

Рациональный дизайн ингибиторов: можно ли обойтись без докинга?

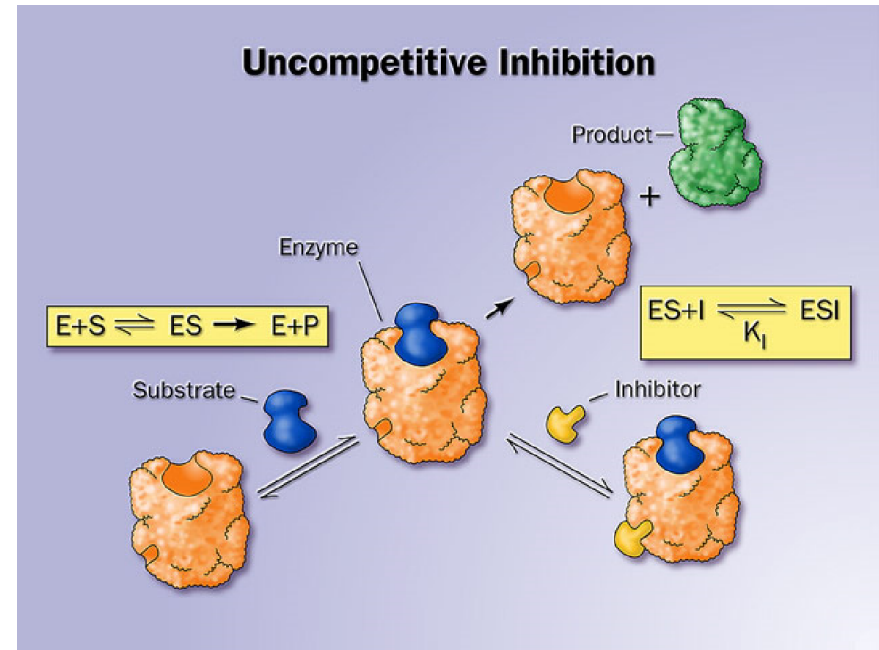
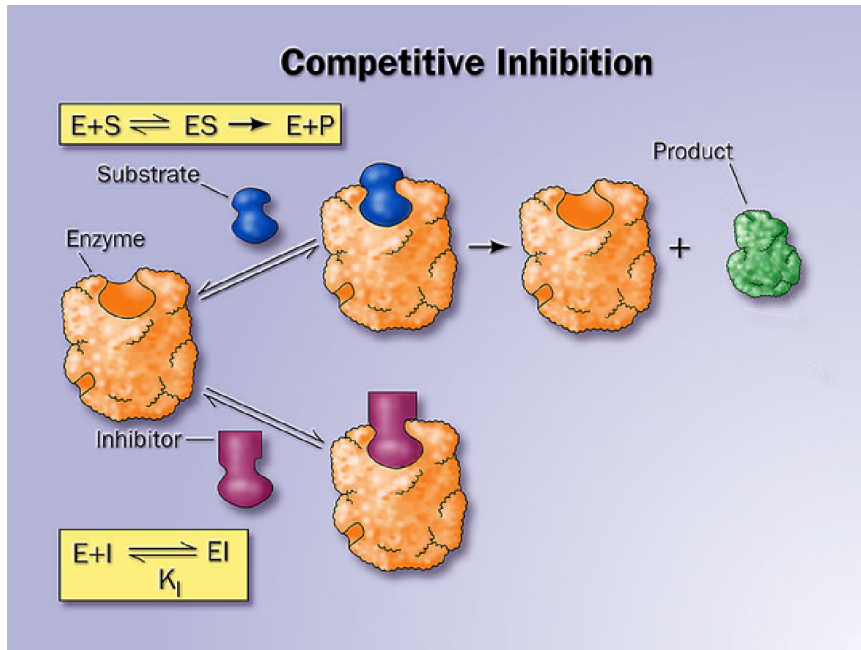
Хренова М.Г.^{1,2}, Савицкий А.П., Немухин А.В.

¹Химический факультет МГУ

²Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН

³Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН

Ингибитор (лат. *inhibere* — задерживать) — вещество, замедляющее или предотвращающее течение какой-либо химической реакции.



Способы разработки лекарств

- Классическая фармакология (phenotype-based drug design):
 - основана на экспериментальной проверке лекарственных препаратов на живых моделях;
 - не требует знания механизма действия активного вещества;
 - требует выбора критериев оценки работоспособности соединения (выбор маркеров);
- Разработка лекарств, основанная на воздействии на выбранную макромолекулу-мишень (target-based drug design):
 - требуется знание мишени и механизма ее работы;
 - первичная проверка проводится *in vitro* на очищенной молекуле-мишени и только потом на более сложных модельных системах (клетки, животные)

Молекулярная медицина

- нацелена на влияние на молекулярные и клеточных события;
- предполагает подход разработки лекарств, основанный на знании мишени;
- применение методов молекулярного моделирования при наличии трехмерной структуры макромолекулы-мишени.

Молекулярная медицина

- нацелена на влияние на молекулярные и клеточных события, а не на пациенте в целом
- предполагает подход разработки лекарств, основанный на знании мишени

НО, до сих пор вновь разработанные лекарства в основном получают классическим способом.

Почему?

Почему?

- Многие механизмы работы ферментов не до конца изучены;
- Изучение методами комбинаторной химии затратны и требуют перебора огромного числа соединений;

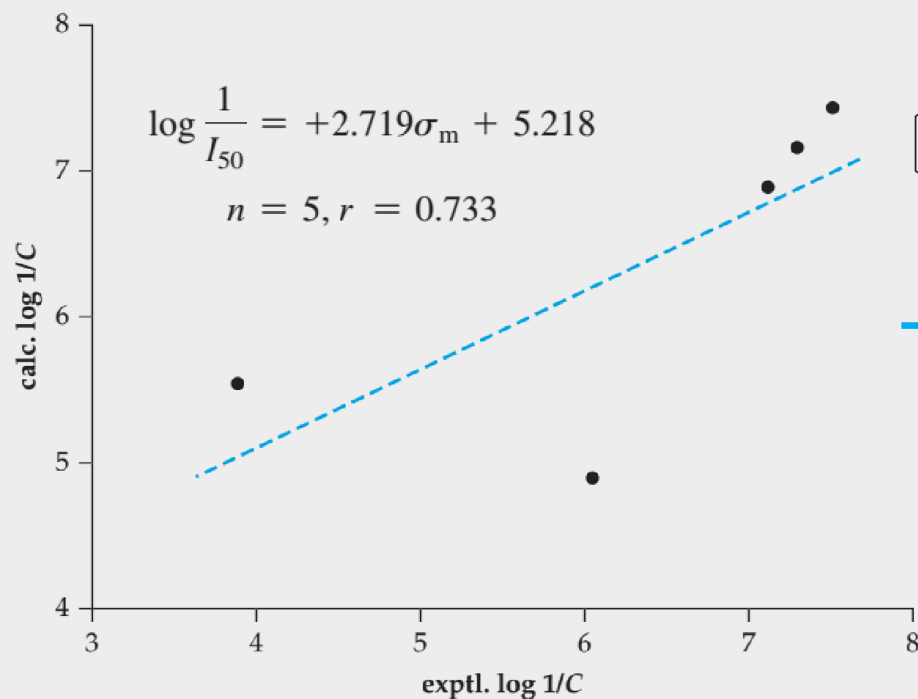
The screenshot shows the homepage of the American Chemical Society (ACS) division CAS. At the top, there is a search bar with the number '7.5' and a 'GO' button, and a 'Log In To: SciFinder' dropdown menu. Below the navigation bar, there are several promotional banners. The main banner on the left states 'CAS is the WORLD'S AUTHORITY for CHEMICAL INFORMATION' and describes its role in collecting and organizing chemical information. To the right, there is a banner for 'STN' (Science and Technology Network) with the text 'STN - A Reliable Partner in Pharmacovigilance'. Below these, there are three smaller banners: 'Scientists' featuring a woman in a lab, 'Patent Experts' featuring hands on a keyboard, and a banner for 'ORGANIC AND INORGANIC SUBSTANCES TO DATE' with the number '87,598,778' circled in red. The bottom of the page features a 'Latest News' section with a headline about 'STN® AraVis™ Version 2.1, Improves Operating System Compatibility and Performance'.

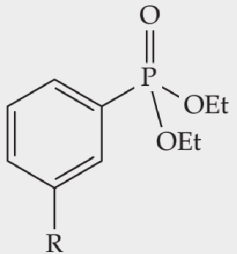
Почему?

- Многие механизмы работы ферментов не до конца изучены;
- Изучение методами комбинаторной химии затратны и требуют перебора огромного числа соединений;
- Применяемые методы молекулярного моделирования не достаточно точные и достоверные;
- Модельные системы зачастую неадекватно имитируют реальные процессы.

Роль моделирования в разработке лекарств

- Поиск количественных соотношений структура–свойство (QSAR, Quantitative structure–activity relationship) – работа с обучающей выборкой и затем прогнозы



Structure	Entry	R-Group	σ_m	E_s
 12.14	1	SF ₅	+0.61	-1.67
	2	OMe	+0.12	+0.69
	3	<i>t</i> -Bu	-0.12	-1.54
	4	NO ₂	+0.71	-1.28
	5	⁺ NMe ₃	+0.81	-1.60

$$\log \frac{1}{I_{50}} = -1.102E_s + 1.614\sigma_m + 4.498$$

$$n = 5, r = 0.994$$

FIGURE 12.2 Calculated versus experimental log 1/C for Equation 12.20

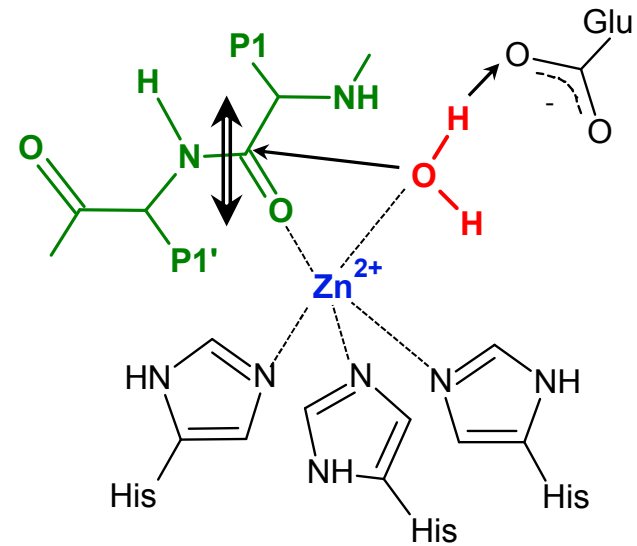
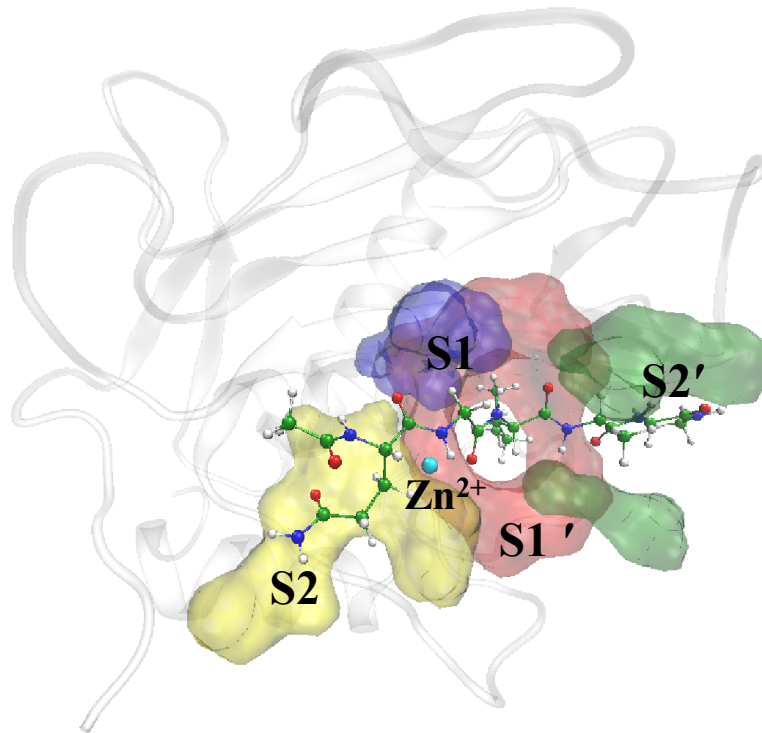
Роль моделирования в разработке лекарств

- Метод молекулярного докинга, в том числе ковалентный докинг – перебор структур рецептор-лиганд и ранжирование их по энергии связывания

Ограничения связаны со способами расчета энергии:

- Классические силовые поля не учитывают перераспределение электронной плотности при связывании ингибитора;
- Применение КМ подходов значительно увеличивает вычислительные затраты и разные методы дают различающиеся результаты;
- Ограничения на размеры конформационно подвижных молекул;
- Сложности достоверного моделирования параметров необратимых ингибиторов и ингибиторов, образующихся *in situ*.

Матриксные металлопротеиназы

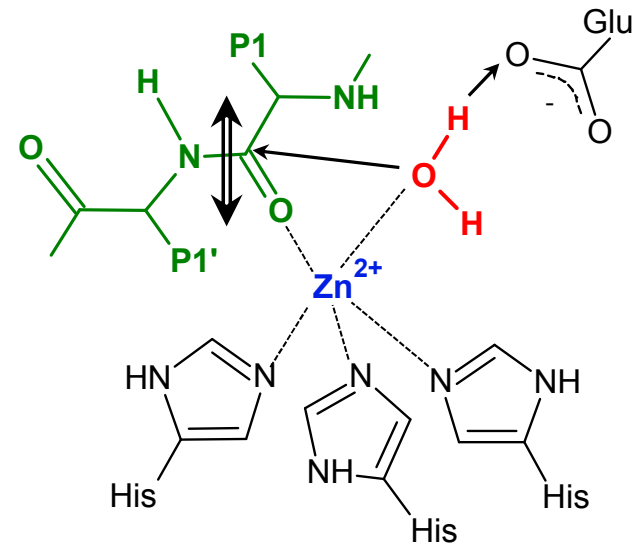
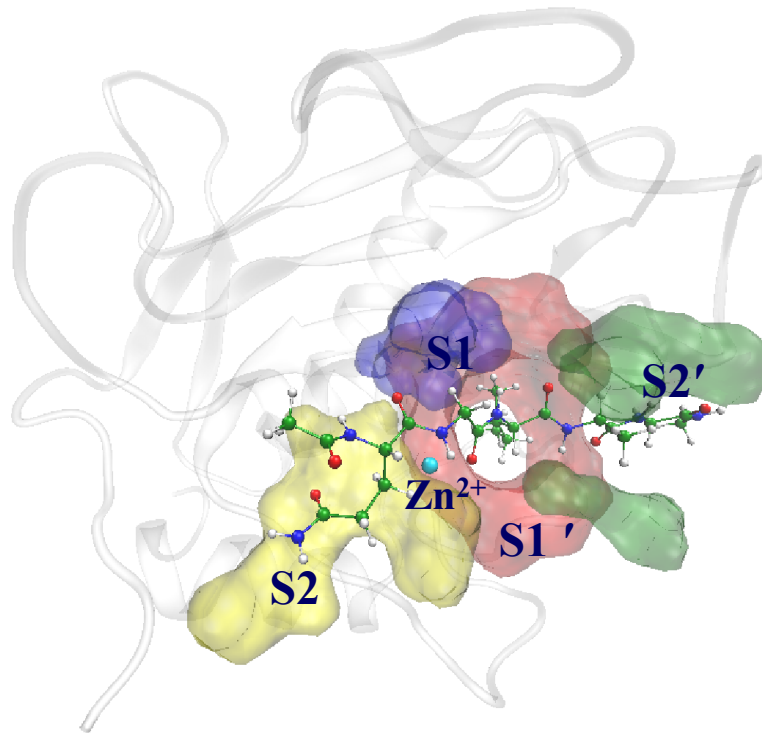


Особенности:

Много представителей со сходной структурой активного сайта, сложно добиться специфичности;

Находятся во внеклеточном матриксе, поэтому нет ограничений, связанных с необходимостью преодолевать мембрану клетки, что расширяет круг потенциальных ингибиторов.

Матриксные металлопротеиназы



Знание механизма ферментативной реакции необходимо для рационального дизайна ингибиторов

Расчетная часть

Модельная система: каталитический домен MMP-2 + олигопептидный субстрат Ace-Gln-Gly~Phe-Ala-Gly-Nme + сольватная оболочка

Начальные координаты: PDB ID: 1Q1B –каталитический домен MMP-2

Подготовка структуры:

1. Монтирование олигопептидного субстрата в активный центр и сайты связывания фермента
2. Сольватация
3. Минимизация энергии системы при фиксированных координатах активного центра
4. МД расчет (300 пс) с зафиксированным белком и субстратом
5. Минимизация энергии системы
6. Усечение сольватной оболочки

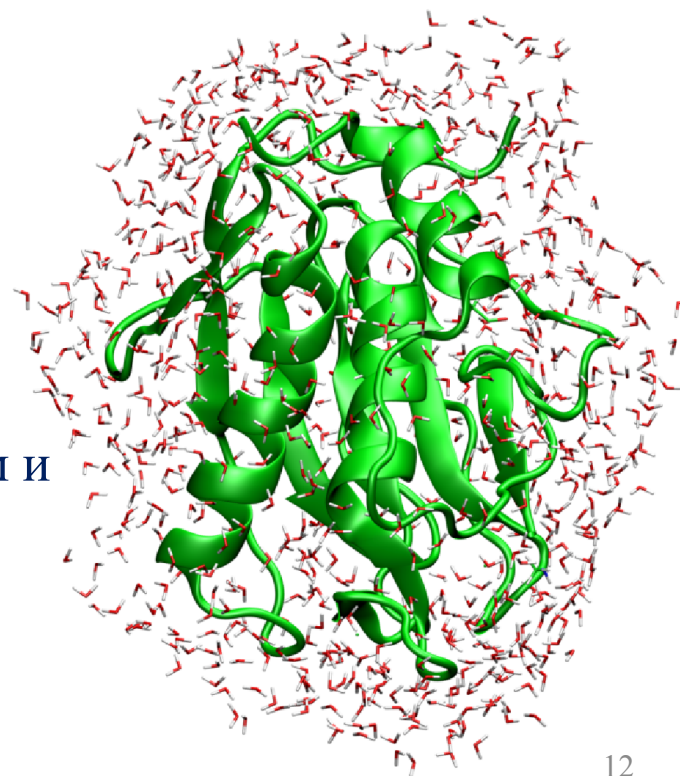
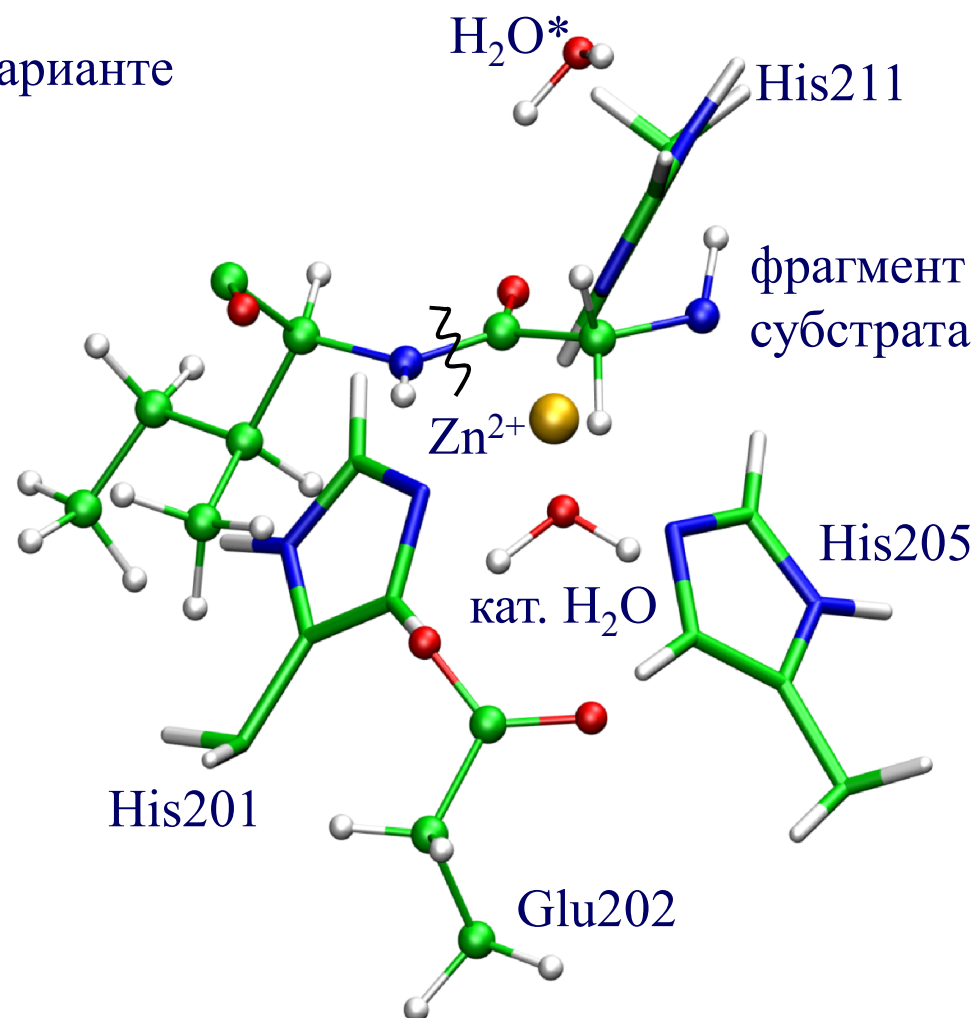


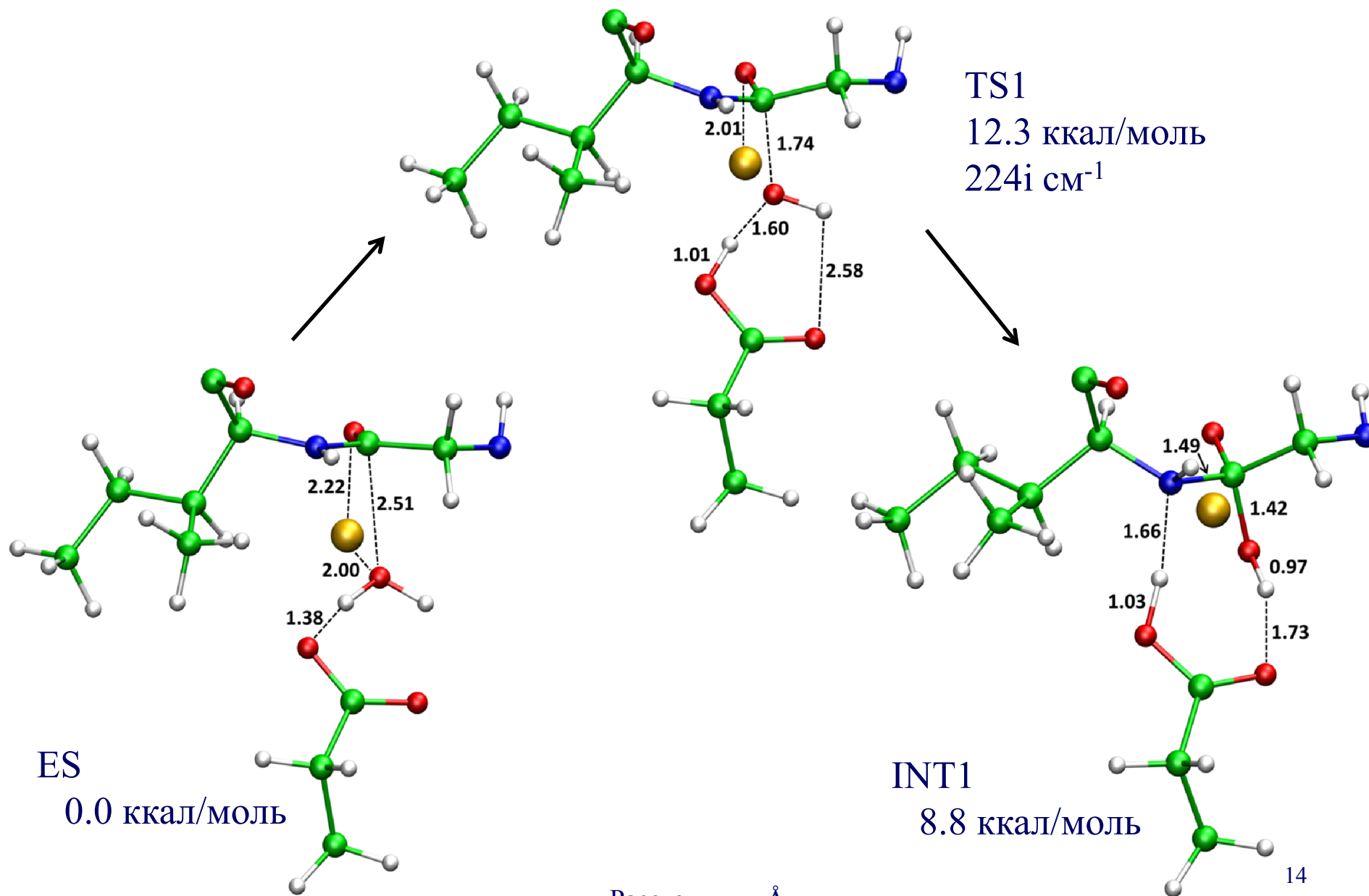
Схема расчета

Комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики в варианте электронного внедрения (КМ/ММ):

- КМ подсистема (88 атомов):
DFT/BV1K/6-31G**
- ММ подсистема (5055 атомов):
AMBER

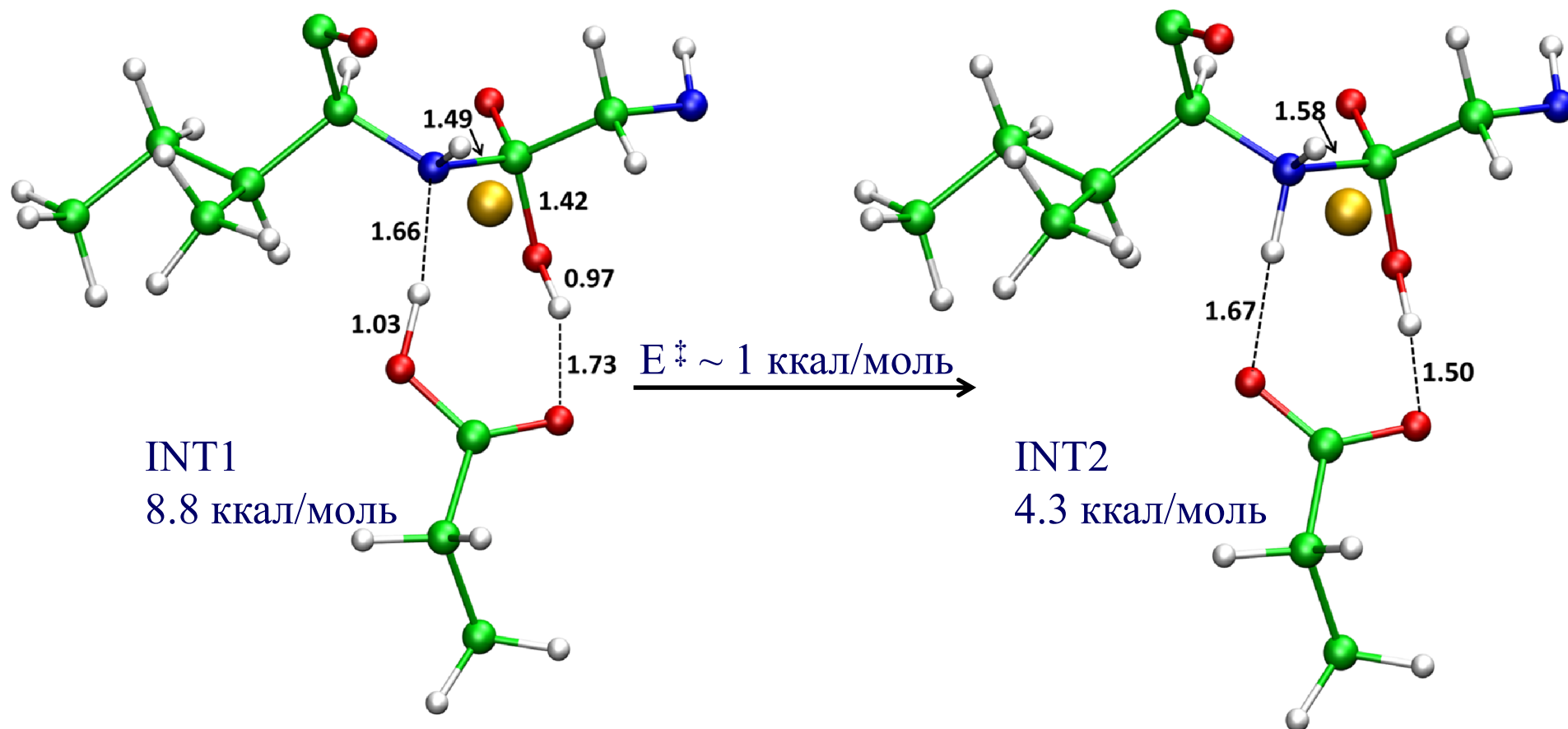


I стадия – нуклеофильная атака



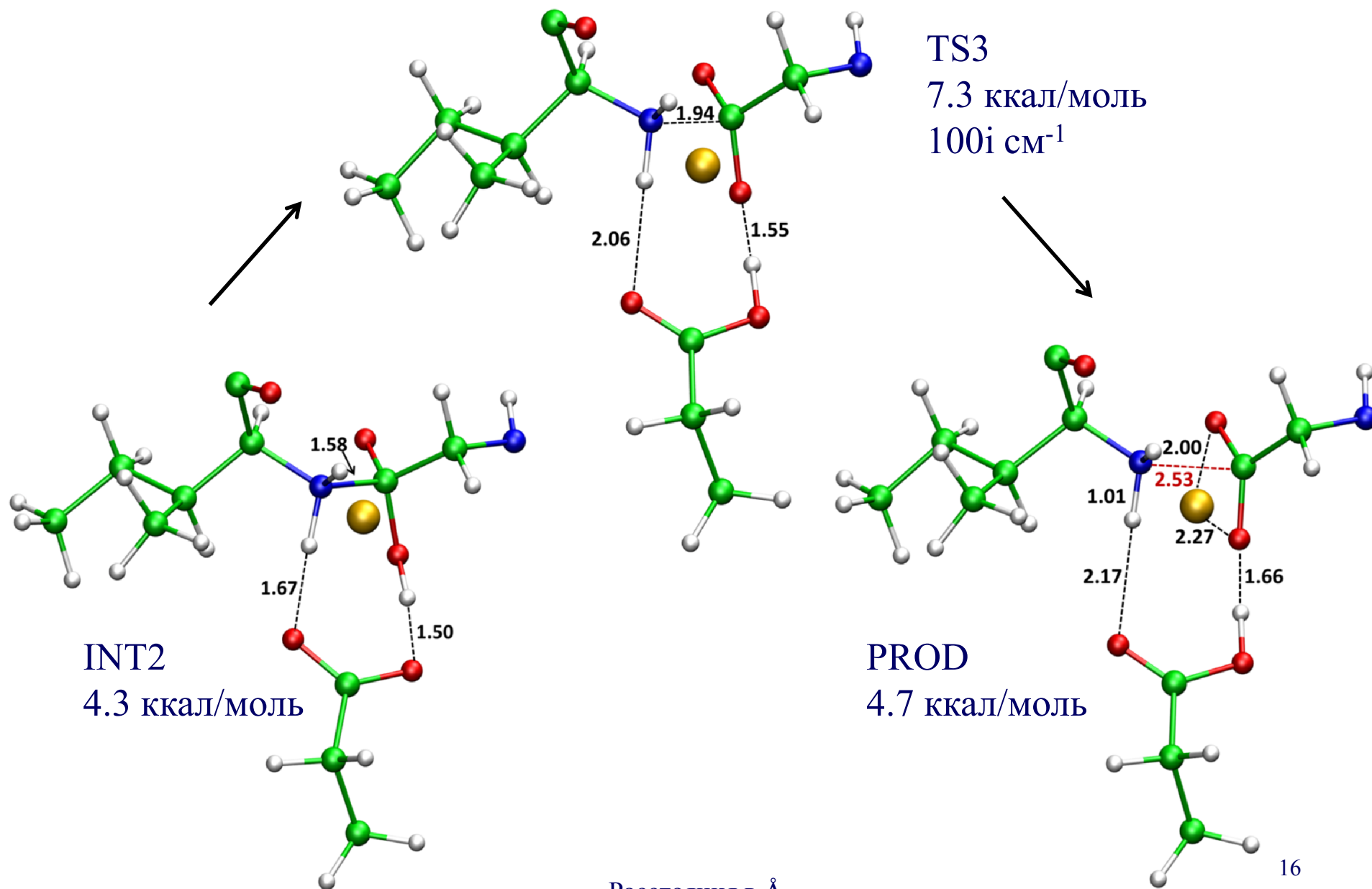
Расстояния в Å

II стадия – перенос протона



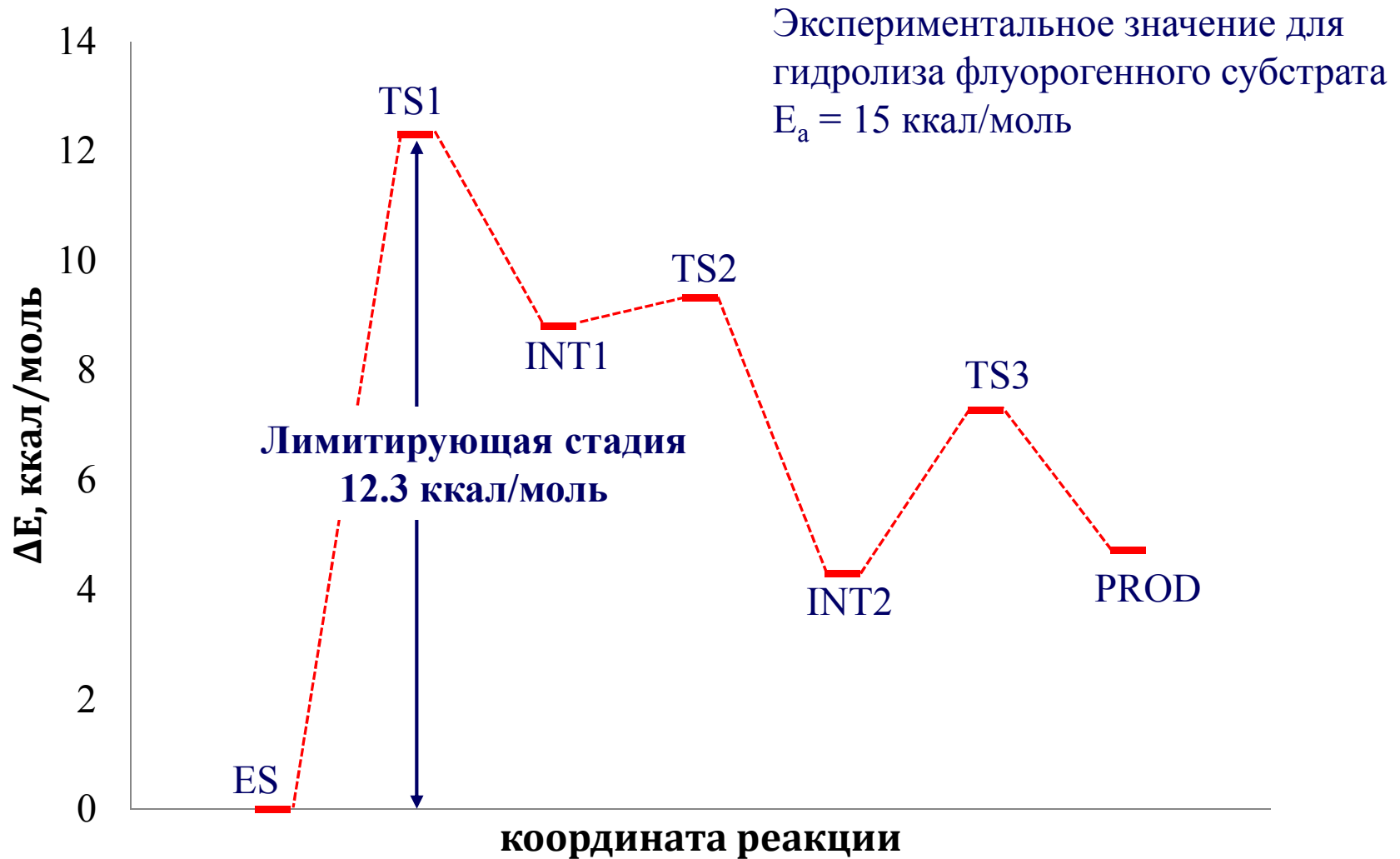
Расстояния в Å

III стадия – разрыв пептидной связи

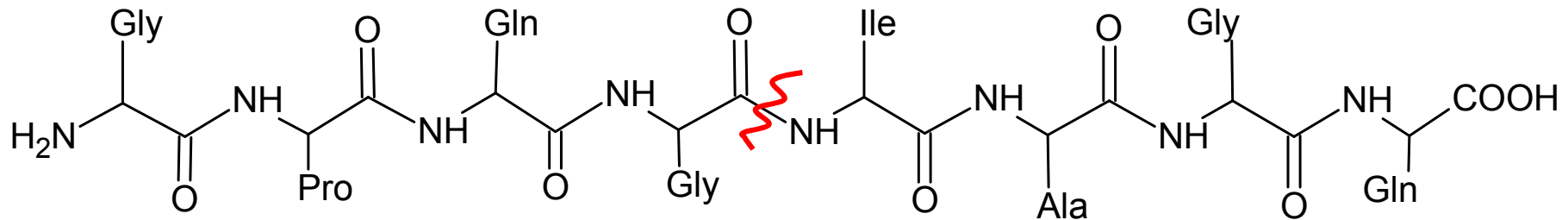


Расстояния в Å

Профиль реакции на поверхности потенциальной энергии



Создание ингибиторов путем модификации исходного субстрата



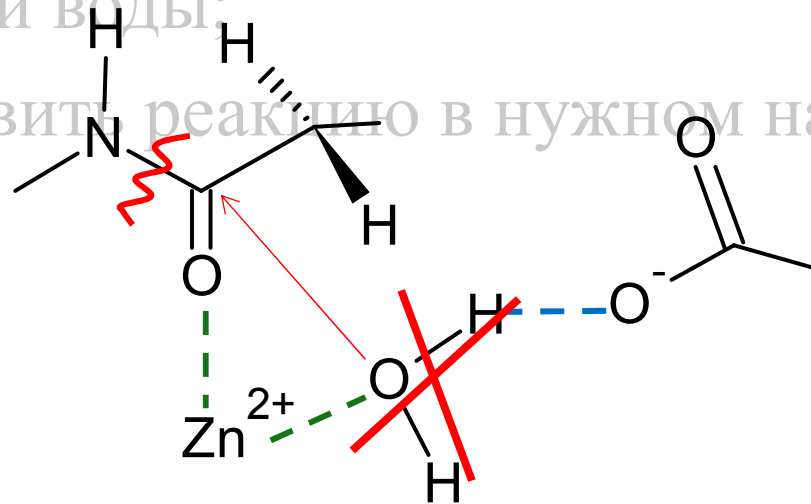
Небольшие модификации натурального субстрата не должны привести к заметным изменениям в субстратной специфичности

Пути создания ингибиторов

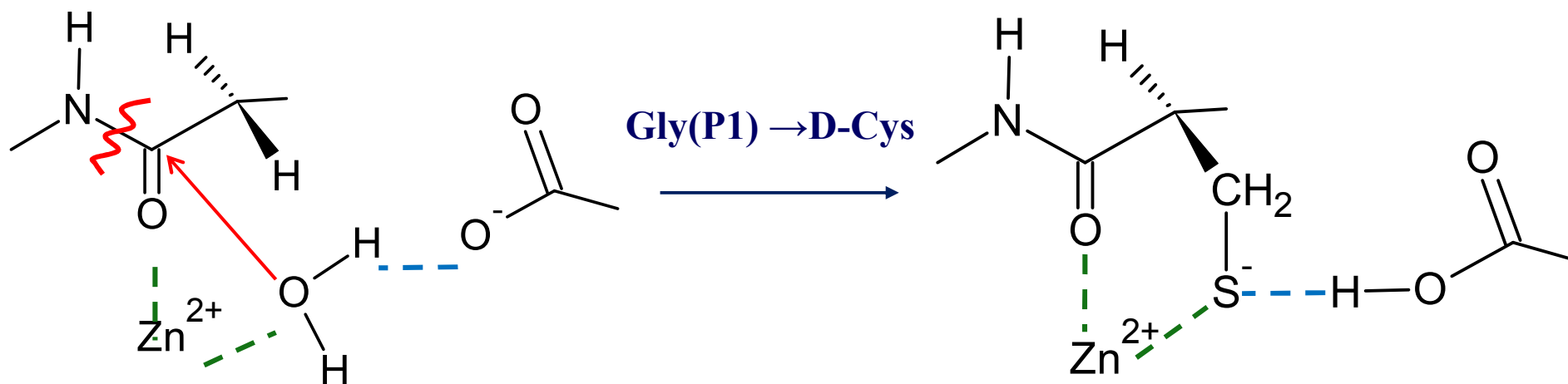
- Элиминировать каталитическую молекулу воды;
- Ввести функциональную группу не реагирующую с молекулой воды;
- Перенаправить реакцию в нужном направлении.

Пути создания ингибиторов

- Элиминировать каталитическую молекулу воды;
- Ввести функциональную группу не реагирующую с молекулой воды;
- Перенаправить реакцию в нужном направлении.

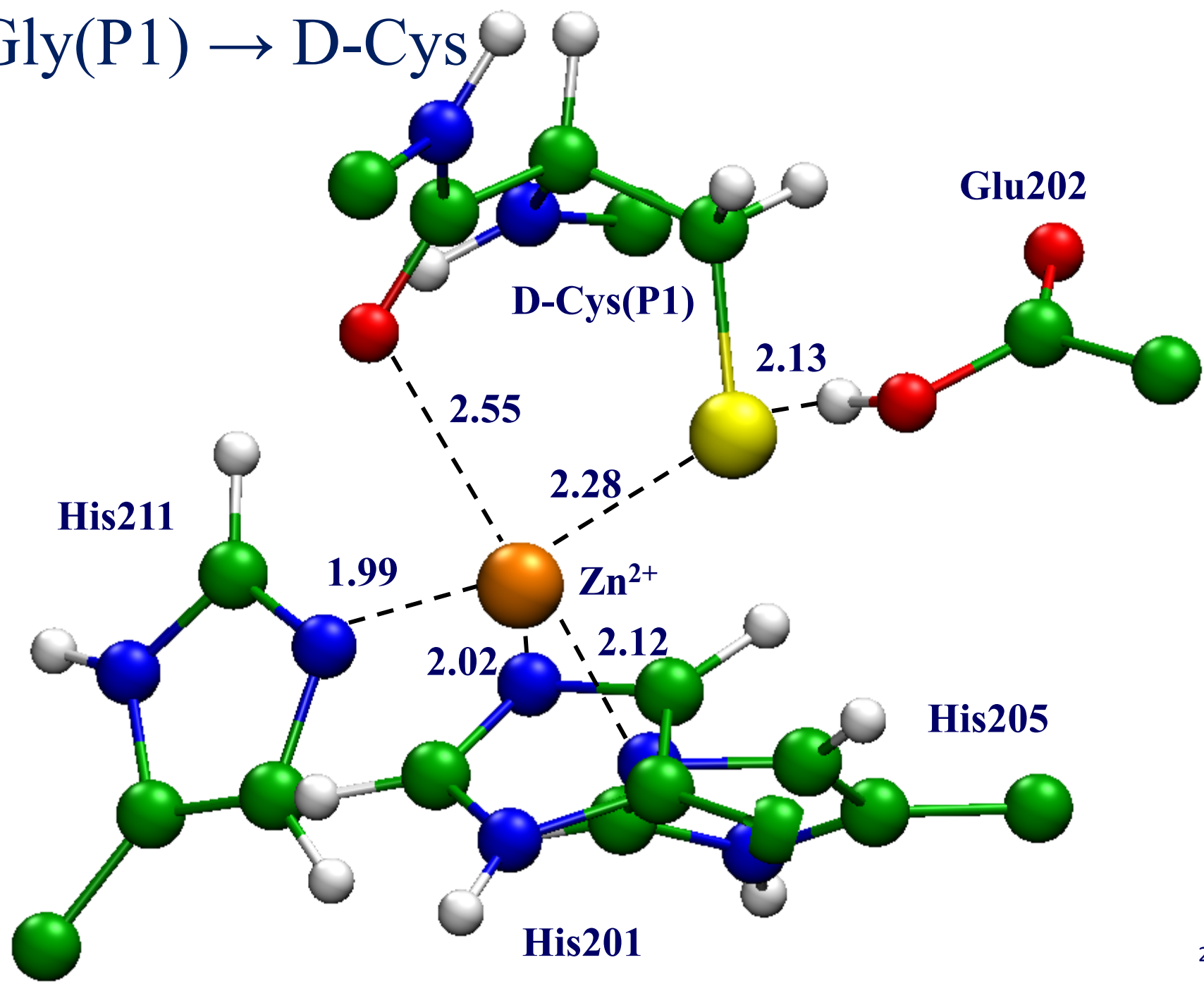


Замена Gly(P1) на D-аминокислоту



- В результате связывания происходит спонтанное депротонирование SH группы и перенос протона на каталитическую глутаминовую кислоту;
- Олигопептиды, содержащие D-аминокислоты более устойчивы к действию других протеаз.

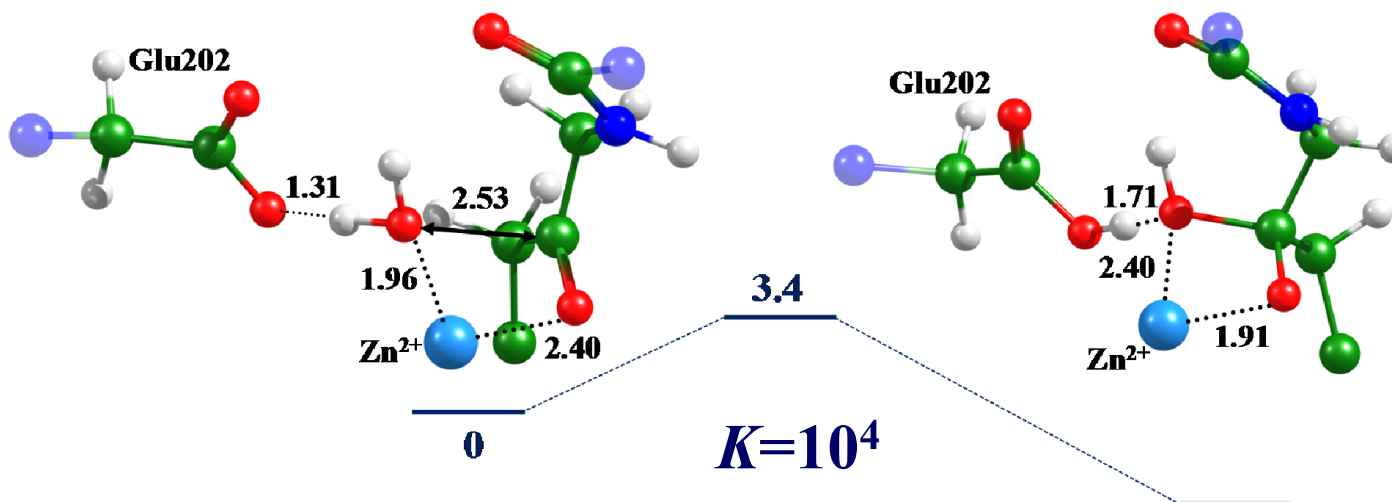
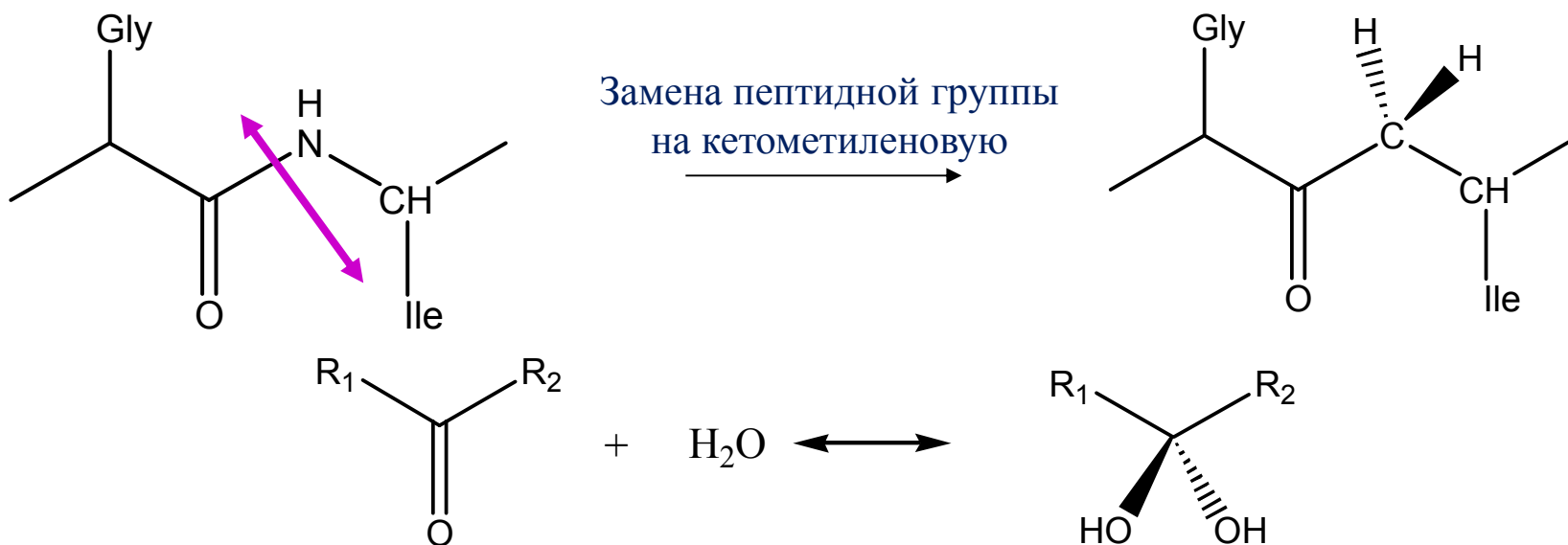
Gly(P1) \rightarrow D-Cys



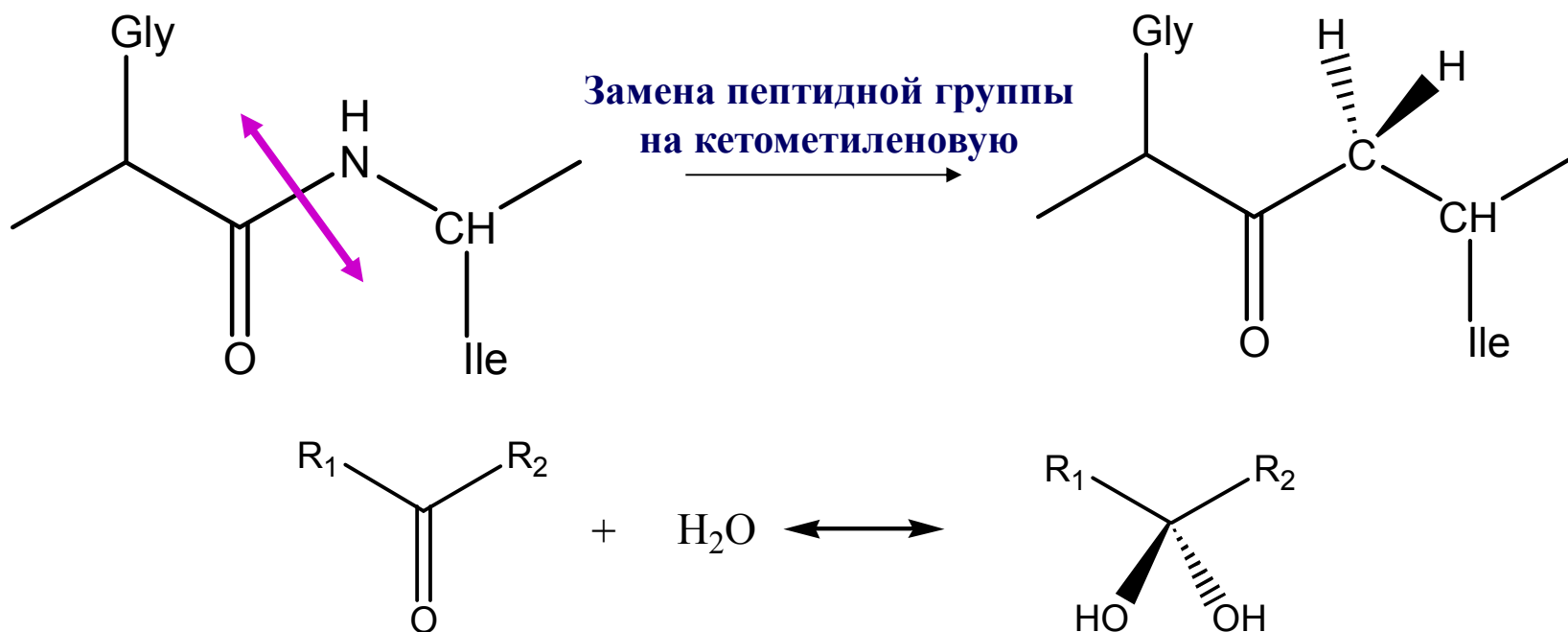
Пути создания ингибиторов

- Элиминировать каталитическую молекулу воды;
- Ввести функциональную группу не реагирующую с молекулой воды;
- **Перенаправить реакцию в нужном направлении.**

Формирование ингибитора MMP *in situ*



Формирование ингибитора MMP *in situ*



- Константа связывания кетометиленового ингибитора в 2 раза меньше, чем для нативного субстрата (оценка из равновесных геометрических конфигураций, полученных методом КМ/ММ в программе AutoDock);
- Кетонная группа инертна в водном растворе (константа гидратации ацетона равна 10^{-3});
- Активный сайт MMP-2 смещает равновесие кетон \leftrightarrow кеталь с преобладанием кеталя $K=10^4$;
- Скорость гидратации кетометиленового ингибитора в $\sim 10^6$ раз больше, чем скорость гидролиза субстрата.

Ингибитор с мотивом цинкового пальца Cys_2His_2 *Gly~Ile* \rightarrow (D)*Cys-Cys*

Молекулярная динамика с потенциалами КМ/ММ

КМ часть:

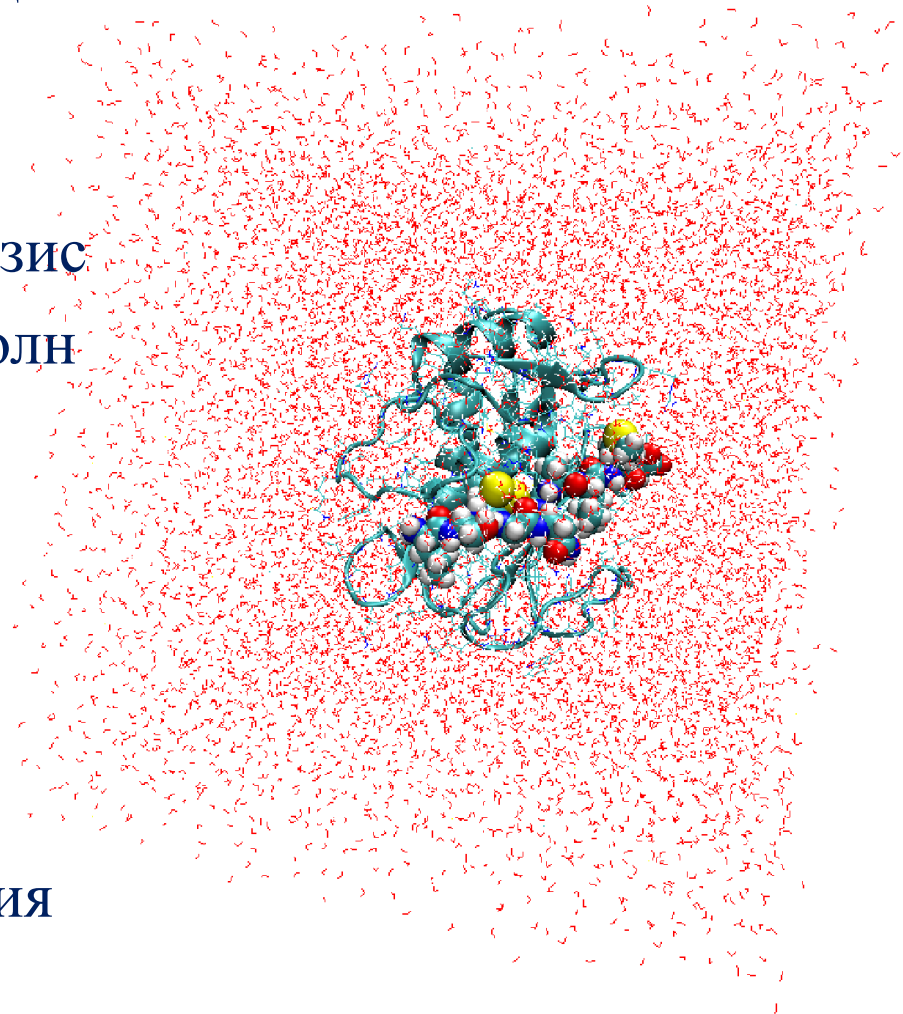
DFT/BLYP, комбинированный базис
Гауссовых функций и плоских волн
TZV2P-MOLOPT-GTH

ММ часть:

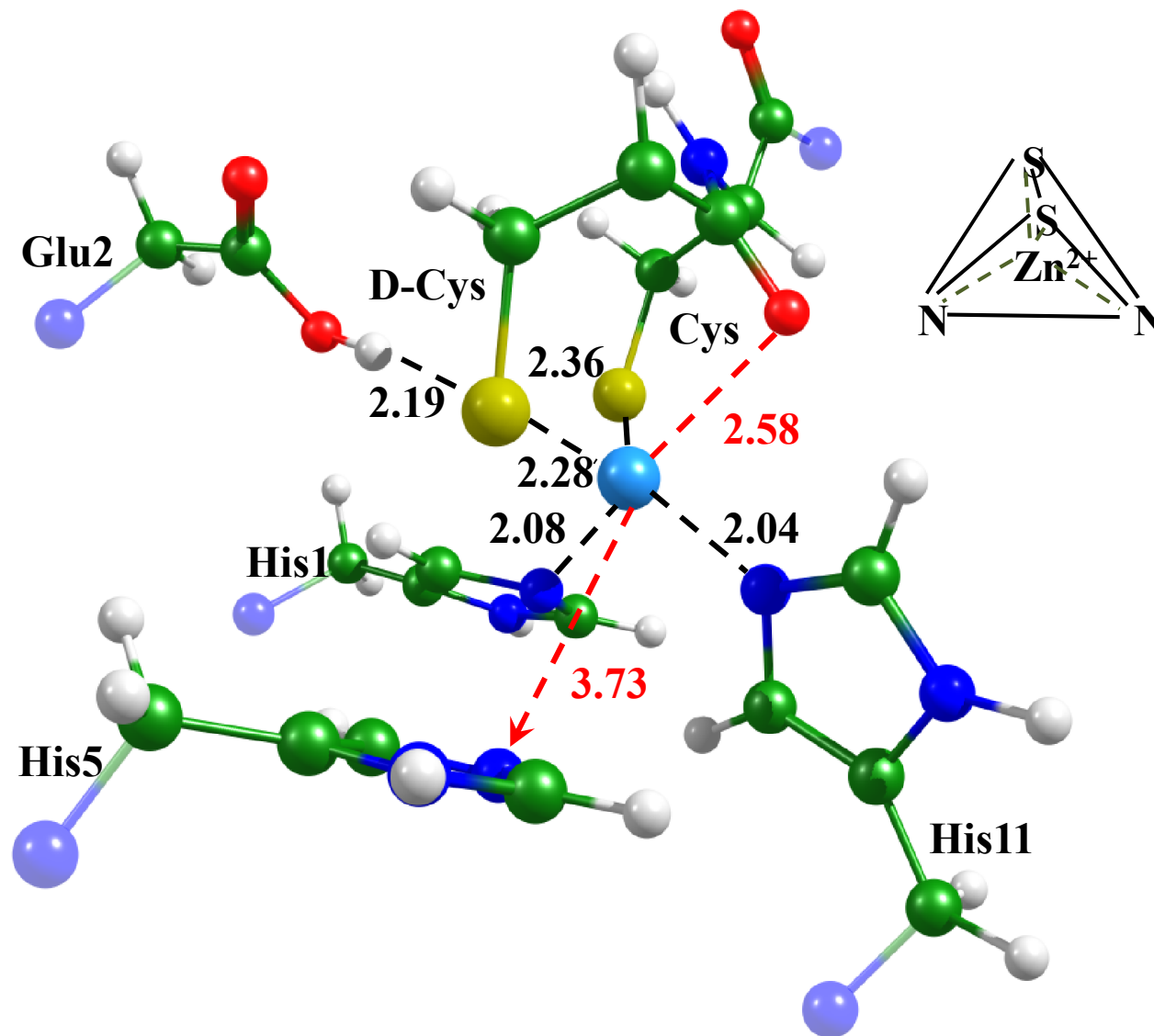
силовое поле CHARMM

МД:

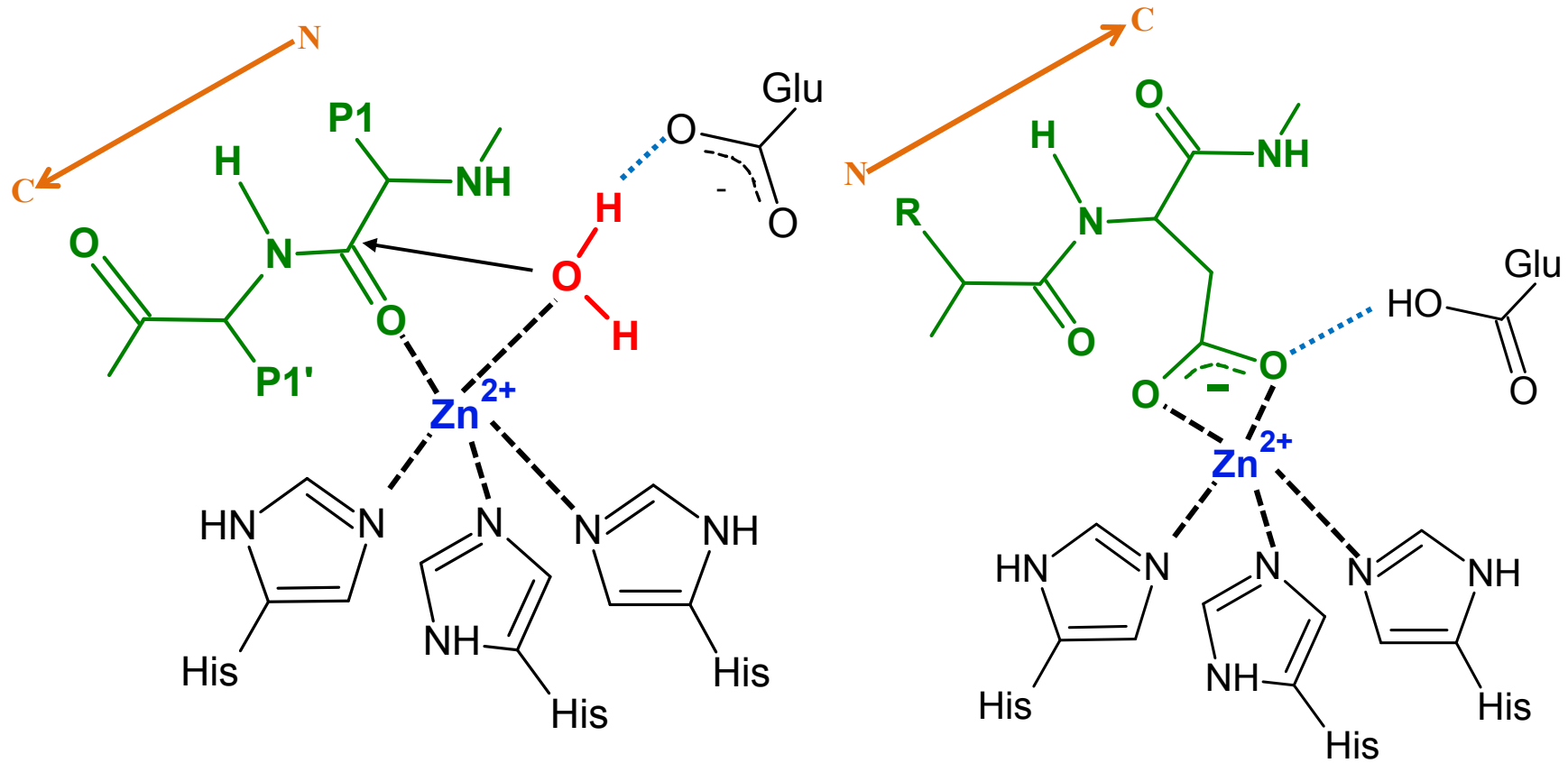
NVT ансамбль, термостат CSVR,
периодические граничные условия
 $68 \times 73 \times 69 \text{ \AA}^3$, шаг 0.5 фс



Ингибитор с мотивом цинкового пальца Cys_2His_2 *Gly~Ile* \rightarrow (D)Cys-Cys



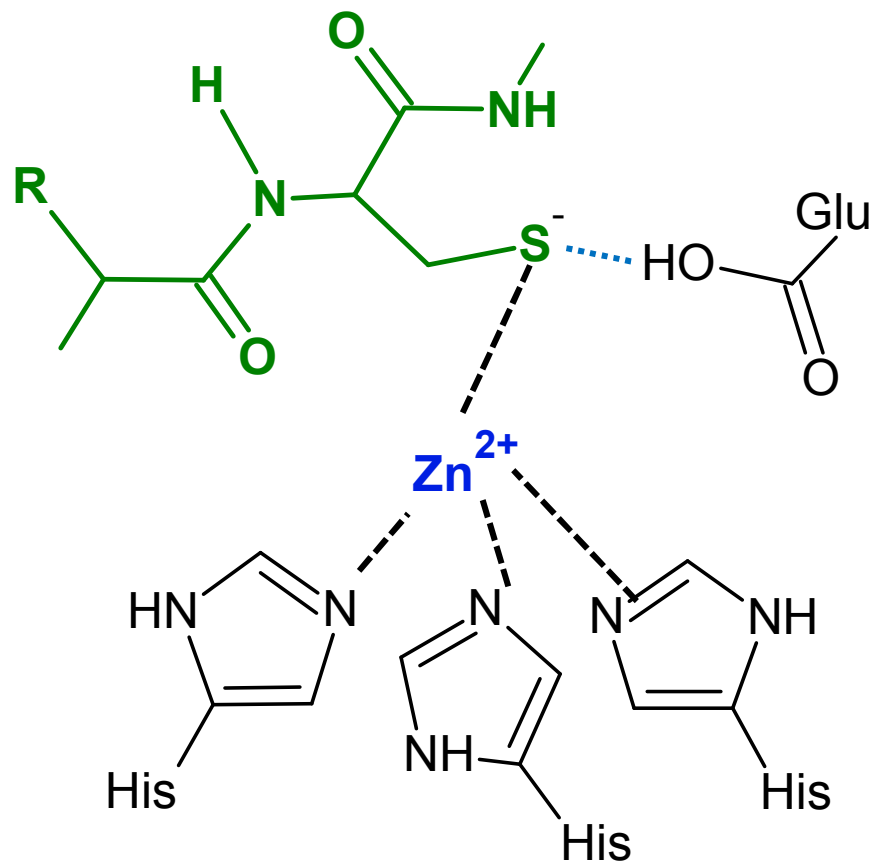
Ингибиторы ММР на основе APP-IP



Субстрат

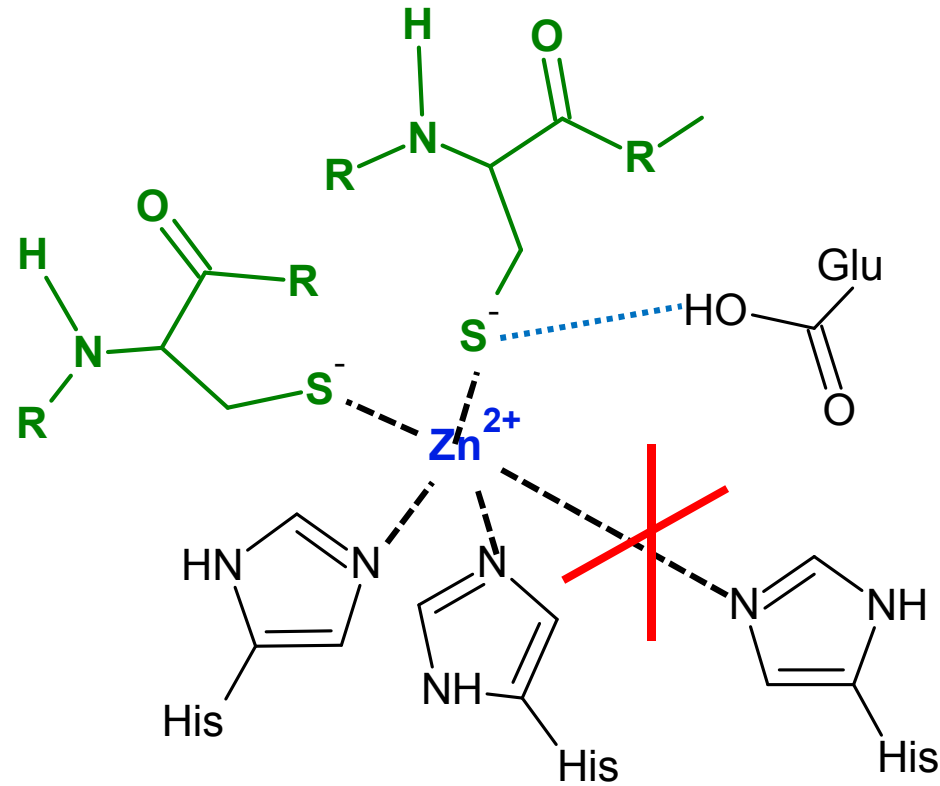
APP-IP

Ингибиторы ММР на основе APP-IP



APP-IP Asp6Cys

Ингибиторы ММР на основе APP-IP



APP-IP Tyr3Cys-Asp6Cys

Выводы

- На примере матричной металлопротеиназы ММР-2 показаны возможности метода КМ/ММ и КМ/ММ МД для создания ингибиторов;
- Предложены новые ингибиторы на основе натурального субстрата;
- Предложены способы модификации известного олигопептидного ингибитора APP-IP

Спасибо за внимание!

Ингибитор (лат. *inhibere* — задерживать) — вещество, замедляющее или предотвращающее течение какой-либо химической реакции.

