

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ, СИНТЕЗ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ АНТАГОНИСТОВ GPIIb/IIIa-РЕЦЕПТОРОВ ТРОМБОЦИТОВ

А.А. Алексеев¹, М.И. Брылев¹, В.Л. Королев¹, доктор химических наук, Д.С. Лоторев¹, кандидат химических наук, А.Ю. Лизунов², Е.А. Батуев³, Л.А. Павлова¹, кандидат фармацевтических наук, доцент

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ, ²Московский физико-технический институт (государственный университет), ³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

E-mail: alexeevalexei1991@mail.ru

С применением программы «Алгокомб» выполнено моделирование молекул пептидов – антагонистов GPIIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов. Серия смоделированных соединений синтезирована по стратегии FastMoc 0.25. Структура полученных соединений подтверждена методами хромато-масс-, ЯМР ¹H- и двумерной ЯМР ¹H/¹H (COSY, NOESY)-спектроскопии. Оценка специфичности действия синтезированных соединений выполнена *in vitro* на крови здоровых доноров и показано дозозависимое снижение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, GPIIb/IIIa-рецепторы тромбоцитов, пептиды, синтез, агрегация тромбоцитов, ингибирование

MOLECULAR MODELING, SYNTHESIS AND EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW GLYCOPROTEIN IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) RECEPTOR ANTAGONISTS

A.A. Alekseev¹, M.I. Brylev¹, V.L. Korolev¹, D.S. Lotorev¹, A.Yu. Lizunov², E.A. Batuev³, L.A. Pavlova¹

¹Sechenov First Moscow State Medical University, ²Moscow Institute of Physics and Technology (State University), ³Lomonosov Moscow State University

We applied software «Algokomb» to perform mathematical modeling of polypeptide molecules of glycoprotein IIb/IIIa (gpIIb/IIIa) receptor antagonists. The modeled compounds have been synthesized accordingly to the protocol of strategy FastMoc 0.25. The structure of the compounds has been confirmed by LCMS, ¹H NMR and ¹H/¹H (COSY, NOESY) NMR methods. The evaluation of the specificity of the synthesized compounds has been made *in vitro* and has shown dose-dependent reduction of ADP-induced platelet aggregation.

Key words: molecular modeling, platelet GPIIb/IIIa receptors, peptides, synthesis, platelet aggregation, inhibition

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смерти населения в России. Наиболее часто в основе указанных заболеваний лежит атеротромбоз – процесс патологического тромбообразования, ведущий к инфаркту миокарда и инсульту.

В образовании тромба значимую роль играют гликопротеиновые рецепторы тромбоцитов. Именно связывание фибриногена с активированными GPIIb/IIIa-рецепторами тромбоцитов является конечным звеном в агрегации последних. Рецепторный комплекс гликопротеин IIb/IIIa (интегрин α_{IIb}/β_3) относится к семейству интегриновых рецепторов и является наиболее многочисленным среди всех рецепторов тромбоцитов [3].

Гетеродимер IIb/IIIa представляет собой комплекс 2 субъединиц. Субъединица GPIIb состоит из ковалентно связанных дисульфидной связью тяжелой (116 кД) и легкой (22 кД) цепей. Тяжелая цепь находится на поверхности тромбоцита, в то время как легкая является трансмембранным белком. Субъединица GPIIa представляет собой гликированный полипептид с массой 92 кД, который состоит из 3 доменов –

внеклеточного на N-конце, трансмембранного и цитоплазматического доменов на C-конце [7].

Ингибиторы IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов являются наиболее мощными антиагрегантными препаратами, используемыми в кардиологии, так как механизм их действия заключается в блокировании конечного этапа агрегации тромбоцитов – процесса образования мостиков из молекул фибриногена между соседними активированными тромбоцитами [5, 10].

Существенный интерес среди антиагрегантов представляют антагонисты GPIIb/IIIa-рецепторов, имеющие пептидную природу [1, 2].

В настоящее время начальным этапом поиска фармакологически активных веществ, как правило, является использование доэкспериментальных методов *in silico*, предвещающих экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo*.

В этой связи целью 1-го этапа в нашей работе стало проведение виртуального скрининга пептидов, потенциально обладающих антиагрегантными свойствами. Как следствие, задачами следующих этапов исследования были: синтез ряда потенциальных инги-

биторов агрегации тромбоцитов из числа смоделированных пептидов и оценка специфичности действия синтезированных соединений *in vitro* на крови здоровых доноров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Моделирование взаимодействия белка интегрин $\alpha_{\text{IIb}}/\beta_3$ с пептидными лигандами проводили с помощью программы «Алгокомб» [3, 8], модифицированной для учета внутренних нековалентных взаимодействий лиганда и явного учета молекул воды в сайте связывания. В отличие от других широко известных программ докинга [6] (например, «GOLD», «AutoDock», «FlexX», «Surflex», «LigandFit», «Glide»), программа «Алгокомб» при оценке позиции лиганда учитывает локальное пространственное сходство активного сайта белка-мишени и белковых комплексов, представленных в базе данных PDB. Благодаря этому удается добиться высокой эффективности в решении задач докинга и виртуального скрининга. Приведены подробное описание алгоритма работы программы «Алгокомб» и результаты тестирования этой программы [8].

Серия наиболее эффективных, согласно прогнозу, соединений была нами синтезирована на пептидном синтезаторе Applied Biosystems 433A с использованием стратегии FastMoc 0.25.

Очистку пептидов осуществляли с помощью высокоэффективного препаративного жидкостного хроматографа PuriFlash 450 (InterChim). Строение синтезированных соединений подтверждено методами хромато-масс-, ЯМР ^1H - (в том числе с привлечением 2-мерных методик $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY, показывающих ближе взаимодействие атомов, и $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров NOESY, основанных на дальних взаимодействиях). Спектры ЯМР ^1H регистрировали на приборе «Brucker Avance 600 mhz», химические сдвиги измеряли относительно сигнала растворителя (ДМСО- d_6 , δ_{H} 2.5 м.д.). Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Waters MSD SQD – ESI с УФ- и масс-спектрометрическими детекторами: длина волны 220 нм, температура пробоотборника 15°C, температура термостата колонок 40°C. MSD-параметры: температура источника 130°C, температура газа 400°C, напряжение на капилляре 3kV; колонка Waters Acquity 1,7 мкм 2.1 • 50 мм. Градиент от 5 до 100% В за 4 мин (А: 0,1% муравьиной кислоты в воде; Б: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле).

Оценку специфической активности антиагрегационного действия пептидов проводили *in vitro* с использованием крови здоровых доноров. Кровь брали непосредственно перед исследованием, используя в качестве антикоагулянта водный раствор цитрата натрия (3,8%). Соотношение антикоагулянт/кровь соответствует 1:9. Антиагрегационная активность полученных соединений изучалась на богатой тромбоцитами плазме с использованием АДФ в качестве индуктора агрегации тромбоцитов. Для приготовления богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали в те-

чение 10 мин при 1000 об/мин, после чего отбирали верхний слой плазмы, а остаток центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин для получения бес-тромбоцитарной плазмы. Все процедуры проводили в полистирольной посуде, обладающей тромборезистентными свойствами. В течение всего периода исследования богатая и бестромбоцитарная плазма находилась при комнатной температуре, а запись агрегации тромбоцитов осуществляли при 37°C [11].

Исследование агрегации проводили по методу Борна [4]. Применяли 2-канальный лазерный анализатор агрегации тромбоцитов/счетчик 230LA-2 (НПФ «Биола»). Объем пробы составлял 300 мкл. Время проведения измерения – 8 мин. В качестве индуктора использовали АДФ в концентрации 50 мкМ. Получаемые агрегатограммы представляют собой зависимость степени агрегации от времени, прошедшего после добавления индуктора агрегации. Изучаемые соединения (в виде водного раствора, при необходимости содержащего ДМСО до 0,2%) добавляли в пробу до внесения индуктора агрегации (АДФ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Связывание с белком оценивали для пептидов вида А-В-С-Asp-D, где А, В, С, D – L-аминокислотные остатки, структура которых варьировалась в процессе моделирования; в качестве аминокислоты С рассматривались глицин или аланин. Наличие остатка аспарагиновой кислоты в 4-й позиции положительно влияет на связывание с белком, так как этот остаток может образовывать ионную связь с ионом магния в активном сайте белка интегрин $\alpha_{\text{IIb}}/\beta_3$. Таким образом, было рассмотрено около 20000 пептидов.

В базе данных PDB [9] представлено 17 комплексов белка интегрин $\alpha_{\text{IIb}}/\beta_3$. Для докинга и расчета оценки связывания были выбраны структуры с идентификаторами 2vdp и 2vc2. 2vdp – комплекс белка-мишени с октапептидом. Преимуществом данного комплекса для докинга пентапептидов является то, что в комплексе с белком уже представлен пептид, т.е. теоретически конформация активного сайта белка лучше соответствует связыванию с веществами пептидной природы. При докинге учитывали наличие 2 молекул воды в активном сайте белка. Одна молекула воды образует водородную связь с С-концевым остатком нативного лиганда, другая – с кислородом 3-го С-конца остатка основной цепи нативного лиганда. 2vc2 – комплекс с лигандом непептидной природы. Преимуществом данного комплекса при докинге пептидов является то, что размер лиганда в комплексе близок к размерам пентапептидов (масса лиганда 522 дальтона). Поэтому можно было ожидать, что конформация активного сайта белка лучше подходит для взаимодействия с лигандами такого размера.

В обоих комплексах лиганды в активном сайте образуют ионную связь с ионом магния. Для учета наличия ионной связи перебор конформаций лиганда при докинге начинался с правильно позиционированного фрагмента кислоты.

Для всех рассматриваемых пептидов был проведен докинг и рассчитана оценка связывания с конформациями белка $\alpha_{1\text{IIb}}/\beta_3$, представленными в комплексах 2vdr и 2vc2. Для каждой конформации белка были выбраны вещества с наилучшими оценками связывания. Оценки связывания при докинге в комплекс 2vdr изменяются от 16,52 (лучшее вещество) до 13,89. При докинге в комплекс 2vc2 оценка связывания изменяется от 10,78 до 8,04. С учетом результатов рассчитанных оценок связывания можно заключить, что пептиды существенно лучше располагаются в сайте комплекса 2vdr.

Оценка специфической активности пептидов: His-Ile-Gly-Asp-Asp; Arg-Phe-Ala-Asp-Asp; Arg-Met-Ala-Asp-Asp; Arg-Phe-Gly-Asp-Asp; Met-His-Ala-Asp-Asp – показала способность полученных соединений уменьшать агрегацию тромбоцитов. Результаты исследований на крови здоровых доноров представлены в таблице 1. Полученные результаты свидетельствуют о наличии дозозависимого ингибирования АДФ – индуцированной агрегации тромбоцитов. Наиболее эффективным оказалось соединение с аминокислотной последовательностью His-Ile-Gly-Asp-Asp (HIGDD).

Полумаксимальное ингибирование (IC_{50}) достиглось при концентрации His-Ile-Gly-Asp-Asp, равной 15,4 мкМ (табл. 1, 2, см. рисунок).

ВЫВОДЫ

1. С применением программного комплекса «Алгокомб» проведено молекулярное моделирование пептидов – потенциальных антагонистов GPIIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов.

2. Синтез серии наиболее эффективных смоделированных соединений выполнен твердофазным способом на автоматическом пептидном синтезаторе по стандартному протоколу стратегии FastMoc 0.25. Строение синтезированных соединений подтверждено методами хромато-масс-спектрометрии, ЯМР ^1H -спектроскопии с привлечением 2-мерных методик $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY и NOESY.

3. Выполнена оценка специфичности действия синтезированных соединений *in vitro* на крови здоровых доноров и показано дозозависимое снижение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белушкина Н.Н., Дегтярева О.Г., Махлай А.А. и др. Синтез пептидов RGD-класса, обладающих антиагрегационной активностью // Молекулярная медицина. – 2011; 1: 40–3.
2. Белушкина Н.Н., Дегтярева О.Г., Махлай А.А. и др. Рецепторы тромбоцитов – мишень для антиагрегационной терапии // Молекулярная медицина. – 2011; 3: 10–6.
3. Хельтье Х.-Д., Зиппель В., Роньян Д. и др. Молекулярное моделирование: теория и практика. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 318.
4. Born G. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // Nature. – 1962; 194: 927–9.
5. Bussel J., Kunicki T., Michelson A. Platelets: new understanding of platelet glycoproteins and their role in disease. Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program). – 2000: 222–40.
6. Muryshev A., Tarasov D., Butygin A. et al. A novel scoring function for molecular docking // J. Of Comp. Aided Mol. Design. – 2003; 17: 597–605.
7. Newman P., Poncz M. Inherited disorders of platelets. N.Y. – 1995; 3: 3335–67.
8. Ramensky V., Sobol A., Zaitseva N. et al. A novel approach to local similarity of protein binding sites substantially improves computational drug design results // Proteins. – 2007; 69 (2): 349–57.
9. RCSB Protein Data Bank (PDB). Электронная база данных расшифрованных трехмерных структур белковых комплексов PDB. (Электронный ресурс) // (сайт the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)). (2003–2013). URL: <http://www.rcsb.org/pdb/> (дата обращения: 15.07.2012)
10. Ruoslahti E., Pierschbacher M. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins // Science. – 1987; 238: 491–515.
11. Zhou L., Schmaier A. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma // Am. J. Clin. Pathol. – 2005; 172–83.

Таблица 1

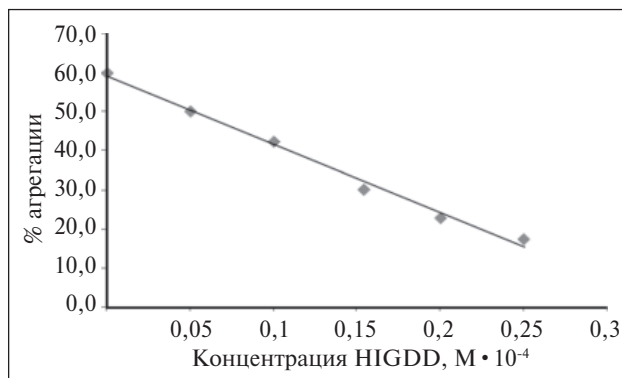
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Пептид	IC_{50} , мкМ
His-Ile-Gly-Asp-Asp	15,4
Arg-Phe-Ala-Asp-Asp	28,4
Arg-Met-Ala-Asp-Asp	34,5
Arg-Phe-Gly-Asp-Asp	60,8
Met-His-Ala-Asp-Asp	58,4

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ HIGDD

Концентрация HIGDD, М	% агрегации в присутствии HIGDD
0	60,0
$0,05 \cdot 10^{-4}$	50,1
$0,1 \cdot 10^{-4}$	42,3
$0,2 \cdot 10^{-4}$	22,7
$0,25 \cdot 10^{-4}$	17,2



Зависимость агрегации тромбоцитов от концентрации HIGDD