ΔG прямо пропорционально $\ln IC_{50}$, а значит, по корреляции расчетной свободной энергии связывания лиганда с сайтом и $\ln IC_{50}$ можно оценить, является ли этот сайт ключевым для ингибирования. На основе корреляции экспериментально полученных значений $\ln IC_{50}$ и теоретически рассчитанной ΔG для ряда лигандов можно оценить IC_{50} для новых лигандов, которые участвовали только в вычислительном эксперименте и не проходили исследований *in vitro*.

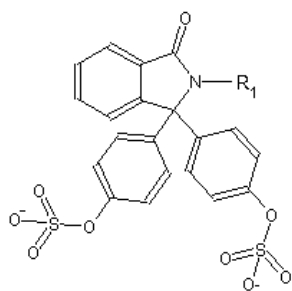
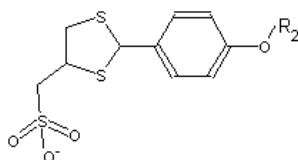
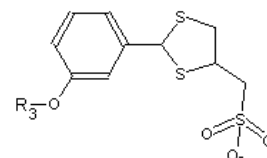
Основываясь на методе, изложенном в работе [11], были заданы следующие параметры расчетов: число поколений генетического алгоритма (number of generations): 10.000.000; количество определений энергии (# Energy evaluations):

10.000.000; размер популяции генетического алгоритма (populations in the genetic algorithm): 300; число заходов генетического алгоритма (ga_run): 100.

В табл. 2–4, 7 и 8 описан результат докинга на сайт 1 без Ca^{2+} , выбранный по причине лучшей корреляции (см. табл. 1). Однако также был проведен докинг на сайт 1 с Ca^{2+} , как на перспективный из-за приблизительно самой высокой по модулю энергии связывания (табл. 5–8). Для сайтов 5 и 11 был тоже проведен ряд расчетов (табл. 7, 8), поскольку они также обладают хорошей корреляцией расчетной свободной энергии связывания и $\ln IC_{50}$, хотя и уступают сайту 1 без Ca^{2+} . Все эти результаты могут быть полезными для предсказания активности новых низкомолекулярных ингибиторов связывания C1q с IgG.

Таблица 2. Предсказание IC_{50} [мкМ] лигандов 1–17 на основе расчетной свободной энергии связывания [кДж/моль] с сайтом 1 (без Ca^{2+}).

№ лиганда	R ₁ (см. рис. 1)	E _{free}	IC ₅₀ теор	№ лиганда	R ₁ (см. рис. 1)	E _{free}	IC ₅₀ теор
1		-53.59	0.26	10		-47.48	3.06
2		-54.30	0.19	11		-47.44	3.11
3		-46.89	3.88	12		-47.90	2.58
4		-47.23	3.39	13		-46.77	4.08
5		-45.30	7.39	14		-48.11	2.37
6		-44.84	8.90	15		-46.22	5.09
7		-45.01	8.32	16		-43.63	14.6
8		-52.42	0.41	17		-43.84	13.4
9		-42.08	27.3				

Рис. 1. Общая структурная формула лигандов **1–17**.Рис. 2. Общая структурная формула лигандов **18–27**.Рис. 3. Общая структурная формула лигандов **28–30**.Таблица 3. Предсказание IC_{50} [мкМ] лигандов **18–30** на основе расчетной свободной энергии связывания [кДж/моль] с сайтом 1 (без Ca^{2+}).

№ лиганд а	R	E_{free}	IC_{50} теор	№ лиганд а	R	E_{free}	IC_{50} теор
R≡R ₂ (см. рис. 2)				24	-C(C ₆ H ₅) ₃	-40.36	55.0
18	-CH ₂ -C ₆ H ₅	-42.20	27.8	25		-51.00	1.06
19		-43.88	14.9	26		-41.49	36.2
20		-47.94	3.30	27		-45.34	8.65
21		-44.59	11.4	R≡R ₃ (см. рис. 3)			
22	H	-37.97	134	28	-CH ₂ -C ₆ H ₅	-45.34	8.65
23		-44.92	10.1	29	-CH(C ₆ H ₅) ₂	-52.29	0.65
				30	H	-41.49	36.2

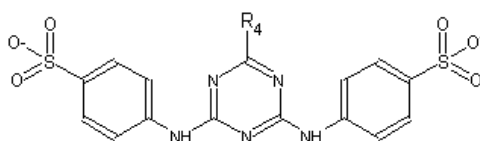
Таблица 4. Предсказание IC_{50} [мкМ] лигандов **31–40** на основе расчетной свободной энергии связывания [кДж/моль] с сайтом 1 (без Ca^{2+}).

№ лиганда	Структурная формула лиганда	E_{free}	IC_{50} теор	№ лиганда	Структурная формула лиганда	E_{free}	IC_{50} теор
1	2	3	4	5	6	7	8
31		-35.13	454	36		-45.43	7.02
32		-39.40	80.6	37		-52.96	0.33

1	2	3	4	5	6	7	8
33		-48.65	1.90	38		-45.22	7.64
34		-42.29	25.0	39		-58.74	0.032
35		-56.44	0.08	40		-38.94	93.4

Таблица 5. Предсказание IC₅₀ [мкМ] лигандов **41–48** на основе расчетной свободной энергии связывания [кДж/моль] с сайтом 1 (с Ca²⁺).

№ лиганда	R ₁ (см. рис. 1)	E _{free}	IC ₅₀ теор	№ лиганда	R ₁ (см. рис. 1)	E _{free}	IC ₅₀ теор
41	-(CH ₂) ₂ -NH-C(O)-CH ₃	-51.29	69.7	45	-(CH ₂) ₂ -NH-C(O)-(CH ₂) ₄ -CH ₃	-54.43	41.9
42	-(CH ₂) ₂ -NH-C(O)-C ₂ H ₅	-50.03	85.5	46	-(CH ₂) ₂ -NH-C(O)-(CH ₂) ₅ -CH ₃	-49.19	98.0
43	-(CH ₂) ₂ -NH-C(O)-(CH ₂) ₂ -CH ₃	-48.11	117	47	-(CH ₂) ₂ -NH-C(O)-(CH ₂) ₆ -CH ₃	-47.48	129
44	-(CH ₂) ₂ -NH-C(O)-(CH ₂) ₃ -CH ₃	-50.33	81.5	48	-(CH ₂) ₂ -NH-C(O)-(CH ₂) ₇ -CH ₃	-50.70	76.7

Рис. 4. Общая структурная формула лигандов **49–59**; **64–67**.Таблица 6. Предсказание IC₅₀ [мкМ] лигандов **49–59** на основе расчетной свободной энергии связывания [кДж/моль] с сайтом 1 (с Ca²⁺).

№ лиганда	R ₄ (см. рис. 4)	E _{free}	IC ₅₀ теор	№ лиганда	R ₄ (см. рис. 4)	E _{free}	IC ₅₀ теор
49	-NH-CH ₂ -COO-	-58.74	20.8	53	-NH-(CH ₂) ₂ -C(O)O-CH ₃	-53.84	46.1
50	-NH-(CH ₂) ₂ -COO-	-55.73	33.9	54	-NH-(CH ₂) ₃ -C(O)O-CH ₃	-52.00	62.1
51	-NH-(CH ₂) ₃ -COO-	-56.81	28.4	55	-NH-(CH ₂) ₄ -C(O)O-CH ₃	-50.70	76.7
52		-56.40	30.4	56	-NH-(CH ₂) ₅ -C(O)O-CH ₃	-47.02	139
				57	-NH-CH ₂ -C(O)O-C ₂ H ₅	-53.05	52.4
				58	-NH-(CH ₂) ₂ -C(O)O-C ₂ H ₅	-52.71	55.3
				59	-NH-(CH ₂) ₃ -C(O)O-C ₂ H ₅	-52.67	55.7

Таблица 7. Предсказание IC_{50} [мкМ] лигандов **60–63** на основе расчетной свободной энергии связывания [кДж/моль] с сайтами 1 (с Ca^{2+} и без Ca^{2+}), 5 и 11.

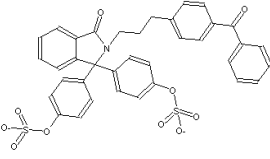
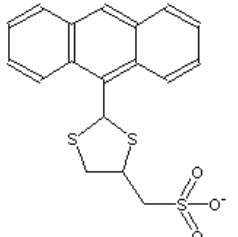
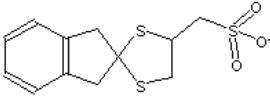
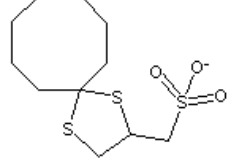
№ лиганда	Структурная формула лиганда	Сайт 1 без Ca^{2+}		Сайт 1 с Ca^{2+}		Сайт 5		Сайт 11	
		E_{free}	IC_{50} теор	E_{free}	IC_{50} теор	E_{free}	IC_{50} теор	E_{free}	IC_{50} теор
60		-49.40	0.33	-	-	-	-	-37.89	3.72
61		-39.19	103	-44.21	220	-31.69	35.4	-35.42	16.9
62		-32.07	5623	-39.40	481	-32.74	20.7	-30.44	358
63		-32.62	4142	-39.19	497	-32.20	27.4	-29.56	614

Таблица 8. Предсказание IC_{50} [мкМ] лигандов **64–67** на основе расчетной свободной энергии связывания [кДж/моль] с сайтами 1 (с Ca^{2+} и без Ca^{2+}), 5 и 11.

№ лиганда	R_4 (см. рис. 4)	Сайт 1 без Ca^{2+}		Сайт 1 с Ca^{2+}		Сайт 5		Сайт 11	
		E_{free}	IC_{50} теор	E_{free}	IC_{50} теор	E_{free}	IC_{50} теор	E_{free}	IC_{50} теор
64	-N(CH ₃)-CH ₂ -C ₆ H ₅	-58.99	0.0015	-50.49	79.3	-34.58	8.04	-39.40	1.48
65	-NH-CH ₂ -C ₆ H ₅	-56.23	0.0072	-53.47	49.0	-36.59	2.87	-43.54	0.11
66	-S-C ₆ H ₅	-59.03	0.0015	-50.16	83.8	-36.93	2.41	-42.29	0.22
67	-N(CH ₂ -C ₆ H ₅) ₂	-61.13	0.0005	-48.78	105	-38.10	1.32	-39.98	1.03

Заключение

После того, как в нашей предыдущей работе был найден сайт, предположительно ответственный за ингибирование рядом низкомолекулярных лигандов связывания C1q и IgG, нашей задачей было получить и отработать метод относительно быстрого предсказания IC_{50} низкомолекулярных веществ, являющихся потенциальными ингибиторами связывания C1q с IgG. Полученные нами оценочные данные IC_{50} могут быть (и отчасти были [15]) использованы для выбора

перспективных низкомолекулярных лигандов для практических исследований *in vitro*.

Поскольку программный пакет Autodock 3 работает с моделью жесткого рецептора, в настоящее время результаты расчета подвергаются уточнению с помощью докинга на полужесткий рецептор, учитывающего подвижность некоторых боковых цепей C1q, при помощи программного пакета Autodock 4.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-04-49795.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Андия-Правдивый, Ю.Э. Исследование механизма ингибирования гемолиза заряженными субстанциями: автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.10 / Андия-Правдивый Юлиан Энрикевич ; МИТХТ. – Москва, 2004. – 24 с.

2. Буреева, С.В. Синтез и исследование влияния низкомолекулярных отрицательно заряженных веществ на классический путь активации комплемента : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.10 / Буреева Светлана Владимировна ; МИТХТ. – Москва, 2005. – 24 с.
3. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q / U. Kishore, R. Ghai, T. J. Greenhough, A. K. Shrive, D. M. Bonifati, M. G. Gadjeva, P. Waters, M. S. Kojouharova, T. Chakraborty, A. Agrawal // *Immunology Lett.* – 2004. – Vol. 95. – P. 113–128.
4. The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties / C. Gaboriaud, J. Juanhuix, A. Gruez, M. Lacroix, C. Darnault, D. Pignol, D. Veger, J. C. Fontecilla-Camps, G. J. Arlaud // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 47. – P. 46974–46982.
5. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility / U. Kishore, C. Gaboriaud, P. Waters, A. K. Shrive, T. J. Greenhough, K. B. M. Reid, R. B. Sim, G. J. Arlaud // *Trends in Immunology.* – 2004. – Vol. 25, №10. – P. 551–561.
6. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рём ; М. : Мир, 2000. – 469 с., ил. – Библиогр.: с. 286–292. – Перевод изд.: Taschenatlas der Biochemie / Jan Koolman and Klaus-Heinrich Röhm. New York. – 7000 экз. – ISBN 5–03–003304–1 (в пер.).
7. Joseph-McCarthy, D. Computational approaches to structure-based ligand design / D. Joseph-McCarthy // *Pharmacology & Therapeutics.* – 1999. – Vol. 84. – P. 179–191.
8. Espinoza-Fonseca, L.M. Targeting MDM2 by the small molecule RITA: towards the development of new multi-target drugs against cancer / L. M. Espinoza-Fonseca // *Theor. Biol. and Medical Modelling.* – 2005. – Vol. 2. – P. 38.
9. Jenwitheesuk, E. Improved prediction of HIV-1 protease-inhibitor binding energies by molecular dynamics simulations / E. Jenwitheesuk, R. Samudrala // *BMC Structural Biology.* – 2003. – Vol. 3. – P. 2.
10. Complement C1q-target proteins recognition is inhibited by electric moment effectors / L. T. Roumenina, S. V. Bureeva, A. Kantardjiev, D. Karlinsky, J. E. Andia-Pravdivy, R. Sim, A. P. Kaplun, M. E. Popov, U. Kishore, B. P. Atanasov // *J. Mol. Recognit.* – 2007. – Vol. 20. – P. 1–11.
11. Hetenyi, C. Efficient docking of peptides without prior knowledge of the binding site / C. Hetenyi, D. van der Spoel // *J. Protein Sci.* – 2002. – Vol. 11. – P. 1729–1737.
12. Goodsell, D.S. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing / D. S. Goodsell, A. J. Olson // *Proteins: Structure, Function, and Genetics.* – 1990. – Vol. 8. – P. 195–202.
13. Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of Autodock / G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. Huey, A. J. Olson // *J. Computer-Aided Mol. Design.* – 1996. – 2.4. 10. – P. 293–304.
14. Automated docking using Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function / G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A.J. Olson // *J. Comp. Chem.* – 1998. – Vol. 19. – P. 1639–1662.
15. Лесовая, Е.А. Терапия раковых заболеваний при помощи направленной активации комплемента / Е. А. Лесовая, А. П. Каплун // *Росс. биотерапевт. журн.* – 2008. – №3. – С. 13–19.