Компьютерные методы в фармакологии

Владимир Борисович Сулимов

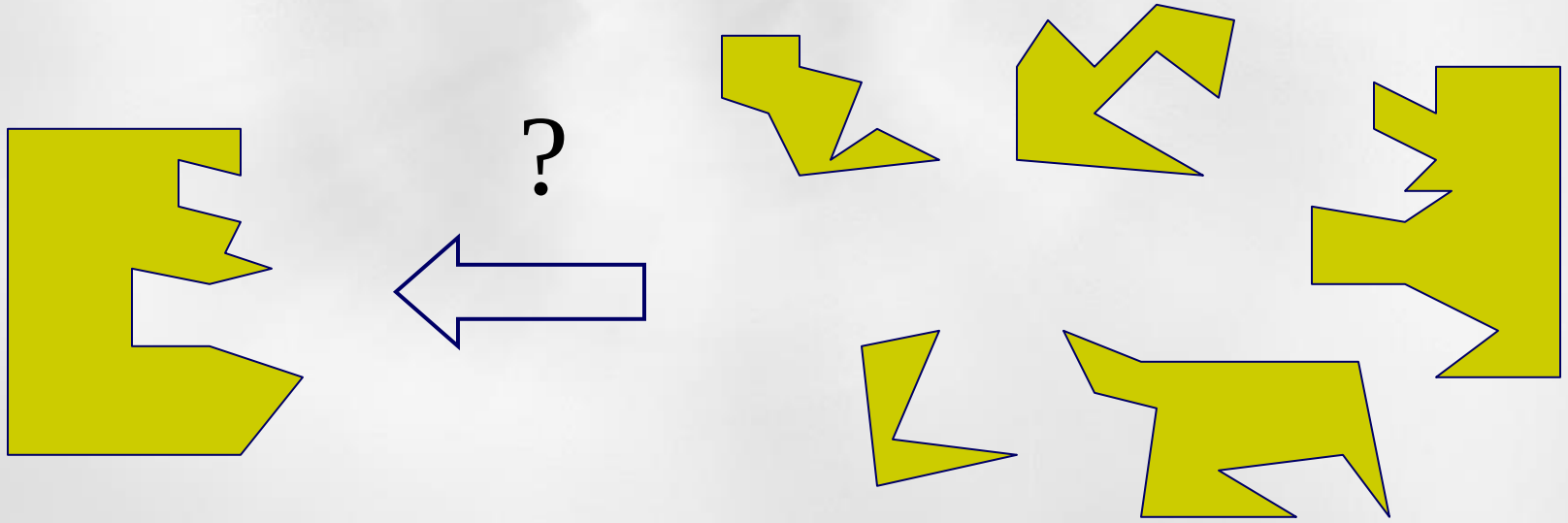
Научно-Исследовательский Вычислительный Центр МГУ

Лекция № 2

Методы молекулярного моделирования

Поиск ингибитора

- **Как найти молекулу-ингибитор для заданного белка-мишени?**
- ***Обычный путь*: *in vitro* и *in vivo* экспериментальный очень затратный перебор различных химических соединений**
- ***Новый путь*: виртуальный перебор с помощью компьютеров - *in silico*!**
- **Молекула-кандидат в ингибиторы – лиганд (ligand) от латинского слова ligare = to bind: молекула, которая может связаться и сформировать комплекс с биомолекулой**
- **Компьютерный перебор баз данных лигандов**



Докинг, скоринг и скрининг – основа конструирования лекарств

Молекулярное моделирование помогает быстрее и дешевле выполнять начальную стадию разработки

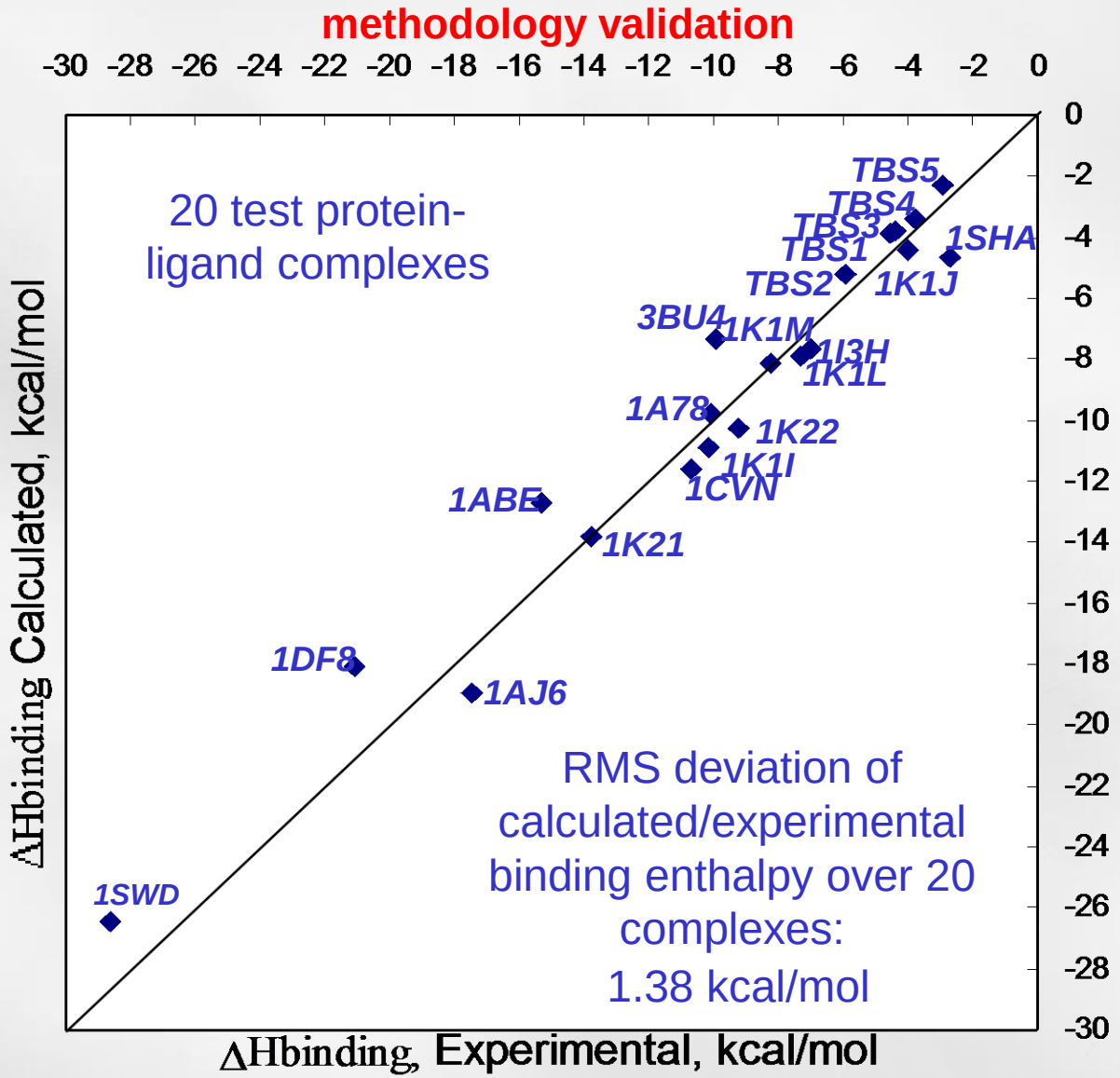
- **Докинг** – позиционирование лиганда в активном центре белка
- **Скоринг** – оценка энергии связывания лиганда с белком: чем сильнее лиганд связывается с белком, тем эффективнее лекарство – меньшая концентрация лекарства даст терапевтический эффект
- **Скрининг** – перебор больших баз данных молекул с целью поиска кандидатов в ингибиторы – **нужны суперкомпьютеры**

Межмолекулярное взаимодействие

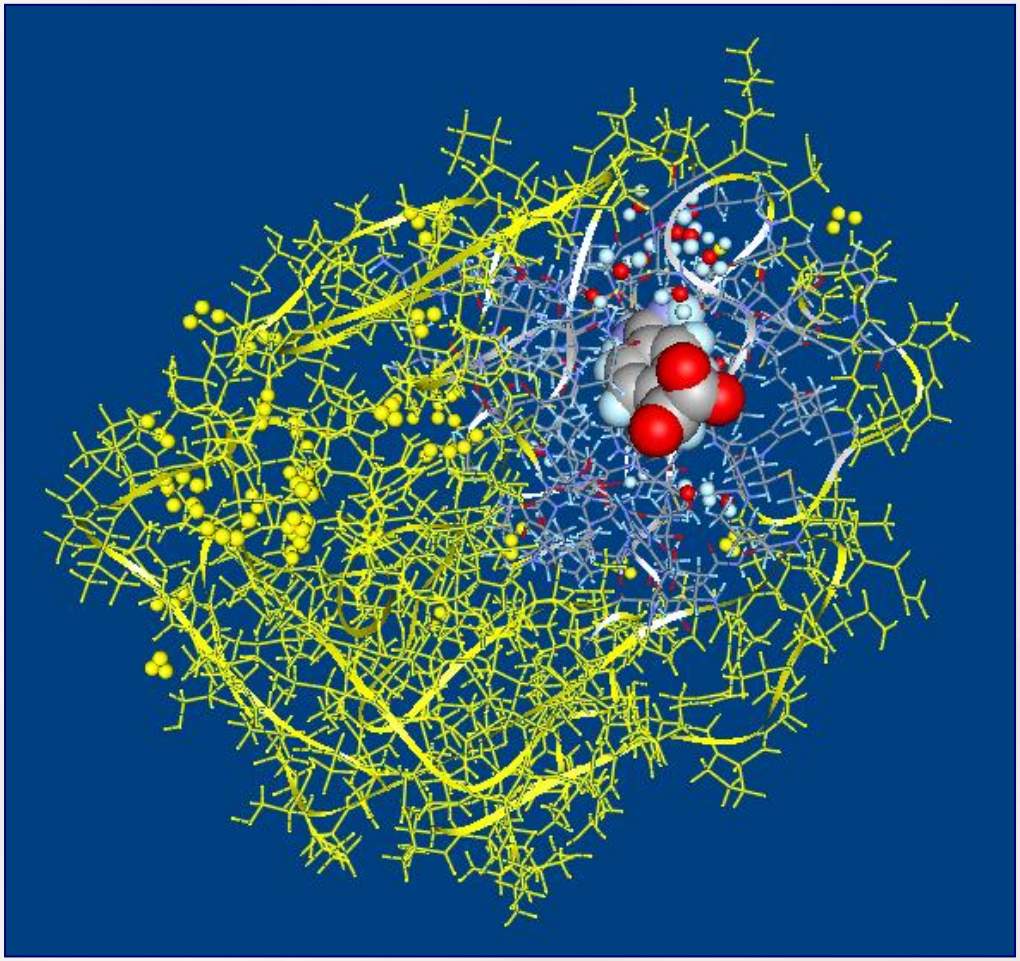
- Правильный учет ***сил между молекулами*** – основа успеха молекулярного моделирования лекарств
- Эти ***силы*** могут быть правильно рассчитаны только методами ***квантовой механики***
- ***Силы между атомами и структура молекул*** правильно рассчитываются только методами ***квантовой механики***

- ***Вывод: конструировать лекарства надо методами квантовой механики***

Quantum calculation of binding enthalpy for protein-ligand complexes:



QM расчет ΔH связывания белок-лиганд



$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$$

Молекулярная механика

- Квантовая механика и квантовая химия
- Точные законы – очень трудоемкие вычисления – одна молекула из нескольких десятков атомов - десятки и сотни часов
- Что делать?
- Создать силовое поле (force field)– набор потенциалов, описывающих взаимодействие атомов и молекул, как классических частиц: расчеты – десятки минут для тысяч атомов

Силовые поля

– ***Knowledge-based:*** **потенциалы из статистики взаимного расположения атомов**

– ***Empirical:*** потенциалы из экспериментальных значений констант связывания

- **Обучающий набор комплексов протеин-лиганд**
- **Тестовый набор комплексов протеин-лиганд**

– ***Physical:*** **силовые поля - потенциалы, полученные из физических законов, учет растворителя**

Силовые поля – Force fields

- MM3
- Charmm
- Amber
- OPLS-2005
- OPLS3
- **MMFF94 – Merck – Большая Фармацевтическая компания**
- **ReaxxFF**

Силовые Поля – Force fields

- MMFF94 – ***ab initio*** force field
  - На основе **квантовой механики**
  - Валентные связи
  - Валентные углы
  - Торсионы – вращения вокруг связей
  - Межмолекулярное взаимодействие
  - Электростатические взаимодействия
  - Ван дер Ваальсовы взаимодействия

Молекулы

- Белки – протеины – тысячи атомов
  - Полипептидная цепь:

- Органические молекулы – десятки атомов: миллиарды молекул: C, N, O, H, S, Cl, F, Br ...

Чтобы предсказать константу связывания молекулы-лиганда с белком

…мы должны рассчитать <u>всего-навсего</u> свободную энергию связывания комплекса белок-лиганд

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Изменение **энтальпии** при связывании лиганда

Изменение **энтропии** при связывании лиганда

Термодинамика и статистическая физика

Аккуратный расчет свободной энергии связывания лиганда с протеином

- **Методы молекулярной динамики: $\Delta G=\Delta H-T\Delta S$**
  - **Вычисление траектории движения атомов системы белок+лиганд, находящейся в термостате**
  - **Описание движения атомов как классических частиц, взаимодействующих друг с другом с помощью классических потенциалов**
  - **Усреднение по траектории – усреднение по ансамблю**
  - **Время вычислений: сутки и более на одном процессоре – нужно использовать многопроцессорный режим**
  - **Реальный пример: Задача 60 тысяч атомов 100 нс, 224 процессора (16 узлов) считалась на суперкомпьютере Ломоносов-2 61 час – сейчас одна задача мах 20 часов.**

Что измеряется в эксперименте? С чем сравнивать расчет?

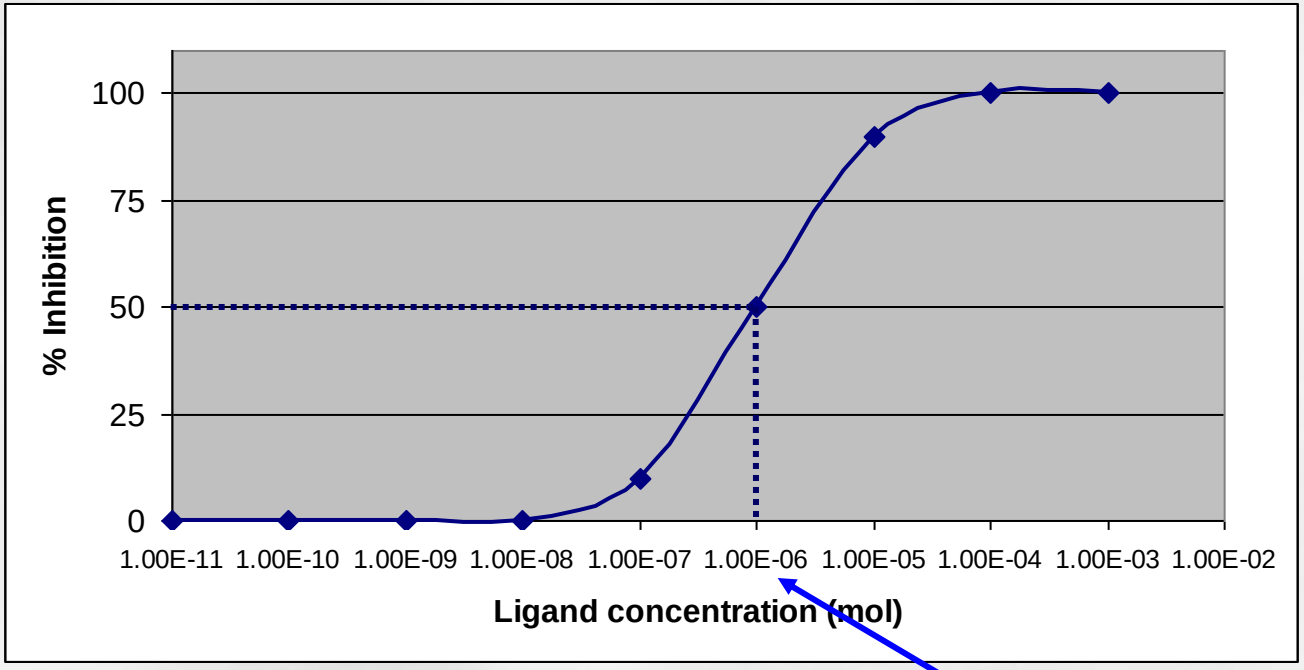
- Измерение IC50 – ингибирующая концентрация: концентрация ингибитора, при которой активность белка подавляется на 50%
- Чем меньше IC50 , тем выше ингибирующая активность вещества: IC50 = 1 наномоль лучше, чем IC50 =1 микромоль
- Чем больше энергия связывания белок-лиганд, тем меньше IC50 и лучше ингибитор
- Белок вместе с ингибитором кристаллизуются, применяется метод рентгеноструктурного анализа для определения координат атомов комплекса белок-лиганд и определения положения лиганда в активном центре белка

Что измеряется в эксперименте?
С чем сравнивать расчет?

- **Измерение IC_{50} – ингибирующая концентрация**
- **IC_{50} – мера ингибирующей активности данного вещества**
- **IC_{50} – измеряется в экспериментах *in vitro***

Измерение ингибирующей концентрации IC_{50}

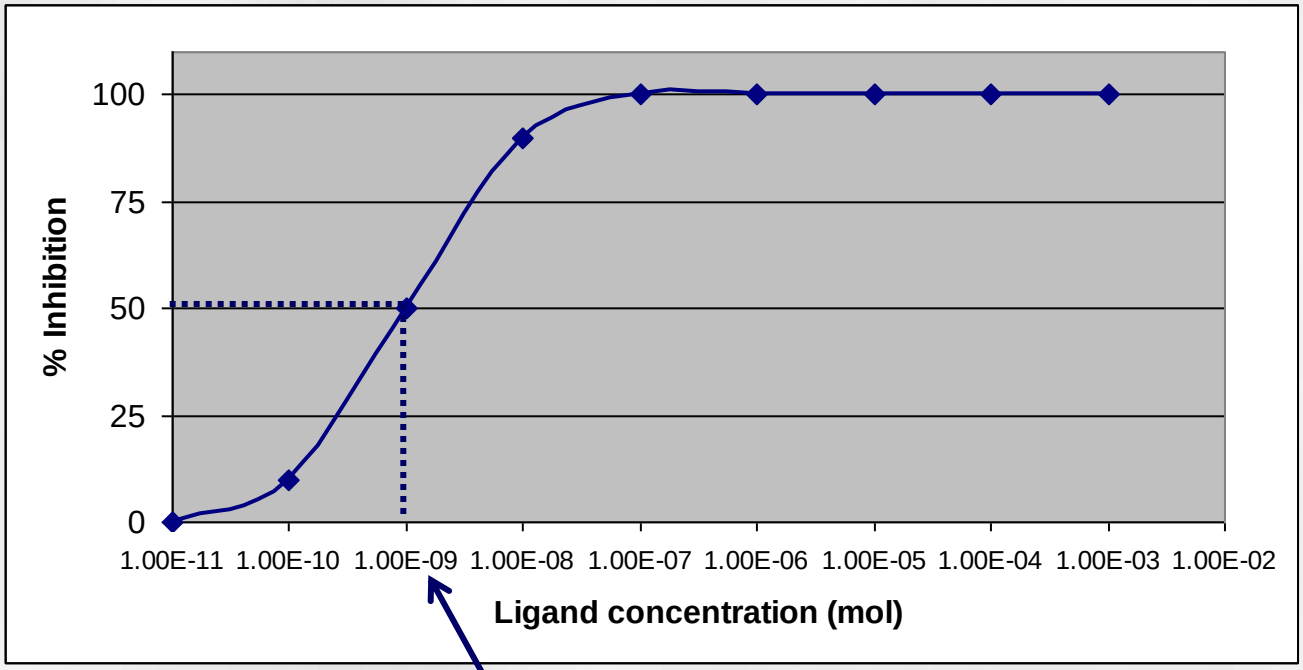
Лиганды со средней способностью связывания с белком



Концентрация, при которой достигается 50% ингибирование (IC_{50}) = 10^{-6} моля

Измерение ингибирующей концентрации IC_{50}

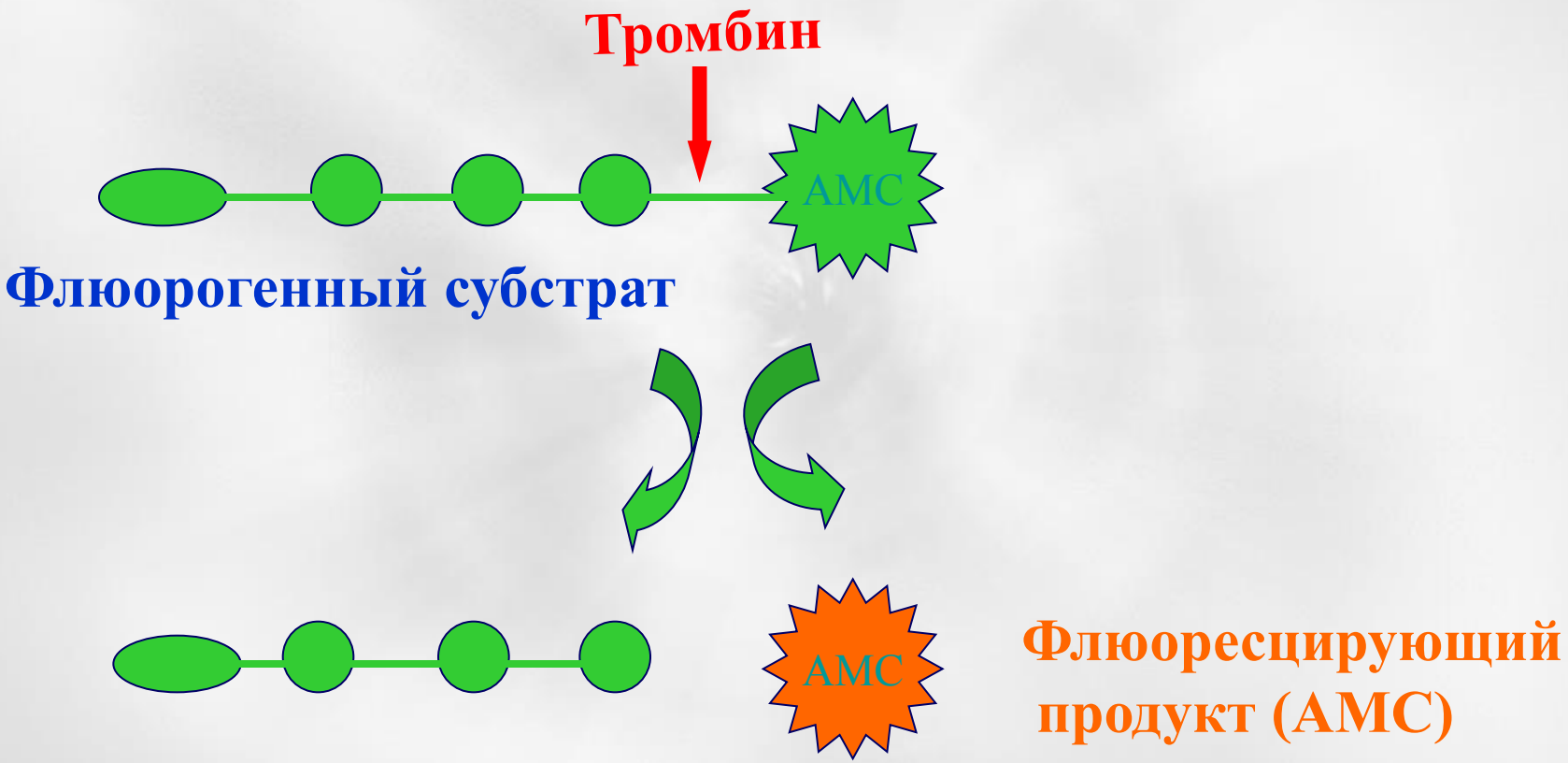
Лиганды с высокой способностью связывания с белком



Концентрация, при которой достигается 50% ингибирование (IC_{50}) = 10^{-9} моля

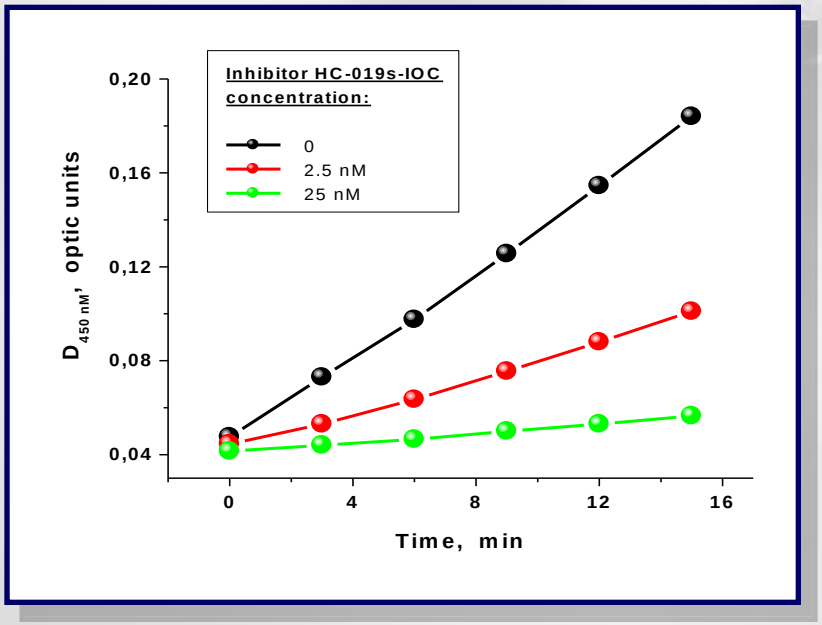
Измерение IC_{50} при ингибировании тромбина

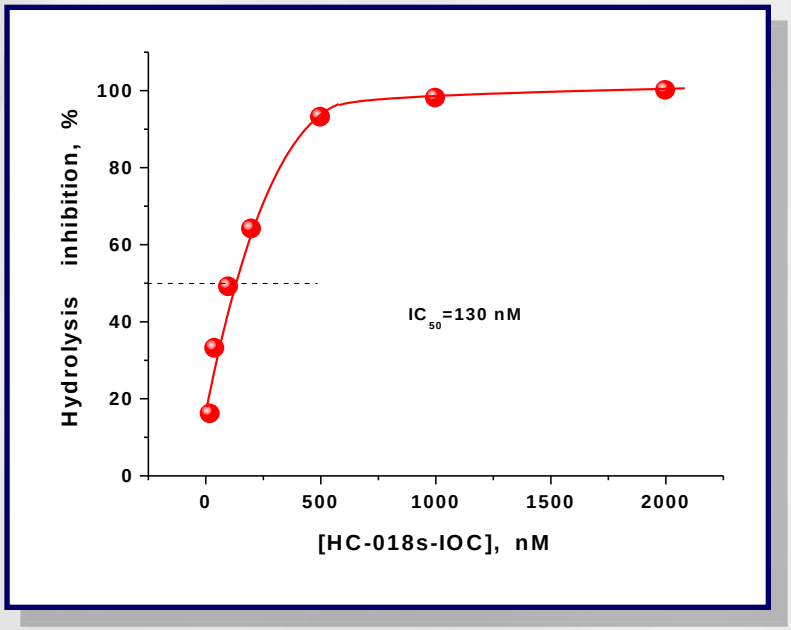
Схема гидролиза субстрата тромбином



Ингибитор тромбина уменьшает скорость гидролиза тромбином хромогенного субстрата:

IC_{50} – это концентрация ингибитора, при которой скорость гидролиза снижается до 50% от первоначальной величины





Комплексы Белок-Лиганд

- Protein Data Bank - PDB:

  www.rcsb.org/pdb

  – X-ray эксперименты

  – 3D структуры закристаллизованных комплексов белок-лиганд

  – Положения только тяжелых атомов

  – Точность 1.5 Å - лучшие

Структуры молекул белков

- Белки кристаллизуются и методом рентгеноструктурного анализа экспериментально определяется пространственное расположение их атомов
- Определяются декартовы координаты «всех» атомов белка
- Декартовы координаты атомов комплексов белок-лиганд
- Информация о белках и комплексах белков с лигандами собрана в базе данных Protein Data Bank (PDB) http://www.rcsb.org/

Общее количество структур – 171588 (ноябрь 2020); 69511 в 2010

Белки, X-ray – 134334 структур (28 ноября 2020)

Resolution характеризует точность определения координат атомов в структуре кристалла. Чем меньше этот параметр тем лучше. Можно работать, когда Resolution < 3.0 Å.

Докинг – начало компьютерной разработки новых ингибиторов

- Докинг - позиционирование молекулы-лиганда в активном центре белка-мишени
- Лиганд – от латинского слова ***ligare – связываться –*** это молекулярный объект, который может связываться с биомишенью

Программы докинга стали популярны. Десятки программ докинга востребованы при разработке лекарств. Каждая программа – уникальное сочетание моделей и приближений, скорости

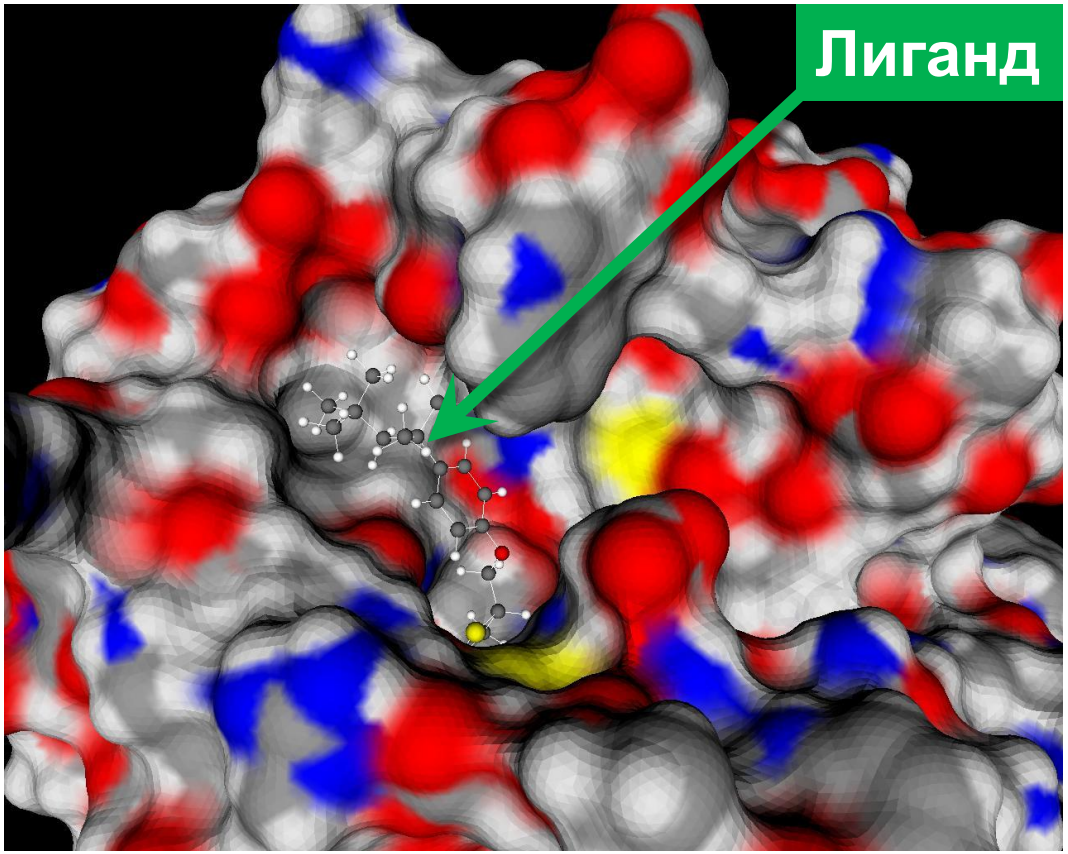
Возможно ли увеличить точность докинга?

- Точность позиционирования – ***удовлетворительна***
- Точность расчетов энергии связывания белок-лиганд ΔG_{bind} – ***плохая***

Точность докинга → **Эффективность разработки лекарств** ↑

Перебор больших баз данных органических молекул:
Поиск молекул с наибольшей энергией связывания с белком-мишенью

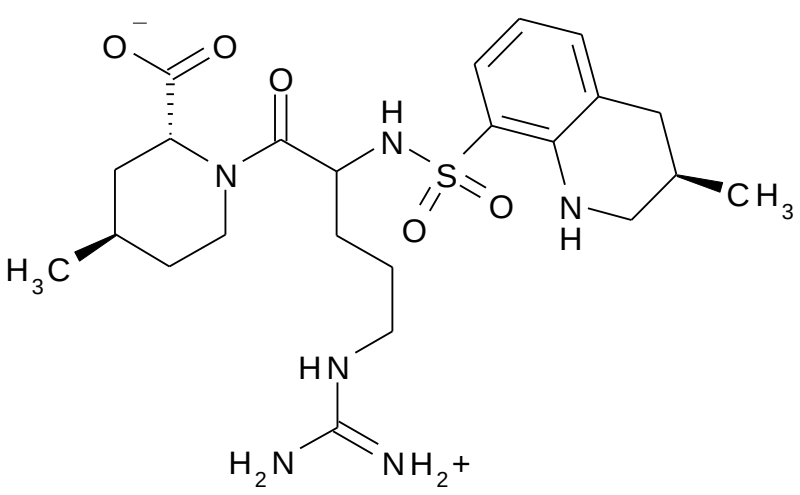
Парадигма докинга: в эксперименте лиганд связывается вблизи **глобального минимума** энергии системы белок-лиганд

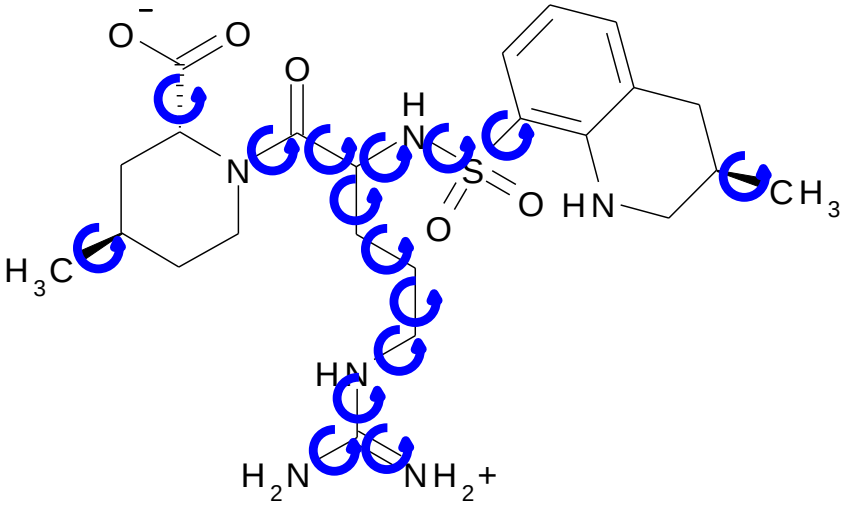


Докинг – нахождение Глобального минимума энергии системы белок-лиганд

Основная проблема докинга: многомерность пространства глобальной оптимизации

Типичный лиганд – ингибитор тромбина, Аргатробан, антикоагулянт – препятствует свертываемости крови





Получаем задачу на нахождение глобального минимума в пространстве 15 + 6 = 21 измерений!

Систематический перебор невозможен

Докинг

- Первые программы докинга появились в конце 1980х: Силовых полей тогда не было, не было и многопроцессорных компьютеров. Простейшие модели докинга – жесткий лиганд в жесткий белок: ключ (лиганд) соответствует замку (белок)
- Простейшие силовые поля, докинг на настольном компьютере, докинг на ноутбуке – нужно посчитать многие тысячи молекул.
  Мантра всех программ докинга: кто быстрее!
- **Миллениум:** Созданы силовые поля, глобальная оптимизация на сложной многомерной энергетической поверхности

Докинг

- 2005-2010 - Суперкомпьютеры, **мантра: кто быстрее, кто больше,** виртуальный скрининг многих десятков тысяч молекул, сейчас – миллионы и миллиарды молекул
- Суперкомпьютеры: **кто точнее?** Многопроцессорный докинг 1 лиганда, минимум упрощений и без подгоночных параметров
- Точность определяет эффективность применения компьютерного моделирования для разработки лекарств, эффективной всего конвейера разработки лекарств.

- **Квантовый докинг – энергия с помощью квантовой механики**
- **2х ступенчатый виртуальный скрининг:**
  - **Скрининг больших баз данных молекул – классический докинг SOL**
  - **Квантовый докинг лучших молекул, отобранных SOL**

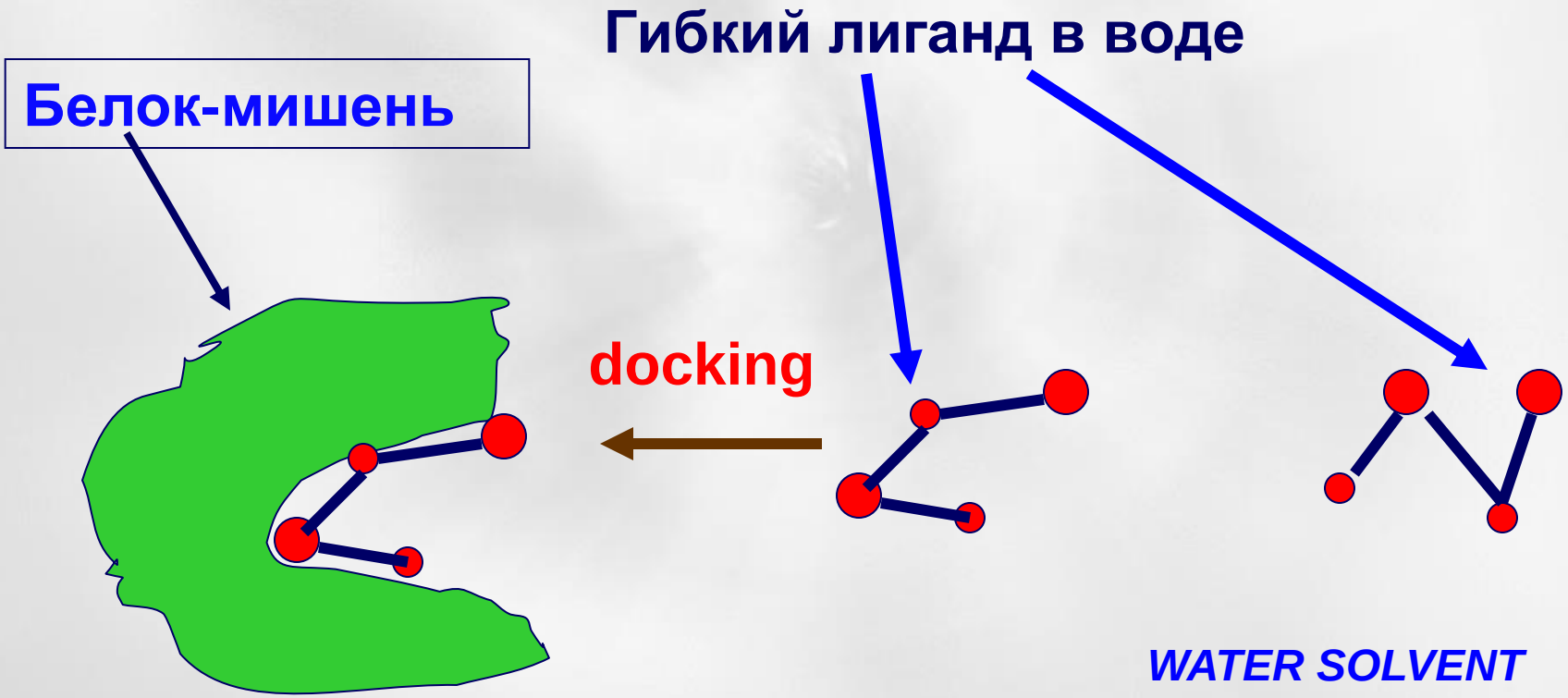
Докинг

- Начальный этап разработки лекарства: виртуальный скрининг многих десятков тысяч молекул, сейчас – миллионы и миллиарды молекул – это существующие, лежащие на полке молекулы
- Зачем это нужно?
- 1. найти новые молекулы-ингибиторы и подтвердить их ингибирующую способность в экспериментах in vitro.
- Далее, отталкиваясь от этих молекул, синтезировать новые более сильные ингибиторы, и сделать основу лекарства

- 2. Среди существующих лекарств найти новые ингибиторы для новых белков-мишеней. Такие соединения очень быстро могут пройти все испытания и быть зарегистрированы в качестве новых лекарств – новое применение.

Ключевые программы для дизайна лекарств

Docking – правильное позиционирование лиганда в активном центре белка-мишени



Ключевые программы для дизайна лекарств

Scoring – правильная оценка энергии связывания белок-лиганд

Слабые межмолекулярные взаимодействия

Высокая точность:~ 1 kcal/mol ~ 0.05 eV

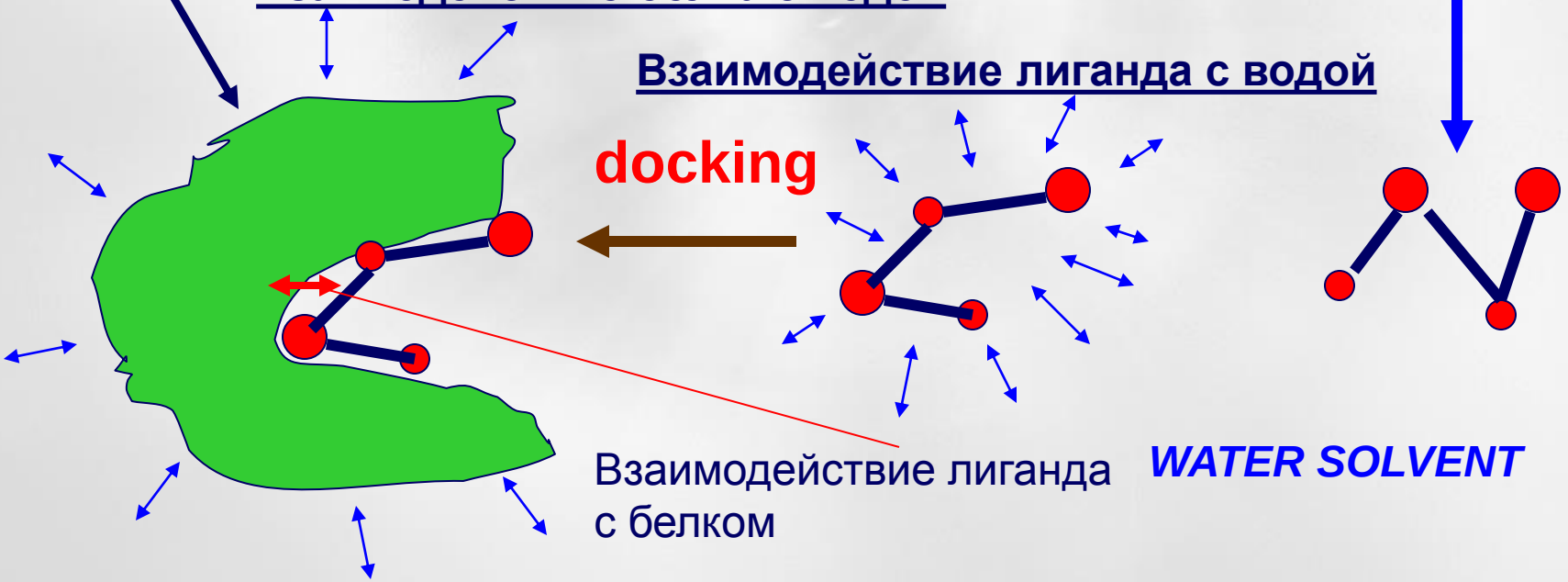
Связывание происходит в воде

белок: тысячи атомов

лиганды: Десятки атомов

Взаимодействие белка с водой

Взаимодействие лиганда с водой



Энергия связывания белок-лиганд

- **Взаимодействия между атомами белка и лиганда: электростатика и силы Ван-дер-Ваальса**
- **Энергия десольватации:**
  - **Подсчет баланса взаимодействий: лиганда с растворителем, белка с растворителем, комплекса белок-лиганд с растворителем**
- **Энергия внутренних напряжений лиганда**
- **Изменение числа вращательных степеней свободы лиганда при связывании – неправильно! Надо честно считать изменение энтропии**

Энергия десольватации ΔG_{desolv} :

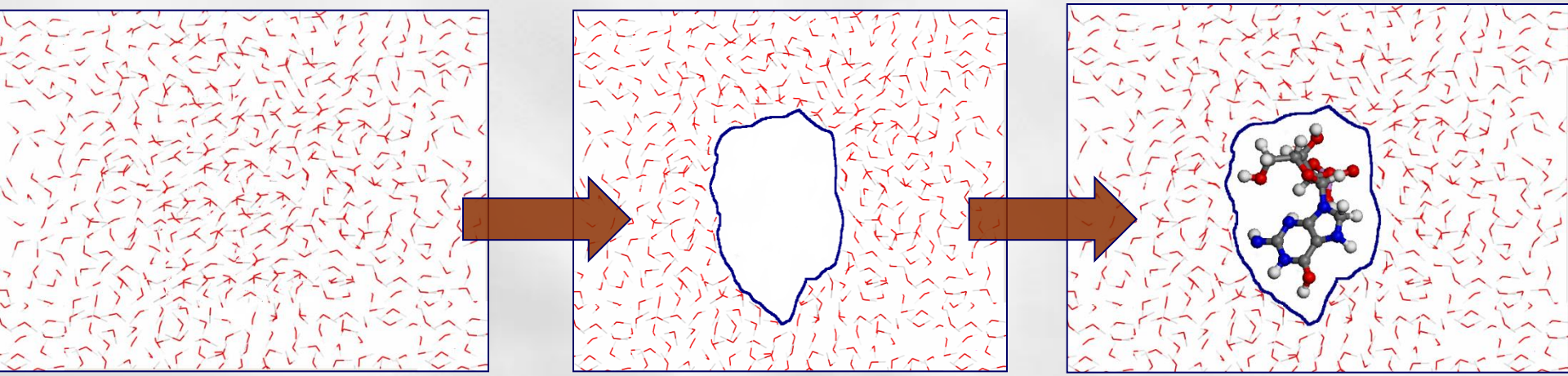
$$\Delta G_{desolv} = G_{solv}(\text{белок-лиганд}) - G_{solv}(\text{белок}) - G_{solv}(\text{лиганд}),$$

где $G_{solv}(X)$ – энергия сольватации молекулы X,

В величину $G_{solv}(X)$ вносят вклад следующие взаимодействия:

- Электростатическое взаимодействие молекулы с растворителем
- Ван-дер-Ваальсово взаимодействие молекулы с растворителем
- Кавитация: статистическое образование полости в растворителе, имеющей форму растворяемой молекулы

Процесс растворения молекулы (solute) в растворителе (solvent)



$$\Delta G_{растворения} = \Delta G_{кавитации} + \Delta G_{взаимодействий}$$

$$\Delta G_{взаимодействий} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{электростатические}$$

$$\Delta G_{SOLV} = \Delta G_{NES} + \Delta G_{ES}$$

Энергетические единицы

1 эВ ≈ 23 kcal/mol

1 эВ = 1.602176…10^{-19} Дж

1 cal = 4.1868 Дж

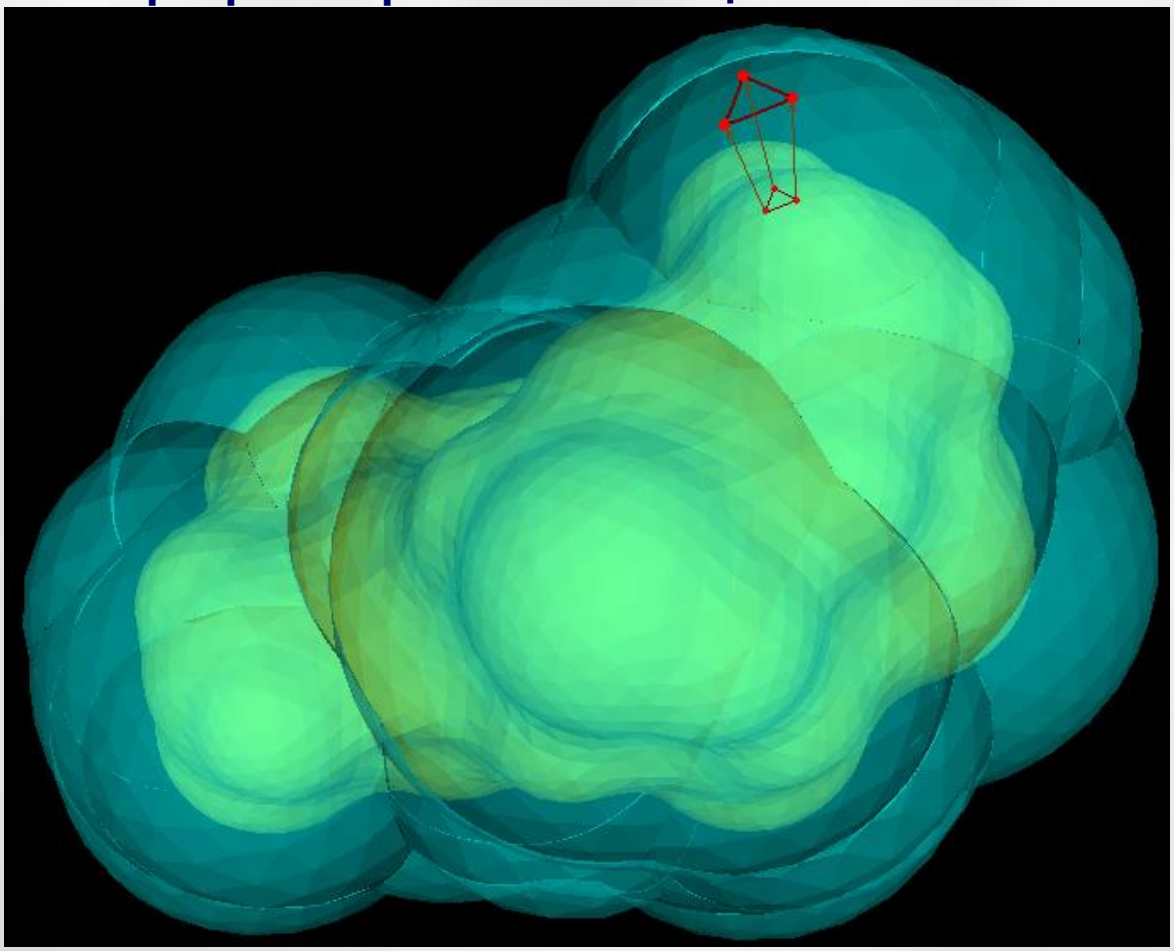
N_A = 6.022141…10^{23}

1 эВ = 1.602…10^{-19} x N_A x 10^{-3} /4.1868

1 эВ = 23.045121 kcal/mol

Автоматическое построение гладкой триангулированной поверхности вокруг молекулы любой формы и любого размера:

программа построения такой поверхности *TAGSS* разработана в Лаборатории Вычислительных Систем и Прикладных Технологий Программирования НИВЦ МГУ

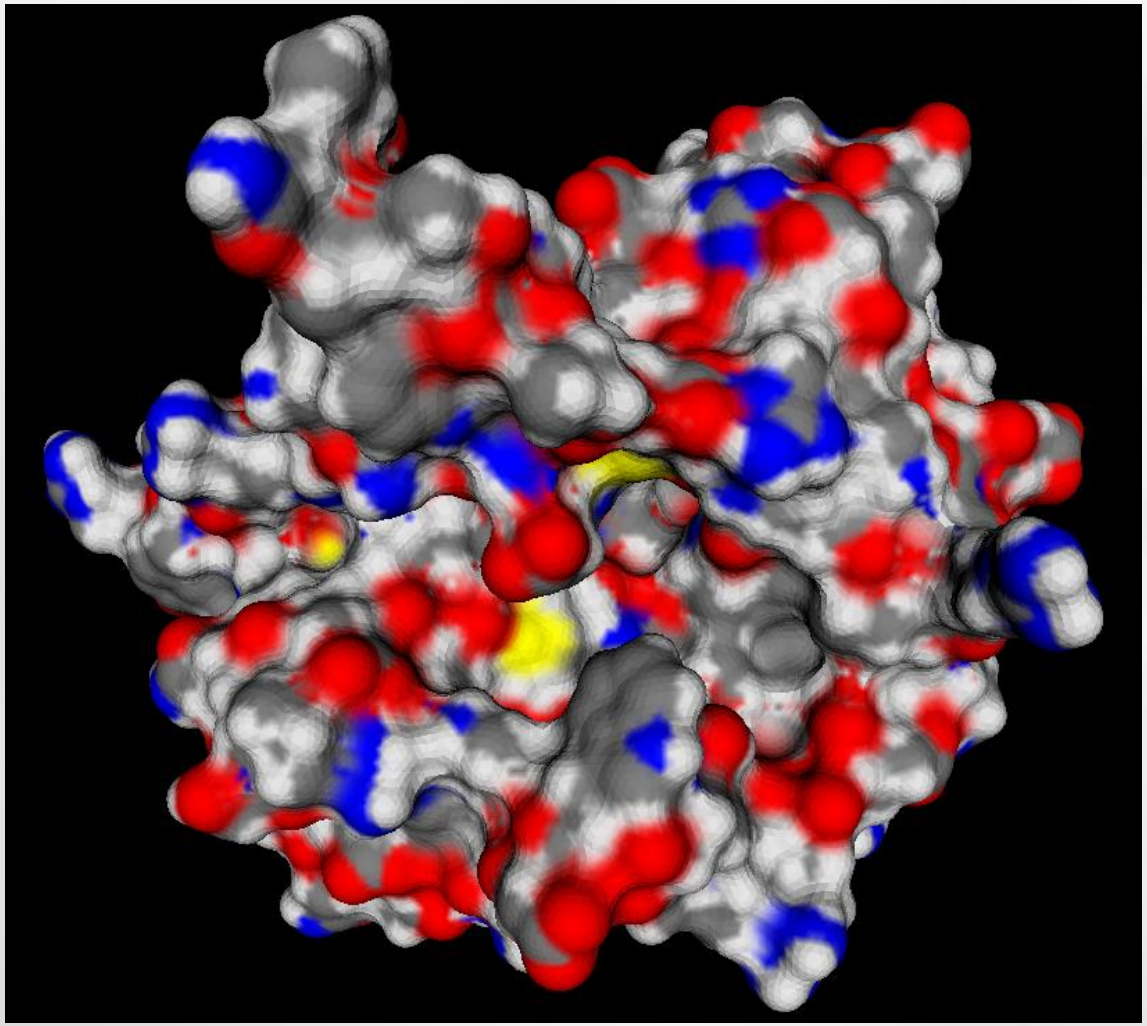


Желтая поверхность – для подсчета электростатических взаимодействий молекулы с растворителем

Прозрачная поверхность – для подсчета VdW взаимодействий молекулы с растворителем

Прозрачная поверхность получается путем соответствующего преобразования из желтой

Поверхность доступная растворителю вокруг белка тромбина



Здесь различные цвета различных областей поверхности соответствуют разным типам атомов, находящихся вблизи этих областей:

- **Красный – кислород**
- **Синий – азот**
- **Серый – углерод**
- **Белый – водород**
- **Желтый – сера**

Программы докинга

- **AutoDock** – The Scripps Research Institute – **USA**
- **ICM** – Molsoft, LLC (Abagyan) San Diego, CA, **USA**
- **DOCK6** – University of California, San Francisco, **USA**
- **GOLD** - The Cambridge Crystallographic Data Centre - **UK**
- FlexX – BioSolveIT - **Germany**
- Sybyl – Tripos - **USA**
- Discovery Studio – Accelrys - **USA**
- Glide – Schrödinger - **USA**
- Lead-Finder – Moltech, Ltd – Москва, Россия
- SOL – НИВЦ МГУ - Москва, Россия
- FLM – НИВЦ МГУ - Москва, Россия
- SOL-T, SOL-P - Москва, Россия

Программы докинга против COVID-19

- В настоящее время известно около 50 программ докинга и с десяток сайтов для выполнения докинга online
- Каждая программа уникальна совокупностью используемых моделей, аппроксимаций и подгоночных параметров
- Большинство программ рассчитаны на работу на ноутбуке (1 CPU) и быстрый докинг – меньше минуты на 1 лиганд
- Пандемия высветила чрезвычайную востребованность докинга, особенно докинга больших баз данных, имеющих сотни тысяч и даже миллионы молекул
- Цель – быстрая разработка противовирусных препаратов
- Несколько белков коронавируса SARS-CoV-2 считаются терапевтическими мишенями, и их атомистическая пространственная структура измерена – можно проводить **Computer Aided Structural Based Drug Design**

Спасибо за внимание

- ***…Surely every medicine is an innovation; and he that will not apply new remedies, must expect new evils…***
- ***…Каждый медицинский метод есть инновация; а кто не хочет применять новые средства, должен ждать новых бед…***

Sir Francis Bacon (1561-1626)

OF INNOVATIONS