

©Борисов, Веселовский

КИНЕТИКА СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДА С РЕЦЕПТОРОМ В РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВ

Д.В. Борисов, А.В. Веселовский*

Институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: veselov@ibmh.msk.su

Традиционно термодинамические величины аффинности рассматривают как критерии при разработке новых лекарственных препаратов. В большинстве случаев эти величины измеряются в системах *in vitro* при постоянных концентрациях рецептора и лиганда, что сильно отличается от условий, в которых действует лекарство *in vivo*. Исследования последних лет показали, что при оценке эффективности лекарственного средства кинетика процесса связывания лекарственного средства с рецептором может быть столь же важной, как аффинность. Это привело к растущему интересу к определению констант скорости ассоциации и диссоциации комплексов рецептор-лиганд на этапе доклинических исследований кандидатов в лекарства. Лекарственное средство с более длительным временем удержания может кинетически “выбирать” один рецептор по сравнению с другим, действовать при низкой концентрации в организме. В работе рассмотрены теоретические основы связывания белок-лиганд, молекулярные детерминанты, контролирующие кинетику связывания лекарственного средства-рецептор. Понимание молекулярных особенностей, лежащих в основе кинетики связывания рецептор-белок, будет способствовать рациональному конструированию лекарств с заданными свойствами.

Ключевые слова: кинетика; термодинамика; константа связывания; время удержания; константа скорости; комплекс белок-лиганд

DOI: 10.18097/PBMC20206601042

ВВЕДЕНИЕ

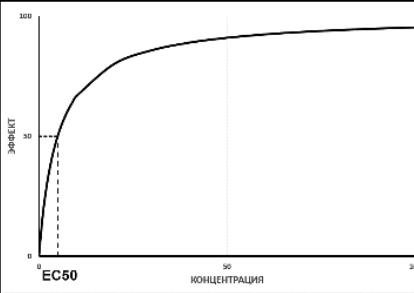
Разработка новых лекарственных препаратов является сложным длительным процессом с высоким риском неудач. Несмотря на достигнутые в последние годы успехи в понимании механизмов действия лекарств, их поведения в организме, причин развития побочных эффектов, только 10% кандидатов в лекарства получают разрешение на использование в клинике [1]. Основной причиной неудач при разработке новых лекарственных препаратов является их низкая эффективность *in vivo* или недостаточность терапевтического индекса (ключевой показатель безопасности лекарственного средства, определяемый как отношение токсической дозы лекарственного средства к его эффективной дозе), обусловленная слабым взаимодействием с мишенью или сопутствующим связыванием лекарственного средства (ЛС) с другими (нецелевыми) рецепторами [2-4]. Одной из причин этого является неспособность прогнозировать эффективность действия вещества в организме, основываясь на данных, полученных *in vitro*. Детальное понимание механизма взаимодействия ЛС с мишенями в организме должно способствовать более эффективной разработке новых лекарств.

В настоящее время основным критерием при разработке новых лекарственных препаратов являются величины аффинности, которые описывают насколько прочно лиганд взаимодействует со своей мишенью [5-9]. Важность этого критерия основана на представлении, что ЛС должно обладать большим сродством к мишени, обеспечивающим успешную конкуренцию с природным субстратом (эндогенным лигандом). При скрининге соединений и их дальнейшей

оптимизации в качестве основных показателей эффективности лекарственного средства обычно используются термодинамические константы равновесия, такие как концентрация, вызывающая 50% ингибирование (IC_{50}), полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}), равновесная константа ингибирования (K_i) или, наиболее корректная, равновесная константа диссоциации (K_d) (табл. 1). В большинстве случаев эти величины измеряются в системах *in vitro*. В таких закрытых термодинамических системах лиганд и мишень находятся при постоянных концентрациях и других условиях во время измерения [10-13]. Однако условия, в которых действует лекарство *in vivo*, сильно отличаются от условий, в которых измеряются величины аффинности.

Эффективность действия лекарств *in vivo* зависит не только от их аффинности к мишеням, но и от того, насколько легко они “попадают” в цель и как долго они находятся в ней. В последние годы становится всё более популярной концепция, что фармакологическая активность проявляется только тогда, когда ЛС остаётся связанным с мишенью [13, 14]. Как только лекарство отделяется (диссоциирует) от своей мишени, эта макромолекула-мишень становится свободна для возобновления своей (пато)физиологической функции. В связи с этим резко возрос интерес к кинетике процесса связывания белок-лиганд и особенно к процессу диссоциации и, соответственно, ко времени пребывания лиганда в комплексе с рецептором. В ряде исследований было показано, что эффективность препарата лучше коррелирует с константой скорости диссоциации, чем с константой диссоциации (K_d) [12, 15-21]. Было показано, что кинетическое поведение ЛС

Таблица 1. Величины для оценки связывания белка с лигандом

Константа диссоциации (K_d)	$K_d = \frac{[R][L]}{[RL]} = \frac{1}{K_a} = \frac{k_d}{k_a}$	Измеряется в равновесных условиях
Константа ингибирования (K_i)	$V_o = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$	K_i соответствует K_d для конкурентного ингибирования
Концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50})	$[IC_{50}] = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)$	Зависит от концентрации субстрата
Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50})		Используется при исследовании действия на клетку или организм
Относительная аффинность (RBA)	$RBA = \frac{A_{test}}{A_{standard}}$	За стандарт принимается величина эффекта хорошо известного соединения

по отношению к его белку-мишени может влиять на селективность [22], безопасность ЛС и его терапевтический индекс [23].

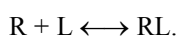
Опыт последних десятилетий привёл исследователей к осознанию того, что кинетические свойства препарата-кандидата, а именно то, как быстро лекарство связывается с сайтом связывания и как долго он там находится, так же важны, как и его термодинамические свойства [10, 11, 20, 24]. Понимание роли кинетики связывания в эффективности действия лекарств в организме привело к созданию академико-коммерческого партнерства K4DD (kinetics for drug discovery, <http://www.k4dd.eu/>), которое было поддержано программой Europe's Innovative Medicines Initiative (IMI) и включало ряд академических институтов и всех фармацевтических гигантов [25, 26].

В данной работе взаимодействия мишень-лиганд будут рассмотрены на примере системы “белок-низкомолекулярное соединение”.

1. ТЕРМОДИНАМИКА И КИНЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИШЕНЬ-ЛИГАНД

Образование комплекса мишень-лиганд происходит потому, что комплекс является более термодинамически стабильным, чем свободные, несвязанные компоненты; таким образом, термодинамика обеспечивает движущую силу для образования комплекса.

В простейшем случае процесс связывания мишени с лигандом может быть описан моделью типа “ключ-замок”, каждый из двух компонентов которой может находиться в свободном и связанном состоянии:



Механизм комплексообразования включает в себя один элементарный этап – связывание

лиганда с рецептором без каких-либо промежуточных состояний; аффинность связывания описывается константой диссоциации K_d , которая является отношением концентраций реагентов в равновесном состоянии:

$$K_d = \frac{[R][L]}{[RL]}.$$

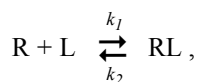
В равновесии K_d соответствует концентрации лиганда, при которой занята половина сайтов связывания мишени, и это напрямую связано с разницей свободной энергии между связанным и несвязанным состояниями (ΔG) через соотношение:

$$\Delta G = -RT \ln K_d,$$

где R – газовая постоянная, T – температура.

Однако значение константы диссоциации, которое описывает связывание, не даёт информации о скорости, с которой комплекс образуется и разрушается.

Кинетика связывания лиганда с мишенью определяется через кинетику полуреакций. Распад и образование комплекса можно записать как:



где k_1 – константа скорости прямой реакции, k_2 – константа скорости обратной реакции.

Образование комплекса зависит от скорости, с которой он образуется при ассоциации реагентов ($k_{on}[R][L]$, где k_{on} – константа скорости ассоциации) и скорости, с которой комплекс распадается ($k_{off}[RL]$, где k_{off} – константа скорости диссоциации). $[R]$, $[L]$ и $[RL]$ представляют молярные концентрации рецептора, лиганда и комплекса соответственно; они не меняются, когда система находится в равновесии. Прямой процесс ассоциации молекул –

процесс второго порядка. Обратный процесс (диссоциации) является процессом первого порядка, и скорость процесса зависит только от концентрации бинарного комплекса и не зависит от концентраций общего или свободного рецептора и лиганда. Константа диссоциации определяется как:

$$K_d = k_{on}/k_{off}.$$

Из уравнений видно, что константа диссоциации – это отношение двух констант скорости. Следовательно, даже если два ЛС имеют одинаковую аффинность связывания с целевым белком, кинетика связывания может значительно отличаться. Аффинность связывания может быть изменена или через изменение скорости ассоциации, или через изменение скорости диссоциации, причём эти скорости теоретически могут не зависеть друг от друга.

Величины скорости образования (k_{on}) и распада (k_{off}) комплексов контролируются разницей в свободной энергии между соответствующими основными и переходными состояниями. На рисунке 1 приведены зависимости свободной энергии от координаты реакции для двух систем с одинаковой аффинностью. Несмотря на одинаковую аффинность, энергетические барьеры для процессов ассоциации и диссоциации различны, что приводит к различным значениям k_{on} и k_{off} для этих систем.

В реальных системах белок-лиганд профиль свободной энергии связывания намного сложнее, чем модель с одним барьером. Во-первых, это происходит из-за сложных конформационных изменений, внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий, эффектов растворителя и изменений энтропии, вовлечённых в пути ассоциации/диссоциации.

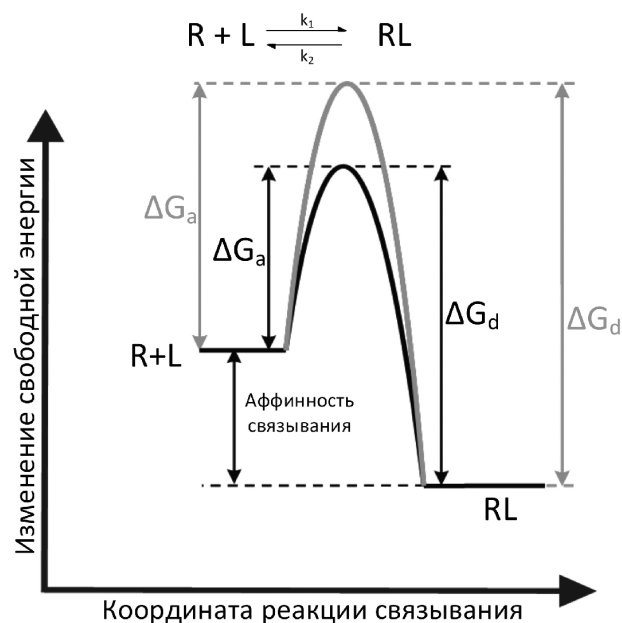


Рисунок 1. Профиль свободной энергии от координаты реакции для лигандов с быстрым (чёрный) и медленным (серый) связыванием. ΔG_a – энергия активации процесса ассоциации, ΔG_d – энергия активации процесса диссоциации.

Они изменяют профиль свободной энергии, вводя множество небольших барьеров (которые могут быть преодолены энергиями тепловых колебаний), а не один доминирующий непреодолимо высокий барьер. Во-вторых, профиль свободной энергии может создать ряд метастабильных промежуточных состояний, которые, в свою очередь, могут способствовать медленной кинетике с постоянными переходами назад и вперёд. Из-за этого k_{on} и k_{off} являются суммой сложной сети переходов между множественными конформационными минимумами, которая требует более сложного описания, чем модель с двумя состояниями.

Из соотношения $K_d = k_{on}/k_{off}$ следует, что свободные энергии несвязанных и связанных состояний и переходного состояния (на рисунке 1 ему соответствует барьер между несвязанным и связанным состояниями – этап начала образования комплекса) могут изменяться независимо друг от друга. Дестабилизация только переходного состояния уменьшает обе скорости без изменения сродства; и наоборот, стабилизация переходного состояния увеличивает скорости. Дестабилизация связанного состояния уменьшает аффинность и увеличивает скорость диссоциации без изменения скорости образования комплекса, тогда как изменение энергии несвязанного состояния влияет только на скорость связывания и аффинность. Лиганды с низкой скоростью ассоциации всегда будут иметь низкую скорость диссоциации [27]. Изменения в k_{off} могут привести к отсутствию влияния на K_d , если есть компенсационные изменения в k_{on} . Так, например, два стереоизомера ингибитора пролилэндопептидазы имеют одинаковую величину K_d , но обладают различными величинами k_{on} и k_{off} [29]. В этом случае оценка только величины аффинности не позволяет выбрать наиболее оптимальный лиганд. Таким образом, оценка перспективности новых лигандов, основанная на определении k_{on} и k_{off} , может быть более надёжной, чем основанная только на величине аффинности.

Очень часто для оценки скорости распада комплекса используют такие параметры, как время удержания (BU, residence time), определяемое как:

$$\tau = 1/k_{off},$$

и период полураспада комплекса: $t_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$.

Например, в простом механизме с двумя состояниями (связанным и несвязанным) ЛС, аффинность которого находится в наномолярном диапазоне концентраций и которое связывается с максимальной скоростью диффузионного ограничения ($k_{on} = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), ВУ будет $\sim 1 \text{ с}$.

Профили свободной энергии на рисунке 1 показывают, что константы скорости, управляющие временем жизни комплекса мишень-лиганд, зависят от относительных свободных энергий основного и переходных состояний в системе координат реакции. Увеличение ВУ будет происходить за счёт комбинации факторов, которые приводят к уменьшению k_{off} , и эти изменения могут даже включать снижение аффинности комплекса мишень-лиганд.

Так, для ряда ингибиторов еноил-АСР-редуктазы (FabI) (фермент, участвующий в синтезе миколовых кислот – компонента клеточной стенки микобактерий, мишень для антитуберкулезных препаратов) было показано, что соединение может иметь более высокую свободную энергию для конечного комплекса, но и более длительное ВУ, которое достигается за счёт большого увеличения свободной энергии переходного состояния [29-31].

В последнее десятилетие накопилось много данных о том, что кинетика связывания мишеней и их лигандов может сильно влиять на фармакологические свойства соединений, и кинетические константы могут лучше отражать поведение лекарств в организме с его постоянно меняющимися условиями [12, 20, 32]. В результате в проектах по поиску и разработке новых лекарственных препаратов всё чаще стали определять, наравне с термодинамическими, и кинетические параметры. Основное внимание при этом уделяется параметру ВУ, свойствам которого и будет посвящён следующий раздел.

2. СВОЙСТВА ВРЕМЕНИ УДЕРЖАНИЯ

Время удержания – величина обратная константе скорости, с которой лиганд диссоциирует от мишени ($1/k_{off}$), – является неравновесным внутренним параметром, характеризующим комплекс мишень-лиганд [10].

2.1. Кинетическая селективность

Селективность является относительной способностью ЛС взаимодействовать с выбранной мишенью по сравнению с макромолекулами, не являющимися мишенями, она несёт ценную информацию о потенциальной возможности нежелательных побочных эффектов. Традиционно селективность ЛС по отношению к его предполагаемой мишени определяется как соотношение значений IC_{50} или K_d для нецелевого связывания по сравнению с таковым для связывания с предполагаемой мишенью. Это определение селективности фактически является термодинамической селективностью, поскольку оно основано на экспериментах по связыванию в условиях равновесия (например, определению значений IC_{50}). В таких случаях возможность определять селективность зависит как от знания возможных нецелевых белков, так и от их доступности для проведения измерений. В частности, в программах по разработке ингибиторов киназ обычно исследуется панель киназ для оценки селективности новых соединений и возможных побочных эффектов [33-35]. Поскольку аффинность определяется из концентраций мишени, лиганда и их комплекса, то в реальных условиях *in vivo*, когда лекарство в организм поступает дозированно, термодинамическая селективность, в действительности, может зависеть от времени между дозами.

Соединение может иметь одинаковую аффинность к двум белкам, но различаться по скоростям связывания и диссоциации, поэтому оценки

селективности на основе аффинности могут не дать представления о поведении лиганда *in vivo*. Лиганд из-за его различий в кинетике связывания с разными белками может иметь величину ВУ на них, различающуюся на несколько порядков. В результате лиганд, связывающийся с мишенью с большой величиной ВУ, будет долгое время находиться в комплексе и оказывать свой терапевтический эффект, тогда как комплекс с другой мишенью, обладающей меньшей величиной ВУ, быстро распадётся, и исходная мишень окажется в свободном состоянии и сможет проявлять свой (пато)физиологический эффект. Эта особенность поведения лигандов в комплексах с разными мишенями получила название кинетической селективности. Следует отметить, что кинетическая селективность может существовать даже в отсутствии термодинамической селективности [36-41].

Кинетическая селективность может способствовать увеличению безопасности лекарств. ЛС с высоким значением ВУ для целевой мишени должны обладать большим терапевтическим индексом, поскольку для таких соединений возможно снижение дозы для достижения такого же фармакологического эффекта. Если лекарство демонстрирует длительное ВУ на предполагаемой мишени, которое превышает его фармакокинетическое время жизни в кровотоке, то селективность для предполагаемой мишени, интегрированная в промежуток времени между дозами, может быть очень большой. Эта повышенная селективность может обеспечить значительное преимущество в плане безопасности лекарств с длительным применением.

2.2. Время удержания не зависит от концентрации лиганда

В организме концентрация ЛС, доступного для взаимодействия с мишенью, может постоянно меняться из-за различных физиологических процессов. Такие процессы включают абсорбцию ЛС в желудочно-кишечном тракте, его метаболизм в печени, распределение в тканях и др. [42]. Поэтому, равновесные константы взаимодействий мишень-лиганд могут неверно отражать взаимодействие в открытых неравновесных условиях *in vivo*. Диссоциация лиганда из бинарного комплекса мишень-лиганд представляет собой мономолекулярный процесс и зависит только от времени и концентрации бинарного комплекса. Таким образом, в отличие от термодинамических констант, величина ВУ не зависит от концентрации свободного лиганда в системе, а определяется только свойствами самого комплекса. Так же на величину ВУ не влияет наличие в среде природного лиганда. Концентрация комплекса мишень-лиганд после удаления лиганда из среды снижается по экспоненциальному закону. В результате, за время, равное ВУ, концентрация комплекса мишень-лиганд снижается на 63% (рис. 2). Более интуитивно понятный параметр, который уже упоминался выше, – период полураспада комплекса ($t_{1/2}$), показывающий время, за которое распадётся половина комплексов [43].

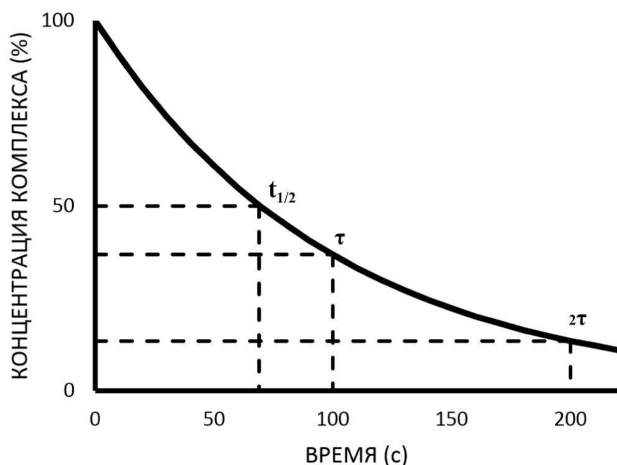


Рисунок 2. Изменение концентрации комплекса белок-лиганд в ходе диссоциации. График построен при параметрах: начальная концентрация комплекса – 100 нМ, $k_{off} = 10^{-2} \text{ с}^{-1}$. Изменение концентрации комплекса описывается уравнением $C(t) = C(0) \times e^{-k_{off}t}$.

2.3. Лиганд может оказывать фармакологическое действие, когда его “нет” в организме

С предыдущим свойством ВУ связана ещё одна интересная особенность. В организме может возникать ситуация, когда свободная концентрация лекарства с большим ВУ уже упала ниже K_d , но значительная популяция рецепторов все ещё будет занята лекарственным средством, а фармакологический эффект будет сохраняться. Если время пребывания лиганда на его мишени превышает фармакокинетический период его полувыведения из системного кровообращения, то лиганд всё ещё присутствует на мишени и оказывает своё фармакологическое действие, тогда как его основная часть уже выведена из организма [10, 11, 43]. В настоящее время описан ряд примеров лекарств с длительным ВУ, которые демонстрируют эту фармакокинетическую и фармакодинамическую временную связь [10, 11, 20]. Так, для финастерида (Finasteride, прочносвязанный ингибитор 5 α -редуктазы, который блокирует продукцию дегидротестостерона из тестостерона и используется в клинике для лечения аденомы простаты) было показано, что при однократном введении его концентрация в плазме через сутки снижается до очень низких величин (период полувыведения составляет 4,7–7,1 ч), тогда как значимый фармакологический эффект сохраняется более трёх суток [44]. Такая способность поддерживать длительную фармакодинамику после выведения большого количества лекарственного средства из организма может обеспечить важные преимущества с точки зрения удобства режима дозирования для пациентов и предотвращения опосредованных токсических эффектов [10-12].

2.4. Преодоление лекарственной резистентности

Ещё одним преимуществом соединений с большим ВУ может быть способность таких соединений препятствовать развитию лекарственной

резистентности, вызванной точечными мутациями. Даже если точечная мутация и приводит к снижению ВУ в несколько раз, такое лекарство ещё будет сохранять способность эффективно блокировать свою мишень. Например, для ингибитора протеазы ВИЧ дарунавира (darunavir), который имеет ВУ для фермента дикого типа >240 ч, было показано, что мутации, уменьшающие его ВУ в тысячу раз, не приводят к ослаблению антивирусной активности этого лекарства [45].

2.5. Взаимосвязь K_d , k_{on} и k_{off}

Как уже было отмечено выше, величины k_{on} и k_{off} могут изменяться независимо друг от друга, давая весь спектр величин K_d . Однако, по данным ряда исследований, при связывании высокоэффективных лигандов с рецепторами значение k_{on} меняется незначительно в ряду серии лигандов с общим скелетом (гомологичные соединения) при взаимодействии с общим рецептором, или наоборот, для одного лиганда, взаимодействующего с рецепторами с близкой структурой [14, 27, 29]. В таких случаях различия в величинах K_d в основном определяются значениями k_{off} . Так, в исследованиях по связыванию саквинавира (saquinavir) с протеазой ВИЧ-1 дикого типа и с мутантами, обладающими лекарственной резистентностью, было показано, что значения k_{on} для саквинавира варьировались только в два раза для всех изученных ферментов, тогда как величины k_{off} (и, следовательно, ВУ) изменялись в пределах нескольких порядков и хорошо коррелировали со значениями K_i и IC_{50} для репликации вируса [46]. Схожие результаты были получены для взаимодействия биотина со стрептавидином и его мутантными формами [47]. Для серии гомологичных ингибиторов протеин-метилтрансферазы DOT1L было обнаружено, что при их связывании с ферментом величина k_{on} практически не меняется, а основной вклад в изменение величины K_d оказывает величина k_{off} [48]. Однако из вышесказанного не следует считать, что только k_{off} определяет эффективность связывания соединений. В частности, для обратной транскриптазы ВИЧ было показано, что мутация Lys103Asn приводит к изменению структуры входа в аллостерический сайт, в результате чего нуклеозидные ингибиторы этого фермента хуже входят в этот сайт, то есть данная мутация влияет на k_{on} [49-51]. Схожий механизм был предположен для входа лигандов в активный центр цитохрома P450 1A2 [52].

Для описания взаимосвязи этих трёх констант часто используется представление результатов в виде кинетической карты, на которой на осях откладывают величины k_{on} и k_{off} [53] (рис. 3). На ней отчётливо видно, что соединения с одинаковой аффинностью могут иметь кинетические параметры, отличающиеся на несколько порядков.

Таким образом, следует подчеркнуть, что для адекватного описания процесса взаимодействия белок-лиганд необходимо измерение всех трёх констант.

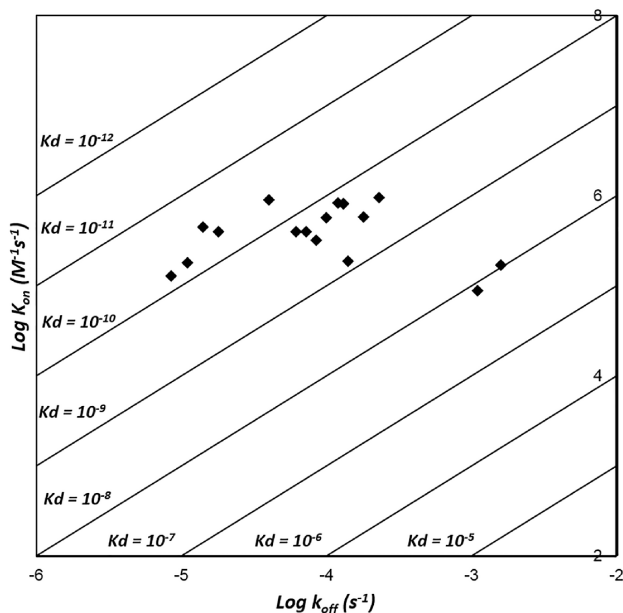


Рисунок 3. Кинетическая карта, построенная по результатам [54]. Величины K_d – параллельные диагональные линии. Точками показаны значения k_{on} и k_{off} для агонистов рецептора аденозина A_3 .

2.6. Роль k_{on} в связывании лиганда в клетке

В настоящее время основное внимание уделяют скорости распада комплекса (или ВУ), но скорость образования комплекса так же важна и может вносить существенный вклад в фармакологическое действие и даже быть фактором, определяющим аффинность [42, 54-57]. В частности, за счёт явления повторного связывания (drug rebinding) [14, 58], когда соединение с высокой скоростью ассоциации, которое диссоциировало от мишени, успевает повторно связаться с ней.

Высокая величина k_{on} может способствовать более быстрому началу действия лекарств [59]. Это может представлять интерес для лекарственных препаратов для быстрого (экстренного) облегчения симптомов и может улучшить соблюдение пациентом режима приема лекарств [60, 61]. Примером лекарств, для которых полезной особенностью является быстрое связывание, могут быть ингибиторы тромбина, используемые для предотвращения тромбозов [62].

3. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ВЕЛИЧИНЫ k_{on} И k_{off}

О молекулярных детерминантах, определяющих кинетику связывания, известно гораздо меньше, чем для аффинности связывания. Основная проблема с кинетикой – трудность в характеристике переходных состояний. Сродство связывания зависит от разницы в свободной энергии между связанным и несвязанным состояниями, каждое из которых является стабильным и обычно легко наблюдаемым. Скорости образования и распада комплексов зависят от величины барьера свободной энергии, разделяющего эти состояния. Однако взаиморасположение и конформации лиганда и белка в точке с самой высокой свободной энергией (переходное состояние) обычно неизвестно, поскольку

существует только кратковременно. Таким образом, понимание молекулярных взаимодействий между белком и лигандом в переходном состоянии имеет центральное значение для рационального контроля кинетики связывания лиганда [22, 40, 63].

Рентгеноструктурный (РСА) анализ или ЯМР-спектроскопия позволяют определить структуры основного состояния, тогда как переходные состояния остаются в основном неизвестны. Для их выявления используют методы молекулярного моделирования [64]. Другим подходом является анализ молекулярных свойств лигандов, которые коррелируют с ВУ, и исследование изменения конформации мишени (полученных РСА) в комплексах с лигандами, имеющих разное ВУ.

В качестве основных факторов, влияющих на кинетические параметры, обычно рассматривают молекулярную массу, липофильность, электростатические взаимодействия и конформационные переходы [65-67].

3.1. Доступность места связывания и размер лиганда

Одним из основных факторов, увеличивающих ВУ в комплексе рецептор-лиганд, является высокая молекулярная масса последнего. В ряде исследований, основанных на больших выборках лигандов GPCR (рецепторы, сопряжённые с G-белками), протеинкиназ и других ферментов было показано, что соединения с более высокой молекулярной массой характеризуются тенденцией иметь более низкую скорость диссоциации, то есть более длительное ВУ, независимо от связанных с ним факторов, таких как гидрофобность [65, 66]. Для величины гидрофобности, которая хорошо коррелирует с размером молекул, так же выявлена тенденция увеличения ВУ с возрастанием величины гидрофобности (clogP) [65].

Скорость связывания ЛС должна регулироваться и доступностью места связывания в белке для лиганда. Затруднённый вход и выход лиганда (например, через входные ворота в место связывания, заглубленного в полости белка) должен обуславливать более медленные k_{on} и k_{off} , чем для более открытого места связывания. Например, мутации, влияющие на структуру входа в активный центр фермента, могут серьёзно влиять на скорость транспорта лиганда в него [49-52].

Однако в таких исследованиях очень трудно разделить детерминанты, ответственные за k_{off} и K_d (которая является k_{off}/k_{on}). Корреляция ВУ с молекулярной массой может отражать либо известную корреляцию молекулярной массы с аффинностью (стабилизацию в связанном состоянии), либо корреляцию с высотой барьера (дестабилизацию переходного состояния).

3.2. Электростатическое взаимодействие

Электростатические взаимодействия между заряженным лигандом и заряженным рецептором влияют как на скорость ассоциации, так и на скорость диссоциации. Увеличение ионной силы раствора

(экранирующие заряды) обычно уменьшает скорости связывания, но почти не влияет на скорости диссоциации [68]. На больших расстояниях электростатическое взаимодействие влияет на скорость связывания за счёт предориентации молекул и их притяжения (или отталкивания). Скорости распада комплекса так же могут быть модулированы электростатикой, но, как правило, это происходит на коротких расстояниях за счёт образования солевых мостиков, водородных связей, π -ионных взаимодействий [68-71]. Например, связывание ингибитора ацетилхолинэстеразы, в структуре которого была заряженная группа, происходило в 50 раз быстрее, а диссоциация – в 10 раз медленнее, чем связывание почти идентичного аналога без заряженной группы [72]. При этом в литературе описаны и значительные отклонения в зависимости скорости связывания от величины заряда [73, 74].

3.3. Роль воды

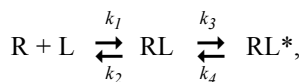
В настоящее время установлено, что движение воды в месте связывания может серьезно влиять на кинетику взаимодействия белок-лиганд [63, 75-80]. На больших расстояниях движение воды из гидрофобных областей места связывания может препятствовать проникновению лиганда в место связывания, снижая k_{on} [63, 79, 81]. При этом происходит вытеснение связанной с мишенью воды из места связывания. Эта стадия дегидратации создаёт энергетический барьер при связывании лиганда. Гидрофобные заместители лигандов должны легче вытеснять молекулы воды из гидрофобных карманов связывания и, следовательно, ускорять связывание лигандов. Было показано, что введение гидрофильных групп в структуры лигандов, которые связываются с гидрофобными участками белка приводит к снижению скорости связывания и увеличивает ВУ [82]. При этом основной движущей силой была дестабилизация переходного состояния.

В случае, когда лиганд и рецептор взаимодействуют через водородные связи, экранированные от воды окружающими гидрофобными областями, полученный комплекс является кинетически более стабильным, чем, если бы водородные связи были менее экранированы [78]. Это так же связывают с образованием кинетического барьера при связывании и распаде комплекса вследствие затруднённой диффузии воды в гидрофобные участки места связывания.

3.4. Конформационные изменения

Лиганды и рецепторы находятся в постоянном тепловом движении, изменяя свою конформацию. Эти изменения могут существенным образом влиять на кинетику связывания и распада комплексов. Анализ большой выборки лигандов для различных белков выявил прямую зависимость между длительностью ВУ лиганда и количеством вращающихся связей [66]: чем больше вращающихся связей, тем больше величина ВУ. В случае ограничения конформационной подвижности лиганда скорость связывания увеличивается [83].

Связывание белок-лиганд, при котором происходят конформационные перестройки, наиболее точно описывает модель индуцированного соответствия, которую можно описать уравнением:



Согласно этой модели, лиганд (L) встречает мишень (R), которая имеет субоптимальную комплементарность с молекулой лиганда. Начальное связывание происходит в этом конформационном состоянии с образованием первоначального комплекса (RL), определяемого константой скорости ассоциации (k_1), константой скорости диссоциации (k_2) и равновесной константой диссоциации (K_d). Вслед за быстрым образованием первоначального комплекса мишень-лиганд следует медленный этап, приводящий к образованию конечного комплекса (RL*). Считается, что этот второй этап включает изменение конформаций мишени и лиганда. Конформационные изменения приводят к большей стерической и электронной комплементарности между лигандом и его сайтом связывания на мишени и часто к большей изоляции этого сайта связывания от внешнего растворителя [12, 13], что усиливает гидрофобные взаимодействия, стабилизируя состояние RL*. Образование и разрушение первоначального комплекса обычно происходит быстро, тогда как изменения конформации – более длительный процесс. Поскольку конечный комплекс намного более стабилен, чем первоначальный, то с этим механизмом взаимодействия обычно связывают более высокую аффинность. Теоретически ВУ для этого механизма представляет собой компиляцию нескольких констант скорости, однако в большинстве случаев этап обратной изомеризации (с константой k_4) определяет скорость распада комплекса и, таким образом, ВУ примерно равно $1/k_4$.

К сожалению, в настоящее время мало структурной информации для сравнения различных лиганд-связанных конформеров мишеней (например, RL и RL*). В основном проводится сопоставление структур свободных белков и их комплексов с различными лигандами. Считается, что основные изменения конформации белка, приводящие к усилению связывания лиганда с рецептором, могут включать изменения конформации аминокислотных остатков, структурирование отдельных участков белка, движения петель.

Изменение конформации боковых групп аминокислотных остатков может способствовать лучшей стерической комплементарности, усилению водородных или ионных связей. Такие конформационные изменения могут привести к образованию дополнительных полостей в месте связывания. Примером может служить образование “заднего кармана” при взаимодействии протеинкиназ с конкурентными ингибиторами [27, 84-86] или “бокового кармана” при связывании селективных ингибиторов COX2 [87]. Связывание ингибиторов с еноил-ACP-редуктазой *Mycobacterium tuberculosis*

вызывает превращение неупорядоченной петли в спираль в активном сайте, что существенно влияет на скорость связывания и диссоциации ингибитора [30].

Хорошо известным примером движения больших участков белка является закрытие активного центра у протеазы ВИЧ после связывания лиганда [88, 89]. Закрытие активного центра не просто блокирует путь выхода связанного лиганда, но и создаёт среду с более низкой диэлектрической проницаемостью, защищенную от внешнего растворителя [78, 89]. Экранирующая растворитель среда приводит к усилению нековалентных сил между белком и лигандом, таких как водородные связи, гидрофобные силы и силы Ван-дер-Ваальса. Конформационные изменения могут давать дополнительные функциональные группы [30], способствующие многоточечному связыванию [85], что должно увеличивать ВУ.

При исследовании ингибирования термолитина было показано, что введение метилбензольной группы в структуру фосфатсодержащего пептидомиметика увеличивает ВУ в 74 тыс. раз (с трёх минут до 168 дней) [90]. Анализ кристаллической структуры комплекса термолитина с этим ингибитором показал, что метилбензольный заместитель взаимодействует с Phe114. Взаимодействие двух объёмных ароматических групп препятствует вращению бокового радикала Asn112, который участвует в процессе открывания/закрывания активного центра фермента, тем самым, блокируя выход ингибитора из активного центра, что выражается в резком увеличении ВУ (рис. 4).

Процесс диссоциации комплекса, образованного по модели индуцированного соответствия, рассматривают как обратный процесс (retrograde

induced-fit mechanism), по которому происходит обратная конверсия комплекса RL^* в комплекс RL , после чего комплекс диссоциирует [13].

4. ОГРАНИЧЕНИЯ КОНЦЕПЦИИ ВРЕМЕНИ УДЕРЖАНИЯ

В литературе рассматривается несколько возможных ограничений использования концепции ВУ. Первое связано с соотношением ВУ лиганда на белке и времени жизни самого белка. Очевидно, что если ВУ намного больше времени жизни белка в клетке, то это не даст дополнительных преимуществ в фармакологическом действии лиганда [91]. Кроме того, если белок-мишень быстро синтезируется клеткой, то новосинтезированный белок будет выполнять свою патофизиологическую функцию, поскольку на него не будет воздействовать лиганд, уже связанный со “старыми” белками. В этом случае необходимо поддерживать концентрацию свободного лиганда в клетке на значительном уровне, то есть в таком случае лучше опираться на значения K_d . Эта ситуация может возникнуть при заболеваниях, вызванных быстроразмножающимися вирусами или микроорганизмами [10, 11].

Используя модель, которая учитывает как фармакинетику, так и кинетику связывания лиганда, было показано, что продление фармакологического эффекта вследствие длительного ВУ лиганда может происходить только тогда, когда диссоциация происходит медленнее, чем элиминация лекарственного препарата. Однако для ряда ЛС или кандидатов наблюдается обратное соотношение, то есть они имеют более медленную элиминацию по сравнению с диссоциацией [43].

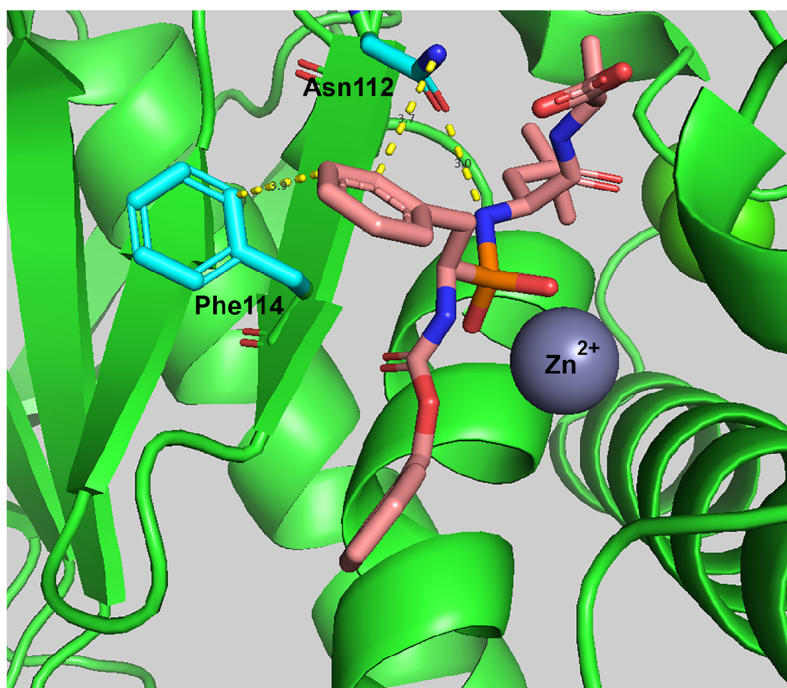


Рисунок 4. Взаимодействие ингибитора с большим ВУ с термолитином (PDB 4tmn). Взаимодействие ароматического кольца ингибитора с Phe114 стабилизирует Asn112 в закрытой конформации и препятствует выходу ингибитора из активного центра, что приводит к многократному увеличению ВУ. Каталитический ион цинка показан сферой.

В ряде случаев длительное ВУ может привести к токсическим последствиям. Это может происходить тогда, когда фармакологический эффект возникает только при коротком воздействии, тогда как длительное блокирование работы рецептора может привести к побочным эффектам [10, 11, 92, 94]. В таком случае наиболее благоприятная стратегия для пациентов будет достигаться за счёт сочетания более короткого ВУ и разумного выбора в режиме дозирования лекарства. Такая ситуация характерна для блокаторов дофаминовых рецепторов D2, которые действуют как атипичные антипсихотики [65, 94, 95].

Неожиданный побочный эффект был выявлен при исследовании роксифибана – антагониста долгоживущего рецептора гликопротеина Pb/IIIa поверхности тромбоцитов. Было обнаружено, что препарат вызывает изменение конформации рецептора, при этом на поверхности белка появляются неопитопы, называемые лиганд-индуцированными сайтами связывания. Распознавание антителами эпитопов *in vivo* вызывало иммунную элиминацию тромбоцитов, что приводило к тяжелой тромбоцитопении у ~ 2% пациентов [96, 97].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционной стратегией разработки новых лекарственных препаратов всегда было повышение термодинамического сродства (K_d или IC_{50}) лиганда к его основной мишени. За счёт этого сродства предполагалось достичь высокой эффективности и селективности действия лекарств и снижения вероятности развития побочных эффектов. Однако исследования последних лет показывают, что кинетические параметры связывания лиганда с мишенью могут вносить не меньший, а порой и больший вклад в эффективность действия лекарств [15-21]. Неудачи в разработке новых лекарственных средств, особенно на последних этапах из-за недостаточной эффективности, недостаточного терапевтического индекса или наличия побочных эффектов, во многом могут быть связаны с недооценкой кинетических особенностей взаимодействия лиганд-белок.

Осознание важности кинетических параметров в связывании белок-лиганд является серьёзным сдвигом парадигмы в разработке лекарств –

от статической картины термодинамических характеристик к динамическим представлениям, связывающим скорости ассоциации/диссоциации в системе мишень-лиганд с фармакологическим эффектом, фармакокинетикой и фармакодинамикой, и, в конечном итоге, с эффективностью и безопасностью лекарств.

С практической точки зрения, развитие этой концепции предполагает включение оценки кинетических параметров связывания уже на ранних стадиях разработки лекарств. Разработка лекарств с оптимизированными кинетическими параметрами потребует более детального изучения механизмов и путей связывания и диссоциации лигандов, выявления метастабильных состояний комплексов. Оценка кинетики связывания на ранней стадии разработки лекарственного средства может предоставить дополнительные критерии для отбора наиболее перспективных соединений для дальнейшего их продвижения [98-100]. Рациональный учёт кинетических параметров связывания позволит разрабатывать лиганды с улучшенной селективностью, с более длительным временем нахождения лиганда в комплексе с белком, проявляющие меньше побочных эффектов. Экспериментальные методы, используемые для измерения кинетических параметров, такие как поверхностный плазмонный резонанс или биохимические измерения по сдвигу значения IC_{50} после предварительной инкубации лиганда и мишени или путём введения стадии промывания для удаления временно связанного лиганда, являются относительно простыми и лёгкими для включения в программы по разработке лекарств без серьёзного увеличения сроков проекта. Включение кинетических параметров в фармакокинетические/фармакодинамические модели может привести к улучшению предсказаний поведения лекарств в организме. Все эти направления могут способствовать увеличению показателя успешности разработки новых лекарств.

В таблице 2 приведены кинетические константы для ряда низкомолекулярных лекарств. Хотя кинетика взаимодействия мишень-лиганд была рассмотрена на примере системы “белок-низкомолекулярное соединение”, всё вышесказанное применимо для белков, пептидов, антител, нуклеиновых кислот, используемых в терапии или в диагностических системах.

Таблица 2. Примеры кинетических параметров и аффинности для лекарств из разных классов

Лекарство	Мишень	Болезнь	K_d (нМ)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
Desloratadine	H1 рецептор	аллергия	1,4	$1,8 \times 10^5$	$2,5 \times 10^{-4}$
Candesartan	AT1 рецептор	гипертензия	6,1	$9,8 \times 10^4$	$1,6 \times 10^{-4}$
Aliskiren	Ренин	гипертензия	0,3	$4,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-4}$
Saquinavir	Протеаза ВИЧ	ВИЧ	0,44	$1,1 \times 10^6$	$4,1 \times 10^{-4}$
Amprenavir	Протеаза ВИЧ	ВИЧ	1,1	$4,4 \times 10^6$	$4,9 \times 10^{-3}$
Gefitinib	EGFR	рак лёгкого	1,4	$5,5 \times 10^6$	$7,6 \times 10^{-3}$
Elvitegravir	Интеграза ВИЧ	ВИЧ	4,0	$2,1 \times 10^6$	$8,3 \times 10^{-3}$
Deoxyconformycin	Аденозиндеаминаз	инфекционные заболевания	0,002	$2,4 \times 10^6$	$4,8 \times 10^{-6}$
Oseltamivir	Нейраминидаза	грипп	0,3	$7,9 \times 10^5$	$2,5 \times 10^{-4}$
Tiotropium	Мускариновый M3 рецептор	хроническая обструктивная болезнь лёгких	0,01	$7,6 \times 10^5$	$7,2 \times 10^{-4}$

Примечание: (исходные данные взяты из [42, 43].)

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Hay M., Thomas D.W., Craighead J.L., Economides C., Rosenthal J. (2014) *Nat. Biotechnol.*, **32**, 40-51.
- Arrowsmith J. (2011) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 328-329.
- Cook D., Brown D., Alexander R., March R., Morgan P., Satterthwaite G., Pangalos M.N. (2014) *Nat. Rev. Drug Discovery*, **13**, 419-431.
- Kola I., Landis J. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 711-715.
- Ferenczy G.G., Keseru G.M. (2010) *Drug Discov. Today*, **15**, 919-932.
- Holdgate G.A., Ward W.H.J. (2005) *Drug Discov. Today*, **10**, 1543-1550.
- Claveria-Gimeno R., Vega S., Abian O., Velazquez-Campoy A. (2017) *Expert Opin. Drug Discov.*, **12**, 363-377.
- Geschwindner S., Ulander J., Johansson P. (2015) *J. Med. Chem.*, **58**, 6321-6335.
- Mobley D.L., Gilson M.K. (2017) *Annu. Rev. Biophys.*, **46**, 531-558.
- Copeland R.A., Pompliano D.L., Meek T.D. (2006) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 730-739.
- Tummino P.J., Copeland R.A. (2008) *Biochemistry*, **47**, 5481-5492.
- Copeland R.A. (2010) *Expert Opin. Drug Discov.*, **5**, 305-310.
- Copeland R.A. (2011) *Future Med. Chem.*, **3**, 1491-1501.
- Copeland R.A. (2016) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **15**, 87-95.
- Copeland R.A., Williams J.M., Giannaras J., Nurnberg S., Covington M., Pinto D., Pick S., Trzaskos J.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11202-11206.
- Daryae F., Chang A., Schiebel J., Lu Y., Zhang Z., Kapilashrami K., Walker S.G., Kisker C., Sotriffer C.A., Fisher S.L., Tonge P.J. (2016) *Chem. Sci.*, **7**, 5945-5954.
- Gooljarsingh L.T., Fernandes C., Yan K., Zhang H., Grooms M., Johanson K., Sinnamon R.H., Kirkpatrick R.B., Kerrigan J., Lewis T., Arnone M., King A.J., Lai Z., Copeland R.A., Tummino P.J. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7625-7630.
- Guo D., Mulder-Kriege T., IJzerman A.P., Heitman L.H. (2012) *Br. J. Pharmacol.*, **166**, 1846-1859.
- Lu H., England K., am Ende C., Truglio J.J., Luckner S., Reddy B.G., Marlenee N.L., Knudson S.E., Knudson D.L., Bowen R.A., Kisker C., Slayden R.A., Tonge P.J. (2009) *ACS Chem. Biol.*, **4**, 221-231.
- Lu H., Tonge P.J. (2010) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **14**, 467-474.
- van Aller G.S., Pappalardi M.B., Ott H.M., Diaz E., Brandt M., Schwartz B.J., Miller W.H., Dhanak D., McCabe M.T., Verma S.K., Creasy C.L., Tummino P.J., Kruger R.G. (2014) *ACS Chem. Biol.*, **9**, 622-629.
- Kruse A.C., Hu J., Pan A.C., Arlow D.H., Rosenbaum D.M., Rosemond E., Green H.F., Liu T., Chae P.S., Dror R.O., Shaw D.E., Weis W.I., Wess J., Kobilka B.K. (2012) *Nature*, **482**, 552-556.
- Sykes D.A., Moore H., Stott L., Holliday N., Javitch J.A., Lane J.R., Charlton S.J. (2017) *Nat. Commun.*, **8**, 763.
- Chang A., Schiebel J., Yu W., Bommineni G.R., Pan P., Baxter M.V., Khanna A., Sotriffer C.A., Kisker C., Tonge P.J. (2013) *Biochemistry*, **52**, 4217-4228.
- Guo D., Heitman L.H., IJzerman A.P. (2015) *ChemMedChem*, **10**, 1793-1796.
- Schuetz D.A., de Witte W.E.A., Wong Y.C., Knasmueller B., Richter L., Kokh D.B., Sadiq S.K., Bosma R., Nederpelt I., Heitman L.H. et al. (2017) *Drug Discov. Today*, **22**, 896-911.
- Lu H., Iuliano J.N., Tonge P.J. (2018) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **44**, 101-109.
- Bakker A.V., Daffeh J., Jung S., Vincent L.A., Nagel A.A., Spencer R.W., Vinick F.J., Faraci W.S. (1991) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1**, 585-590.
- Lu H., Tonge P.J. (2008) *Acc. Chem. Res.*, **41**, 11-20.
- Luckner S.R., Liu N., am Ende C.W., Tonge P.J., Kisker C. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 14330-14337.
- Stewart M.J., Parikh S., Xiao G., Tonge P.J., Kisker C. (1999) *J. Mol. Biol.*, **290**, 859-865.
- Guo D., Hillger J.M., IJzerman A.P., Heitman L.H. (2014) *Med. Res. Rev.*, **34**, 856-892.
- Gao Y., Davies S.P., Augustin M., Woodward A., Patel U.A., Kovelman R., Harvey K.J. (2013) *Biochem. J.*, **451**, 313-328.
- Janssen A.P.A., Grimm S.H., Wijdeven R.H.M., Lenselink E.B., Neeffes J., van Boeckel C.A.A., van Westen G.J.P., van der Stelt M. (2019) *J. Chem. Inf. Model.*, **59**, 1221-1229.
- Miduturu C.V., Deng X., Kwiatkowski N., Yang W., Brault L., Filippakopoulos P., Chung E., Yang Q., Schwaller J., Knapp S., King R.W., Lee J.D., Herrgard S., Zarrinkar P., Gray N.S. (2011) *Chem. Biol.*, **18**, 868-879.
- Guo D., Heitman L.H., IJzerman A.P. (2016) *ACS Med. Chem. Lett.*, **7**, 819-821.
- Ayaz P., Andres D., Kwiatkowski D.A., Kolbe C.C., Lienau P., Siemeister G., Lucking U., Stegmann C.M. (2016) *ACS Chem. Biol.*, **11**, 1710-1719.
- de Witte W.E.A., Danhof M., van der Graaf P.H., de Lange E.C. (2016) *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 831-842.
- Sykes D.A., Dowling M.R., Leighton-Davies J., Kent T.C., Fawcett L., Renard E., Trifilieff A., Charlton S.J. (2012) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **343**, 520-528.
- Tautermann C.S., Kiechle T., Seeliger D., Diehl S., Wex E., Banholzer R., Gantner F., Pieper M.P., Casarosa P. (2013) *J. Med. Chem.*, **56**, 8746-8756.
- Walkup G.K., You Z., Ross P.L., Allen E.K., Daryae F., Hale M.R., O'Donnell J., Ehmann D.E., Schuck V.J., Buurman E.T., Choy A.L., Hajec L., Murphy-Benenato K., Marone V., Patey S.A., Grosser L.A., Johnstone M., Walker S.G., Tonge P.J., Fisher S.L. (2015) *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 416-423.
- IJzerman A.P., Guo D. (2019) *Trends Biochem. Sci.*, **44**, 861-871.
- Dahl G., Akerud T. (2013) *Drug Discov. Today*, **18**, 697-707.
- Tian G. (1996) *J. Pharm. Sci.*, **85**, 106-111.
- Dierynck I., De Wit M., Gustin E., Keuleers I., Vandersmissen J., Hallenberger S., Hertogs K. (2007) *J. Virol.*, **81**, 13845-13851.

46. Maschera B., Darby G., Palù G., Wright L.L., Tisdale M., Myers R., Blair E.D., Furfine E.S. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 33231-33235.
47. Hyre D.E., Le Trong I., Merritt E.A., Eccleston J.F., Green N.M., Stenkamp R.E., Stayton P.S. (2006) *Protein Sci.*, **15**, 459-467.
48. Basavapathruni A., Jin L., Daigle S.R., Majer C.R., Therkelsen C.A., Wigle T.J., Kuntz K.W., Chesworth R., Pollock R.M., Scott M.P., Moyer M.P., Richon V.M., Copeland R.A., Olhava E.J. (2012) *Chem. Biol. Drug Des.*, **80**, 971-980.
49. Iyidogan P., Anderson K.S. (2014) *Viruses*, **6**, 4095-4139.
50. Hsiou Y., Ding J., Das K., Clark A.D. Jr., Boyer P.L., Lewi P., Janssen P.A., Kleim J.P., Rösner M., Hughes S.H., Arnold E. (2001) *J. Mol. Biol.*, **309**, 437-445.
51. Lindberg J., Sigurdsson S., Löwgren S., Andersson H.O., Sahlberg C., Noréen R., Fridborg K., Zhang H., Unge T. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1670-1677.
52. Zhang T., Liu L.A., Lewis D.F., Wei D.Q. (2011) *J. Chem. Inf. Model.*, **51**, 1336-1346.
53. Schoop A., Dey F. (2015) *Drug Discov. Today Technol.*, **17**, 9-15.
54. Xia L., Kyrizaki A., Tosh D.K., van Duijl T.T., Roorda J.C., Jacobson K.A., IJzerman A.P., Heitman L.H. (2018) *Biochem. Pharmacol.*, **153**, 248-259.
55. Guo D., Dijksteel G.S., van Duijl T., Heezen M., Heitman L.H., IJzerman A.P. (2016) *Biochem. Pharmacol.*, **105**, 34-41.
56. Georgi V., Schiele F., Berger B.T., Steffen A., Marin Zapata P.A., Briem H., Menz S., Preusse C., Vasta J.D., Robers M.B., Brands M., Knapp S., Fernández-Montalván A. (2018) *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 15774-15782.
57. Shuman C.F., Vrang L., Danielson U.H. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**, 5953-5961.
58. Vauquelin G. (2010) *Expert Opin. Drug Discov.*, **5**, 927-941.
59. Vauquelin G. (2018) *MedChemComm.*, **9**, 1426-1438.
60. Beeh K.M., Derom E., Kannies F., Cameron R., Higgins M., van As A. (2007) *Eur. Respir. J.*, **29**, 871-878.
61. Bourbeau J., Bartlett S.J. (2008) *Thorax*, **63**, 831-838.
62. Elg M., Gustafsson D., Deinum J. (1997) *Thromb. Haemost.*, **78**, 1286-1292.
63. Dror R.O., Pan A.C., Arlow D.H., Borhani D.W., Maragakis P., Shan Y., Xu H., Shaw D.E. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13118-13123.
64. Schramm V.L. (2011) *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 703-732.
65. Tresadern G., Bartolome J.M., Macdonald G.J., Langlois X. (2011) *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 2231-2241.
66. Miller D.C., Lunn G., Jones P., Sabnis Y., Davies N.L., Driscoll P. (2012) *MedChemComm.*, **3**, 449-452.
67. Pan A.C., Borhani D.W., Dror R.O., Shaw D.E. (2013) *Drug Discov. Today*, **18**, 667-673.
68. Schreiber G., Fersht A.R. (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 427-431.
69. Magarkar A., Schnapp G., Apel A.K., Seeliger D., Tautermann C.S. (2019) *ACS Med. Chem. Lett.*, **10**, 324-328.
70. Heroen C., Georgi V., Ganotra G.K., Brennan P., Wolfreys F., Wade R.C., Fernández-Montalván A.E., Chaikuad A., Knapp S. (2018) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **57**, 7220-7224.
71. Fedosova N.U., Champeil P., Esmann M. (2002) *Biochemistry*, **41**, 1267-1273.
72. Radic Z., Kirchhoff P.D., Quinn D.M., McCammon J.A., Taylor P. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 23265-23277.
73. Krishnamurthy V.M., Kaufman G.K., Urbach A.R., Gitlin I., Gudiksen K.L., Weibel D.B., Whitesides G.M. (2008) *Chem. Rev.*, **103**, 946-1051.
74. Collins K.D. (2012) *Biophys. Chem.*, **167**, 43-59.
75. Ahmad M., Gu W., Helms V. (2008) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **47**, 7626-7630.
76. Han S., Zaniewski R.P., Marr E.S., Lacey B.M., Tomaras A.P., Evdokimov A., Miller J.R., Shanmugasundaram V. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22002-22007.
77. Liu L., Michelsen K., Kitova E.N., Schnier P.D., Klassen J.S. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 17658-17660.
78. Schmidtke P., Luque F.J., Murray J.B., Barril X. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 18903-18910.
79. Setny P., Wang Z., Cheng L.T., Li B., McCammon J.A., Dzubiel J. (2009) *Phys. Rev. Lett.*, **103**, 187801.
80. Setny P., Baron R., Keken-Huskey M.P., McCammon J.A., Dzubiel J. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 1197-1202.
81. Chandler D. (2005) *Nature*, **437**, 640-647.
82. Schuetz D.A., Richter L., Amaral M., Grandits M., Grädler U., Musil D., Buchstaller H.P., Eggenweiler H.M., Frech M., Ecker G.F. (2018) *J. Med. Chem.*, **61**, 4397-4411.
83. Fleck B.A., Hoare S.R., Pick R.R., Bradbury M.J., Grigoriadis D.E. (2012) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **341**, 518-531.
84. Cowan-Jacob S.W., Mobitz H., Fabbro D. (2009) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 280-287.
85. Schneider E.V., Bottcher J., Huber R., Maskos K., Neumann L. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 8081-8086.
86. Zhao Z., Wu H., Wang L., Liu Y., Knapp S., Liu Q., Gray N.S. (2014) *ACS Chem. Biol.*, **20**, 1230-1241.
87. Luong C., Miller A., Barnett J., Chow J., Ramesha C., Browner M.F. (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 927-933.
88. Carroll M.J., Mauldin R.V., Gromova A.V., Singleton S.F., Collins E.J., Lee A.L. (2012) *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 246-252.
89. Sullivan S.M., Holyoak T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13829-13834.
90. Cramer J., Krimmer S.G., Fridh V., Wulsdorf T., Karlsson R., Heine A., Klebe G. (2017) *ACS Chem. Biol.*, **12**, 225-233.
91. Lewandowicz A., Tyler P., Evans G.B., Furneaux R.H., Schramm V.L. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 31465-31468.
92. Bryant J., Post J.M., Alexander S., Wang Y.X., Kent L., Schirm S., Tseng J.L., Subramanyam B., Buckman B., Islam I., Yuan S., Sullivan M.E., Snider M., Morser J. (2008) *Thromb. Res.*, **122**, 523-532.
93. Swinney D.C. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 801-808.
94. Kapur S., Seeman P. (2000) *J. Psychiatry Neurosci.*, **25**, 161-166.
95. Vauquelin G., Bostoen S., Vanderheyden P., Seeman P. (2012) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **385**, 337-372.
96. Billheimer J.T., Dicker I.B., Wynn R., Bradley J.D., Cromley D.A., Godonis H.E., Grimminger L.C., He B., Kieras C.J., Pedicord D.L., Spitz S.M., Thomas B.E., Zolotarjova N.I., Gorko M.A., Hollis G.F., Daly R.N., Stern A.M., Seiffert D. (2002) *Blood*, **99**, 3540-3546.
97. Seiffert D., Stern A.M., Ebling W., Rossi R.J., Barrett Y.C., Wynn R., Hollis G.F., He B., Kieras C.J., Pedicord D.L., Cromley D.A., Hua T.A., Stein R.B., Daly R.N., Sferruzza A., Pieniaszek H.J., Billheimer J.T. (2003) *Blood*, **101**, 58-63.
98. Guo D., Xia L., van Veldhoven J.P., Hazeu M., Mocking T., Brussee J., IJzerman A.P., Heitman L.H. (2014) *ChemMedChem*, **9**, 752-761.
99. Núñez S., Venhorst J., Kruse C.G. (2012) *Drug Discov. Today*, **17**, 10-22.
100. Louvel J., Guo D., Agliardi M., Mocking T.A., Kars R., Pham T.P., Xia L., de Vries H., Brussee J., Heitman L.H., IJzerman A.P. (2014) *J. Med. Chem.*, **57**, 3213-3222.

Поступила в редакцию: 13. 01. 2020.
После доработки: 14. 02. 2020.
Принята к печати: 17. 02. 2020.

LIGAND-RECEPTOR BINDING KINETICS IN DRUG DESIGN

*D.V. Borisov, A.V. Veselovsky**

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Porodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: veselov@ibmh.msk.su

Traditionally, the thermodynamic values of affinity are considered as the main criterion for the development of new drugs. Usually, these values for drugs are measured *in vitro* at steady concentrations of the receptor and ligand, which are differed from *in vivo* environment. Recent studies have shown that the kinetics of the process of drug binding to its receptor make significant contribution in the drug effectiveness. This has increased attention in characterizing and predicting the rate constants of association and dissociation of the receptor ligand at the stage of preclinical studies of drug candidates. A drug with a long residence time can determine ligand-receptor selectivity (kinetic selectivity), maintain pharmacological activity of the drug at its low concentration *in vivo*. The paper discusses the theoretical basis of protein-ligand binding, molecular determinants that control the kinetics of the drug-receptor binding. Understanding the molecular features underlying the kinetics of receptor-ligand binding will contribute to the rational design of drugs with desired properties.

Key words: kinetics; thermodynamics; binding constant; residence time; rate constant; protein-ligand complex

Funding. The work was performed in the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013-2020.

Received: 13.01.2020, revised: 14.02.2020, accepted: 17.02.2020.