

РОЗДІЛ III

Органічна хімія

УДК 541.11

Аліна Підгорна
Оксана Терещенко
Людмила Святенко

Розробка структур потенційних інгібіторів Toll-подібних рецепторів

Докінг комплексу Toll-подібний рецептор 4 (TLR4) / мієлоїдний фактор диференціації 2 (MD-2) зі сполуками, змодельованими на основі Eritoran, виявив ряд потенційно більш ефективних інгібіторів цього комплексу з огляду на їх більшу спорідненість до білка завдяки додатковому зв'язуванню.

Ключові слова: Toll-подібні рецептори, ліпополісахарид, інгібітор, Eritoran, молекулярний докінг.

Постановка наукової проблеми та її значення. Упродовж останніх років все більше уваги в захисті макроорганізму від інфекційних агентів приділяється рецепторам вродженого імунітету – Toll-подібним рецепторам (TLR). TLR – це клас мембраноасоційованих рецепторів, які розпізнають консервативні молекули мікробного походження тоді, коли патогенні мікроорганізми долають фізичні бар'єри, такі як шкіра, слизові оболонки травного, респіраторного та уrogenітального трактів [1; 2]. Специфічними лігандами TLR вважаються патоген-асоційовані молекули, унікальні для мікроорганізмів і є невід'ємними складниками їхнього метаболізму. TLR здатні розпізнавати патогени і, активізуючись, збільшувати синтез прозапальних цитокінів, простагландинів, хемокінів, які запускають механізм запальної відповіді. TLR відіграють важливу роль у патогенезі гострих респіраторних захворювань, бронхіальної астми, ішемічної хвороби серця і коронарної недостатності, передчасних пологів і раку, псоріазу і ревматоїдного артриту [8].

Розрізняють декілька типів TLR, серед яких TLR4 є одним із найбільш вивчених і клінічно значущих з огляду на його участь у декількох імунно опосередкованих патологіях. TLR4 розташований на поверхні клітин і разом з мієлоїдним фактором диференціації 2 (MD-2) утворює гетеродимер, який розпізнає загальну «картину» в структурно різноманітних молекулах ліпополісахаридів (ЛПС) і з високою спорідненістю зв'язується з ними [18; 20]. ЛПС – це гліколіпіди зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій і відомі індуктори вродженої імунної відповіді [13]. Вони складаються з фосфорильованого диглюкозаміну і кількох ацильних ланцюгів (рис. 1а).

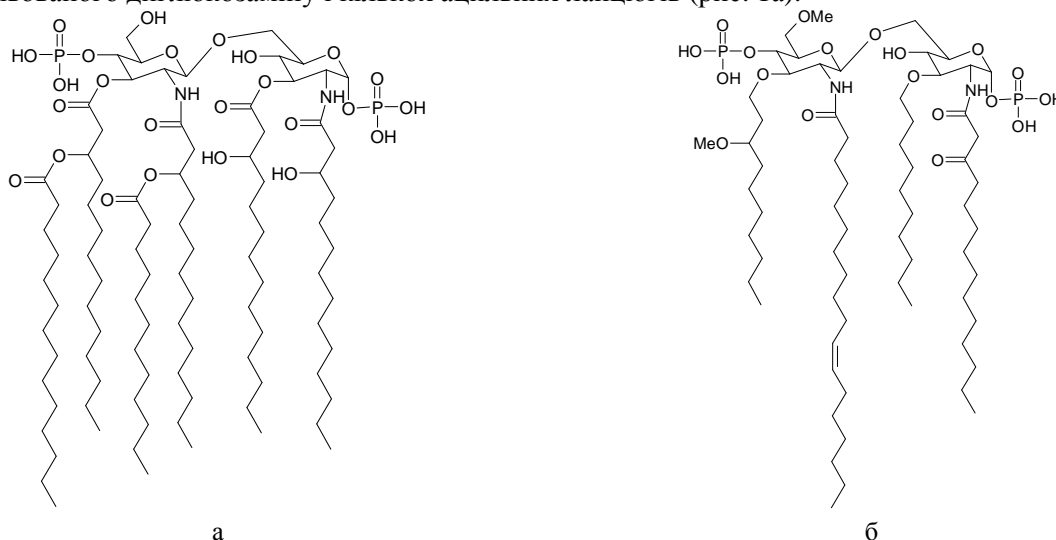


Рис. 1. Просторова структура Ліпиду А *E. coli* (а) та Eritoran (б)

Дослідження специфіки упізнання ліганда та механізму активації рецепторного комплексу TLR4-MD-2-ЛПС показали, що ЛПС взаємодіє з великою гідрофобною кишенею в MD-2 (рис. 2) [12; 21]. П'ять із шести ліпідних ланцюгів ЛПС заховані глибоко всередині кишені, а інший ланцюг поширюється на поверхню MD-2, вступаючи у гідрофобну взаємодію з фенілаланінами TLR4. ЛПС зв'язування індукуює утворення рецептора-мультимера, що складається з двох копій комплексу TLR4-MD-2-ЛПС, розташованих симетрично. В утворенні мультимера беруть участь центральний і С-кінцевий домени TLR4 [4]. Активованій TLR4 ініціює внутрішньоклітинний сигнальний каскад. Це призводить до активації факторів транскрипції і подальшої експресії запальних цитокінів й активації вроджених імунних клітин, таких як макрофаги і дендритні клітини, що, в свою чергу, дає початок запальним та імунним реакціям.

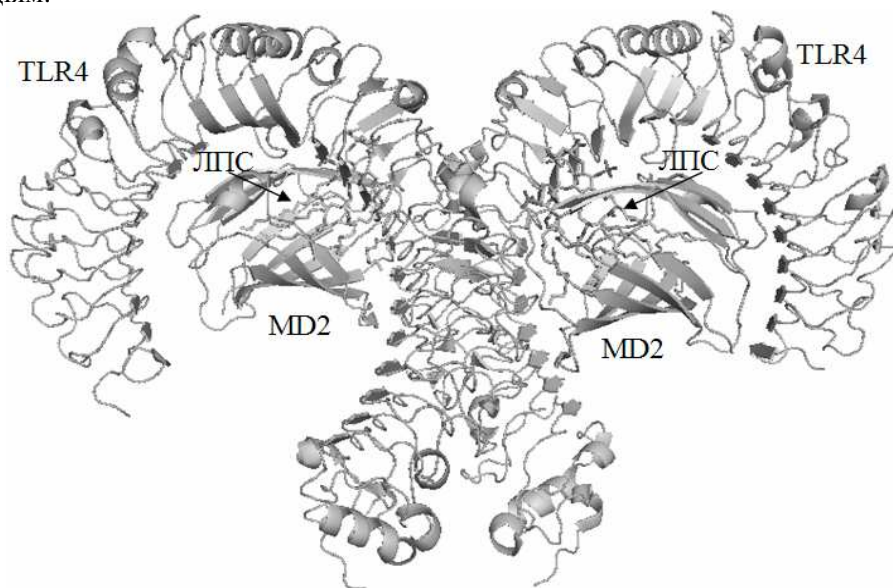


Рис. 2. Просторова структура комплексу (TLR4-MD-2-ЛПС)₂

Хоча ЛПС-індуковане виробництво прозапальних цитокінів ініціює захист від травм та інфекцій, порушення регуляції передачі сигналів TLR4 безпосередньо залучене у велику кількість гострих і хронічних захворювань людини, таких як сепсис і невропатичний біль [6; 17; 24]. Підвищена чутливість до інфекцій і різні імунні патології пов'язані або з надто низькою, або з надто високою активацією TLR4. Важливість TLR4 у запальних захворюваннях і ініціації імунної відповіді робить його ідеальною терапевтичною мішенню для потенційних медикаментозних втручань.

Аналіз досліджень цієї проблеми. Було розроблено і синтезовано декілька TLR4-активних сполук-антагоністів: Eritoran, TAK-242, берберин [10; 14; 17; 19]. Декілька структур потенційних антагоністів TLR4 запропоновано на основі проведення віртуального скринінгу [9]. TAK-242 являє собою похідне циклогексена, яке інгібує продукцію індукованих ЛПС медіаторів запалення через зв'язування з внутрішньоклітинним доменом TLR4 [19], тоді як Eritoran імітує структуру ліпідів і зв'язується з великою гідрофобною внутрішньою кишенею MD-2. Eritoran (або E5564) являє собою синтетичну молекулу, отриману зі структури ліпиду А непатогенних ЛПС з *Rhodobacter sphaeroides*, але на відміну від нього містить не 6, а 4 ліпідних ланцюги [7; 15; 17]. Кристалічна структура TLR4-MD-2 гомодимеру, зв'язаного з тетраацильованим антагоністом Eritoran показала, що всі ацильні ланцюги Eritoran розташовані в гідрофобній кишені MD-2; однак, на відміну від ліпиду А, Eritoran не може стимулювати димеризацію TLR4-MD-2 комплексу і активацію TLR4, тобто діючи як антагоніст [12].

Eritoran потужний ($IC_{50} = 1,5$ nM) нетоксичний TLR4 антагоніст, який людина добре переносить [16]. Він продемонстрував чудову дію *in vitro* і *in vivo* під час досліджень при введенні профілактично або на дуже ранній стадії «септичного каскаду», тоді як Eritoran виявився не в змозі забезпечити терапевтичний захист людей на пізній стадії септичних захворювань [3; 7; 11; 16]. Тому його доцільно використовувати для цілеспрямованої терапії на ранній стадії сепсису. Нещодавно показано, що Eritoran виявився ефективним під час лікування запального ушкодження очей на тваринних моде-

лях [5]. До того ж повідомлено, що терапевтичне введення Eritoran блокує грип-індуковану летальність у мишей, а також легеневі патології, клінічні симптоми, вироблення цитокінів і окислених фосфоліпідів, зменшує вірусні титри [22]. Таким чином, блокада сигналізації TLR4 являє собою новий терапевтичний підхід для запалення, пов'язаного з грипом, і, можливо, з іншими інфекціями. Ці результати підкреслюють нову терапевтичну корисність Eritoran, або для використання як монотерапії, або, що більш імовірно, як доповнення до протівірусних засобів. Отже, значення Eritoran у медицині не викликає сумніву, тому подальший пошук методів підвищення його біологічної активності актуальне. Саме цій меті і присвячено роботу.

Мета роботи – розробка нових потенційних інгібіторів TLR4 за допомогою методів комп'ютерного моделювання. Поставлені завдання: моделювання структур потенційних інгібіторів TLR4 на основі сполуки Eritoran (рис. 1 б); проведення молекулярного докінгу модельних сполук з рецепторним комплексом TLR4-MD-2; аналіз одержаних кластерів за структурою та енергією спорідненості досліджуваних лігандів до активного центру TLR4-MD-2.

Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження. Потенційно ефективні інгібітори TLR4 відшукували на основі Eritoran, який є активним інгібітором цього білка. Для проведення докінгових досліджень структуру ліганду Eritoran взято з бази даних сполук NCBI PubChem (сполука 6912404). Кристалографічну модель TLR4-MD-2-комплексу (рецептор) взято з бази даних Protein Data Bank під кодом 2Z65. Підготовку лігандів та рецептора для докінгу проведено за допомогою програми MGLTools. Для рецептор-орієнтованого докінгу, розрахунку спорідненості лігандів до білка використаний пакет програм AutoDock Vina [23]. Отримані методом молекулярного докінгу комплекси «ліганд-рецептор» оцінювали візуально і за величиною енергії зв'язування з TLR4-MD-2-комплексом. Для аналізу й візуалізації результатів дослідження використовували програму PyMOL Viewer.

Перший етап дослідження – це проведення докінгу Eritoran до TLR4-MD-2-комплексу. Місце зв'язування Eritoran з TLR4-MD-2-комплексом являє собою гідрофобну порожнину з амінокислотних залишків Ile46, Ile63, Tyr65, Leu87, Phe104, Ile117, Phe119, Phe121, Cys133, Phe151 (рис. 3). Водневий зв'язок формується з гідроксилом Ser120. Докінгові результати показали утворення кластеру TLR4-MD-2-Eritoran з енергією -6,1 ккал/моль. Розраховане способом молекулярного докінгу положення молекули Eritoran у кишені TLR4-MD-2-комплексу узгоджується з експериментальними даними [4]. Цей факт свідчить про добру здатність програми AutoDock Vina відтворювати взаємодію ліганд-білок.

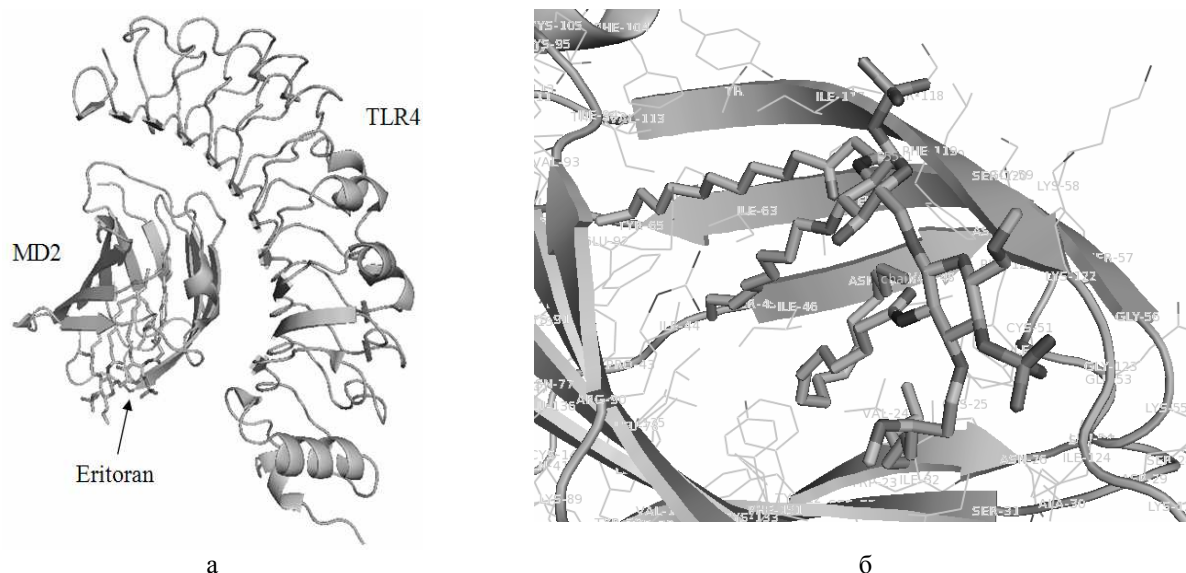
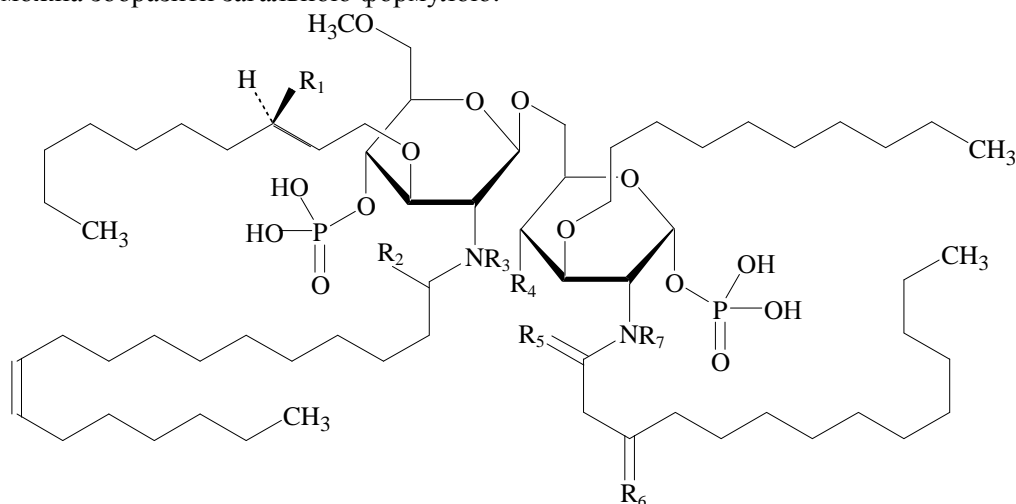


Рис. 3. Комплекс TLR4-MD-2-Eritoran: (а) загальний вигляд гетеродимеру; (б) розташування Eritoran у гідрофобній кишені MD-2

Подальший етап дослідження – моделювання структур сполук-лігандів, утворених способом заміни замісників у молекулі Eritoran, за допомогою програми PCModel. Оптимізацію структур

виконано у програмі Gaussian 09 методом PCM/B3LYP/6-31+G(d,p). Змодельовано 19 сполук, структуру яких можна зобразити загальною формулою:



Щоб знайти залежність інгібіторної активності сполук від їхньої структури, проведено молекулярний докінг сполук 1–19 до модельної мішені – TLR4-MD-2-комплексу. Структури змодельованих лігандів та результати дослідження їх спорідненості до TLR4-MD-2 подані в таблиці 1. Докінгові результати для деяких похідних Eritoran показали енергію утворення комплексу ліганд-білок -6,5...-7,1 ккал/моль, що свідчить про утворення більш міцних зв'язків цих сполук з TLR4-MD-2-комплексом, ніж Eritoran (-6,1 ккал/моль). Аналіз даних таблиці 1 дав підстави обрати п'ять сполук (4, 8, 16, 18, 19) з найбільшою спорідненістю до TLR4-MD-2. Енергетично найбільш вигідні структури характеризуються енергією утворення комплексу ліганд-білок у межах -6,8...-7,1 ккал/моль. За наведеними в таблиці 1 даними ліганди можна розмістити в ряд за збільшенням їх спорідненості до TLR4-MD-2-комплексу: 8 = 16 = 19 < 4 < 18.

Таблиця 1

Енергії спорідненості ліганду до активного центру TLR4-MD-2-комплексу (E, ккал/моль)

№ з/п	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	E, ккал/моль
1	OMe	O	H	OH	O	O	Me	-5,3
2	OMe	O	Me	OH	O	O	H	-5,3
3	OMe	O	H	NH ₂	O	O	H	-6,1
4	OMe	O	H	Cl	O	O	H	-6,9
5	OMe	O	H	CN	O	O	H	-5,9
6	OMe	O	H	OH	NH	O	H	-6,7
7	OMe	O	H	OH	O	NCH ₃	H	-6,7
8	OMe	OH	H	OH	O	O	H	-6,8
9	OMe	O	H	OH	OH	O	H	-5,7
10	OMe	O	H	OH	O	OH	H	-6,1
11	NH ₂	O	H	OH	O	O	H	-5,5
12	NO ₂	O	H	OH	O	O	H	-5,8
13	Cl	O	H	OH	O	O	H	-6,5
14	OMe	O	H	OH	S	O	H	-5,5
15	OCOCH ₃	O	H	OH	O	O	H	-5,9
16	SO ₃ H	O	H	OH	O	O	H	-6,8
17	SCH ₃	O	H	OH	O	O	H	-5,9
18	OMe	O	H	OH	NCH ₃	O	H	-7,1
19	OMe	O	H	OH	O	NH	H	-6,8

Аналіз структури одержаних за допомогою молекулярного докінгу комплексів ліганд-білок показав, що стабілізації досліджуваних сполук в активному центрі TLR4-MD-2 сприяє низка гідро-

фобних контактів і водневих зв'язків (рис. 4). Серед великої кількості гідрофобних контактів слід відзначити взаємодії між лігандами та амінокислотними залишками Ile46, Val48, Ile63, Tyr65, Phe46, Leu87, Asp99, Asp100, Asp101, Tyr102, Phe104, Ile117, Phe119, Phe121, Tyr131, Cys133, Val135, Phe147, Phe151, Ile152, Ile153. Сполуки (4, 8, 16, 18, 19) утворюють від 2 до 4 водневих зв'язків з серинами MD-2 кишені. Можливо, додаткове зв'язування між лігандом і білком обумовлює утворення енергетично більш стабільних комплексів. Найбільшу спорідненість до TLR4-MD-2-комплексу виявлено у сполуки 18 (-7,1 ккал/моль), яка утворена способом заміщення у молекулі Eritoran атома Оксигену на NCH₃ групу у положенні 5 (рис. 4).

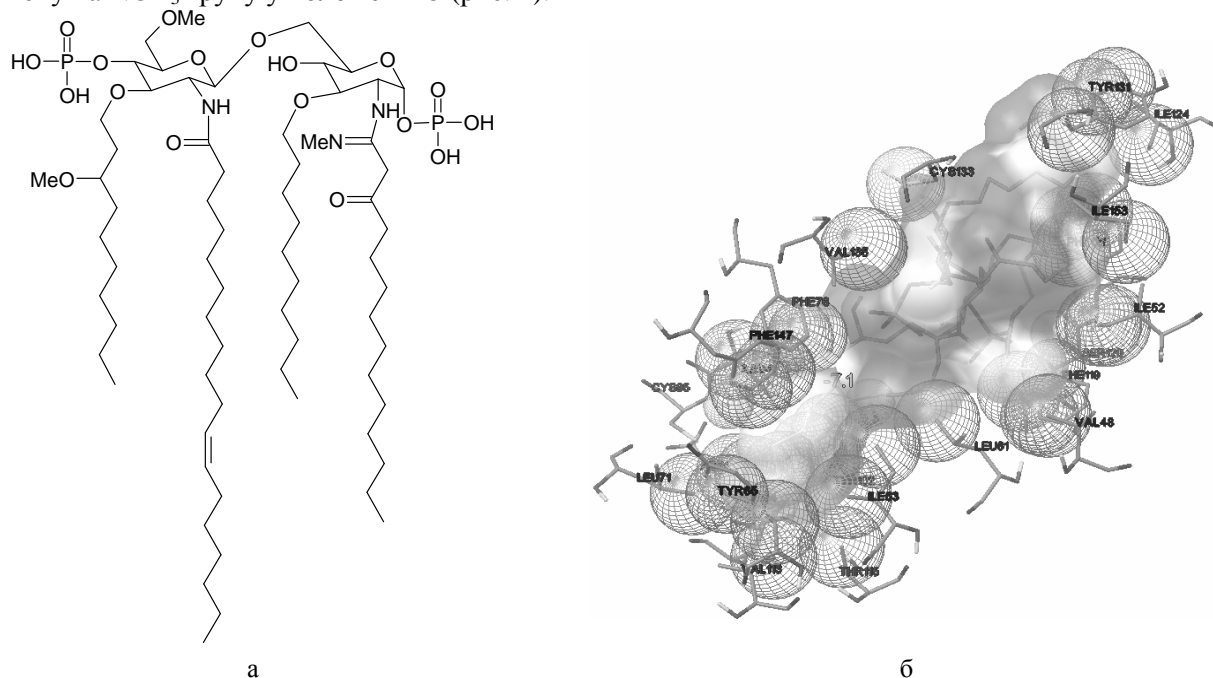


Рис. 4. Хімічна структура (а) та візуалізація результату докінгу сполуки 18 (б). Гідрофобні контакти зображені у вигляді сфер

Отже, запропоновані потенційно більш ефективні щодо інгібування TLR4-MD-2-комплексу структури (4, 8, 16, 18, 19) можна рекомендувати для подальшого клінічного дослідження. При цьому передбачається підтвердити високу активність і специфічність вибраних інгібіторів та вибрати ті, які не будуть виявляти токсичний вплив при застосуванні речовин як фармакологічних препаратів.

Висновки та перспективи подальшого дослідження. У роботі досліджено взаємодію TLR4-MD-2-комплексу із 19-ма сполуками, змодельованими на основі Eritoran. Ці ліганди взаємодіють з TLR4-MD-2-комплексом, головню, через утворення гідрофобних зв'язків. Показано, що варіювання замісників у молекулі Eritoran впливає на величину її спорідненості до білка. Запропоновано ряд сполук, які утворюють більш енергетично вигідні комплекси з білком, ніж Eritoran і є потенційно більш ефективними щодо інгібування TLR4-MD-2. Енергія спорідненості ліганд-білок для цих сполук коливається в межах від -6,8 до -7,1 ккал/моль. Додаткова стабілізація обумовлена утворенням більшої кількості зв'язків порівняно з комплексом TLR4-MD-2-Eritoran. Ці сполуки в подальшому можуть стати потенційними ефективними препаратами для профілактики та лікування запальних захворювань, ендотоксичного шоку й ендотоксикозу.

Джерела та література

1. Akira S. Pathogen recognition and innate immunity / S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi // Cell. – 2006. – Vol. 124, № 4. – P. 783–801.
2. Bauer S. Pattern recognition by Toll like receptors / S. Bauer, T. Muller, S. Hamm // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2009. – Vol. 653. – P. 15–34.
3. Cohen J. Sepsis studies need new direction / J. Cohen, S. Opal, T. Calandra // Lancet Infect. Dis. – 2012. – Vol. 12. – P. 503–505.
4. Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran / H. M. Kim, B. S. Park, J.-I. Kim [et all.] // Cell. – 2007. – Vol. 130. – P. 906–917.

5. Effect of the Toll-Like Receptor 4 Antagonist Eritoran on Retinochoroidal Inflammatory Damage in a Rat Model of Endotoxin-Induced Inflammation / F. Ekici, E. E. Karaca, F. Korkmaz [et al.] // *Mediators of Inflammation*. – 2014. – Vol. 2014. – Article ID 643525.
6. Guo L. The innate immunity of the central nervous system in chronic pain: The role of Toll-like receptors / L. Guo, H. Schluesener // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2007. – Vol. 64. – P. 1128–1136.
7. Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist / M. Mullarkey, J. R. Rose, J. Bristol [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2003. – Vol. 304. – P. 1093–1102.
8. Kawai T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // *Nature Immunology*. – 2010. – Vol. 11, № 5. – P. 373–384.
9. Novel Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Antagonists Identified by Structure- and Ligand-Based Virtual Screening / U. Svajger, B. Brus, S. Turk [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2013. – Vol. 70. – P. 393–399.
10. Peri F. Toll-like Receptor 4 (TLR4) Modulation by Synthetic and Natural Compounds: An Update / F. Peri, V. Calabrese // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 57. – P. 3612–3622.
11. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a Toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis / M. Tidswell, W. Tillis, S. P. Larosa [et al.] // *Crit. Care Med.* – 2010. – Vol. 38. – P. 72–83.
12. Purified monomeric ligand MD-2 complexes reveal molecular and structural requirements for activation and antagonism of TLR4 by Gram-negative bacterial endotoxins / T. L. Gioannini, A. Teghanemt, D. Zhang [et al.] // *Immunol. Res.* – 2014. – DOI 10.1007/s12026-014-8543-y.
13. Raetz C. R. Lipopolysaccharide endotoxins / C. R. Raetz, C. Whitfield // *Annu. Rev. Biochem.* – 2002. – Vol. 71. – P. 635–700.
14. Role of berberine in anti-bacterial as a high-affinity LPS antagonist binding to TLR4/MD-2 receptor // M. Chu, R. Ding, Z. Chu [et al.] // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2014. – Vol. 14, № 89. – P. 1–9.
15. Rossignol D. P. TLR4 antagonists for endotoxemia and beyond / D. P. Rossignol, M. Lynn // *Curr. Opin. Investig. Drugs*. – 2005. – Vol. 6. – P. 496–502.
16. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of E5564, a lipid A antagonist, during an ascending single-dose clinical study / Y. N. Wong, D. Rossignol, J. R. Rose [et al.] // *J. Clin. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 43, № 7. – P. 735–742.
17. Savva A. Targeting Toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases / A. Savva, T. Roger // *Frontiers in Immunology*. – 2013. – Vol. 4. – Article 387.
18. Scior T. Reviewing and identifying amino acids of human, murine, canine and equine TLR4/MD-2 receptor complexes conferring endotoxic innate immunity activation by LPS/lipid A, or antagonistic effects by Eritoran, in contrast to species-dependent modulation by lipid IVa / T. Scior, C. Alexander, U. Zaehring // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2013. – Vol. 5. – e201302012.
19. TAK-242 (Resatorvid), a Small-Molecule Inhibitor of Toll-Like Receptor (TLR) 4 Signaling, Binds Selectively to TLR4 and Interferes with Interactions between TLR4 and Its Adaptor Molecules / N. Matsunaga, N. Tsuchimori, T. Matsumoto [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 79. – P. 34–41.
20. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide / C. E. Bryant, D. R. Spring, V. Gangloff [et al.] // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010. – Vol. 8, № 1. – P. 8–14.
21. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex / B. S. Park, D. H. Song, H. M. Kim [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 458. – P. 1191–1196.
22. The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection / K. A. Shirey, W. Lai, A. J. Scott [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 497, № 7450. – P. 498–502.
23. Trott O. AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading / O. Trott, A. J. Olson // *Journal of Computational Chemistry*. – 2010. – № 31. – P. 455–461.
24. Wittebole X. Toll-like Receptor 4 Modulation as a Strategy to Treat Sepsis / X. Wittebole, D. Castanares-Zapatero, P. F. Laterre // *Mediators Inflamm.* – 2010. – Article ID 568396.

Подгорная Алина, Терещенко Оксана, Святенко Людмила. Разработка структур потенциальных ингибиторов Toll-подобных рецепторов. Рецепторный комплекс Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) / миелоидный фактор дифференцировки 2 (MD-2) распознает липополисахарид (ЛПС) из грамотрицательных бактерий. Активация TLR4 вызванная ЛПС с последующей выработкой цитокинов может привести к опасным для жизни синдромам, таким как сепсис и септический шок, если воспалительная реакция усилена и неконтролируема. Синтетическое соединение Eritoran является аналогом ЛПС и антагонистом TLR4. Поиск эффективных ингибиторов TLR4-MD-2-комплекса проведен с использованием молекулярного докинга, который становится все более важным методом в области разработки лекарственных веществ. Докинг TLR4-MD-2-комплекса

с соединениями, которые смоделированы на основе Eritoran, выявил ряд потенциально более эффективных ингибиторов этого комплекса, чем Eritoran, в связи с их большим сродством к TLR4-MD-2 из-за дополнительного связывания в гидрофобной полости.

Ключевые слова: Toll-подобные рецепторы, липополисахарид, ингибитор, Eritoran, молекулярный докинг.

Pidhorna Alina, Tereshchenko Oksana, Sviatenko Lyudmila. Development of Structures of Potential Toll-like Receptors' Inhibitors. Toll-like receptor 4 (TLR4) / myeloid differentiation factor 2 (MD-2) receptor complex recognizes lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria. TLR4 activation caused by LPS with subsequent cytokine production can lead to life-threatening syndromes such as sepsis and septic shock if the inflammatory response is amplified and uncontrolled. Eritoran is an analog of LPS that antagonizes its activity by binding to the TLR4-MD-2 complex. A search for effective inhibitors of TLR4-MD-2-complex was performed using molecular docking, which has become increasingly important method in drugs discovery area. Docking of TLR4-MD-2-complex with compounds, which are modeled on the basis of Eritoran, revealed a number of potentially more effective inhibitors of this complex than Eritoran, due to their greater affinity to TLR4-MD-2 through additional binding in the hydrophobic pocket.

Key words: Toll-like receptors, lipopolysaccharide, inhibitor, Eritoran, molecular docking.

Кіровоградський державний педагогічний
університет імені Володимира Винниченка

Стаття надійшла до редколегії
20.04.2014 р.