

**РАЗРАБОТКА ЛИГАНДОВ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ
ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ C5a КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА****Т.В. Рябцева, Д.А. Макаревич***Белорусский государственный медицинский университет, Минск, ta-yana@yandex.ru*

Компонент комплемента C5a состоит из 74 аминокислотных остатков и образуется в процессе организации мембраноатакующего комплекса. C5a является медиатором воспаления при активации системы комплемента или генерируется непосредственно активированными нейтрофилами, макрофагами и тромбоцитами. В норме существуют механизмы быстрой (в течении 3-5 минут) дезактивации данного анафилотоксина. Концентрация C5a в плазме крови не должна превышать 5 нмоль/л. Однако существуют состояния (синдром острой органной дисфункции на фоне стерильного или инфекционно-воспалительного синдрома), когда происходит нарушение механизмов инактивации C5a, при этом происходит увеличение концентрации анафилотоксина до 100 нмоль/л.

Основными эффектами C5a является активация неспецифического клеточного иммунитета посредством взаимодействия с рецепторами на поверхности иммунокомпетентных клеток (нейтрофилов, моноцитов и макрофагов). Для проявления своей активности C5a взаимодействует с рецепторами C5aR1 (CD88) и C5aR2. В норме данная активация должна происходить локально. Однако в некоторых случаях активация воспалительной реакции реализуется на всем протяжении кровеносного русла, что приводит к активации системы гемостаза, появлению участков нарушения кровообращения, кислородному голоданию и повреждению клеток, тканей и органов [1].

Таким образом, при многих критических состояниях существует необходимость в ингибировании эффектов, опосредованных анафилотоксином C5a. Этого можно добиться путем связывания либо молекулы C5a, либо ее рецептора с моноклональными антителами, либо низкомолекулярными ингибиторами, например олигопептидами [2]. Использование олигопептидов (до 8 аминокислотных остатков) может быть весьма перспективным для разработки специфических и безопасных лигандов по нескольким причинам. Во-первых, относительно низкая стоимость производства (по сравнению с моноклональными антителами). Во-вторых, высокая специфичность и низкая иммуногенность. В-третьих, олигопептиды достаточно просто могут быть иммобилизованы на полимерном носителе без использования высокотоксичных реактивов. В иммобилизованной форме олигопептиды являются более устойчивы к протеолитическим факторам внутренней среды организма и могут быть использованы в качестве лигандов для гемосорбентов [3, 4].

Гемосорбенты используют в медицинской практике для извлечения из крови человека патогенетические биологически активные молекулы экзо- и эндогенного происхождения. Гемосорбент представляет собой изделие медицинского назначения, состоящее из емкости, заполненной либо пористым материалом, либо инертным материалом, на котором закреплены лиганды [5]. Именно качество лигандов обеспечивает специфичность гемосорбента к определенным биомолекулам. Существуют гемосорбенты, лигандом в которых являются закрепленные антитела с определенной специфичностью. Однако применение данных гемосорбентов ограничивается высоким риском развития аллергических реакций на моноклональные антитела. Поэтому в мире ведется активный научный поиск новых безопасных и высокоспецифичных лигандов для более широкого применения в медицине экстракорпоральных методов лечения.

Для разработки лигандов олигопептидной природы можно использовать методы молекулярного моделирования, в частности молекулярный докинг. Молекулярный докинг, позволяет предсказать наиболее энергетически выгодную для образования устойчивого комплекса ориентацию и положение одной молекулы по отношению к другой, может быть использован для предсказания структуры лигандов, способных специфически связываться с молекулой-мишенью [6]. Использование данного метода при разработке специфических лигандов позволяет сократить затраты и повысить эффективность поиска биологически активных молекул для синтеза новых оригинальных сорбентов, способных селективно извлекать из плазмы крови человека биологически активные и патогенетически значимые молекулы [7].

Цель исследования – проанализировать эффективность и локализацию взаимодействия олигопептидов с анафилотоксином C5a методом молекулярного докинга, определить перспективный олигопептид для разработки лигандов.

Материалы и методы. Визуализацию молекулярного комплекса и работу с pdb-файлом проводили с помощью программного обеспечения Chimera 1.14 с утилитой AutoDocVina. Для поиска

pdb-файла, содержащего структурные данные молекулярного комплекса целевого белка с его рецептором, использовали базу данных ProteinDataBank (<https://www.rcsb.org/>). Исходный файл подвергли модификации с целью оптимизации структуры. Для этого определяли и удаляли незначимые для достижения цели полипептидные последовательности. Для определения участков полипептидной цепи, которые участвуют в межмолекулярном взаимодействии, выделяли аминокислотные последовательности на молекуле рецептора, которые находятся на расстоянии менее 3 Å от аминокислотных остатков молекулы мишени. Опираясь на выделенные аминокислотные остатки, определяли аминокислотную последовательность фрагмента полипептидной цепи, обеспечивающего тесный контакт между молекулами. На основании данной аминокислотной последовательности конструировали олигопептиды различной длины, до пяти аминокислотных остатков.

Перед проведением докинга проводили протонирование, H- и C-кэппинг, релаксацию, ионизацию боковых цепей аминокислот как в молекуле-мишени, так и в молекуле олигопептида. Затем проводили построение пространственно-рецепторной решетки сайта связывания, указывая координаты центра и размеры куба. Так как локализация взаимодействия олигопептидов с молекулами-мишенями неизвестна, то в куб включали всю поверхность молекулы-мишени.

Для получения более достоверного результата для сравнительного анализа использовали медианные значения энергии связывания олигопептидов с макромолекулой. Для расчета медианных значений использовали величины энергии связывания в 10 наилучших конформациях, полученные при проведении 2-3 сеансов докинга. Энергия связывания выражается в ккал/моль с отрицательным числом, поэтому для удобства мы использовали значение модуля числа, чтобы описывать результаты без учета знака.

Подтверждение правильности расчетов и оценку эффективности связывания проводили в исследованиях *in vitro* только для тех олигопептидов, энергия связывания которых с молекулами-мишенями являлась максимальной по модулю.

Результаты и обсуждение. Анализ оптимизированной трехмерной структуры комплекса рецептора C5aR1 с C5a с помощью выделения в полипептидной цепи рецептора аминокислотных остатков, расположенных на расстоянии менее 3,0 Å от аминокислотных остатков молекулы C5a позволил определить участки полипептидной цепи рецептора, участвующие в межмолекулярном взаимодействии.

Первый фрагмент с аминокислотной последовательностью $-D^{195}K^{196}R^{197}R^{198}E^{199}R^{200}A^{201}V^{202}A^{203}$. Центральное место в данном фрагменте принадлежит Glu^{199} , так как именно данный аминокислотный остаток расположен на расстоянии менее 3,0 Å от аминокислотных остатков молекулы C5a. Вторым фрагментом с аминокислотной последовательностью $-F^{254}W^{255}L^{256}P^{257}W^{258}Q^{259}V^{260}T^{261}G^{262}$. Центральное место в данном фрагменте принадлежит Tyr^{258} . Третий фрагмент содержит в своем составе два аминокислотных остатка Lis^{279} и Asp^{282} , которые наиболее близко располагаются к молекуле C5a: $-F^{275}L^{276}L^{277}L^{278}K^{279}K^{280}L^{281}D^{282}S^{283}L^{284}C^{285}V^{286}$. На основании аминокислотного состава данных фрагментов, путем последовательного деления были сконструированы ди-, три-, тетра- и пентапептиды.

Всего было проанализирована энергия 26 дипептидов. Модуль энергии связывания дипептидов с молекулой C5a составил 4,6 (4,4-5,2) ккал/моль. Наибольшим медианным значением модуля энергии связывания характеризуется взаимодействие олигопептида FW (5,5 (5,3-5,7) ккал/моль), наименьшим – CV (3,8 (3,7-4,0) ккал/моль). Разница медианных значений модуля энергии связывания данных пептидов с C5a статистически значима и составляет 1,7 (1,6-1,7) ккал/моль. Сравнительный анализ показал, что медианное значение энергии связывания, рассчитанное для дипептидов, сконструированных из 2-го фрагмента полипептидной цепи молекулы рецептора C5aR1, является наибольшим по сравнению с медианными значениями энергии для дипептидов, сконструированных их 1-го и 3-го фрагментов. Данное обстоятельство, по видимости, связано с тем, что 2-й исследуемый фрагмент имеет в своем составе ароматические аминокислоты.

Среди исследованных 24 трипептидов наибольшее медианное значение модуля энергии связывания было определено при взаимодействии C5a с трипептидом FWL (6,1 (5,6-6,5) ккал/моль), наименьшее – с VTG, SLC, LCV, KKL, KLD.

Медианное значение энергии связывания, рассчитанное для трипептидов, сконструированных из 2-го фрагмента полипептидной цепи молекулы рецептора C5aR1, составляет 6,0 (5,2-6,1) ккал/моль и статистически значимо превышает медианные значения энергии для трипептидов, сконструированных их 1-го и 3-го фрагментов. Исследование энергии связывания 21 тетрапептида с C5a показало, что тетрапептид WLPW взаимодействует с C5a с наибольшим медианным значением энергии связывания, которое равно 5,9 (5,1-5,9) ккал/моль. С наименьшей величиной модуля

энергии связывания с C5a взаимодействует тетрапептид DSLC (4,4 (4,0-4,7) ккал/моль). Как и в случаях с ди- и трипептидами, тетрапептиды, сконструированные из 2-го фрагмента полипептидной цепи, содержащего ароматические аминокислоты, взаимодействуют с C5a с наибольшим медианным значением по сравнению с другими тетрапептидами.

Сравнительный анализ модуля энергии связывания среди 18 пентапептидов показал, что максимальным значением 6,1 (5,9-6,2) ккал/моль сопровождается взаимодействие C5a с пентапептидом WLPWQ, минимальным 4,5 (4,4-4,6) ккал/моль – с пептидом DKRRE. Все пентапептиды, сконструированные из 2-го фрагмента, содержат ароматические аминокислотные остатки и характеризуются высокими ($\geq 5,1$ ккал/моль) медианными значениями энергии связывания с C5a по сравнению с другими пентапептидами.

В результате работы *in silico* были сконструированы и отобраны олигопептиды, потенциально способные специфически связывать молекулу C5a.

Список использованных источников

1. Wood J.T. C5a anaphylatoxin and its role in critical illness-induced organ dysfunction / *Eur J Clin Invest.* – 2018. – p.1-11
2. Monk P.N. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors / *British Journal of Pharmacology.* – 2007. – p.429-448
3. Lau, J.L. Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions / J.L. Lau, M.K. Dunn // *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* – 2018. – Vol.26, N 10. – P.2700–2707.
4. Menegatti, S. The hidden potential of small synthetic molecules and peptides as affinity ligands for bioseparations / S. Menegatti, A.D. Naik, R.G. Carbonell // *Pharm.Bioprocess.* – 2013. – Vol.1, N 5. – P.467–485.
5. Кирковский, В.В. Физико-химические методы коррекции гомеостаза: монография / В. В. Кирковский. – Москва: Русский врач, 2012. – 214 с.
6. Molecular docking and structure-based drug design strategies / L. G. Ferreira [et al.] // *Molecules.* – 2015. – Vol. 20. – P. 13384–13421.
7. Pinzi L. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery / L. Pinzi, G. Rastelli // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, N 18. – P. 1–23.