

© Коллектив авторов

СКРИНИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ НЕАЗОЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ 14-АЛЬФА ДЕМЕТИЛАЗЫ (CYP51) ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*

Л.А. Калужский^{1*}, П.В. Еришов¹, Е.О. Яблоков¹, Ю.В. Мезенцев¹,
О.В. Гнеденко¹, Т.В. Шкель², А.А. Гилеп², С.А. Усанов², А.С. Иванов¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: leonid.kaluzhskiy@ibmc.msk.ru

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук,
Республика Беларусь, 220141, Минск, ул. Купревича, 5/2

В настоящее время условно-патогенные грибы рода *Candida* являются основными возбудителями микозов, которые особенно тяжело протекают при наличии приобретенного иммунодефицита. Главной мишенью для разработки новых антимикотиков является цитохром P450 51 (CYP51) патогенного гриба. Вследствие широкого распространения резистентных штаммов *Candida* к ингибиторам из класса азолов актуальность приобретает поиск ингибиторов CYP51 как среди соединений неазольной природы, так и среди применяемых в клинике лекарственных средств, репозиционируемых в качестве антимикотиков. Для идентификации потенциальных ингибиторов из группы соединений неазольной природы был применен комплексный подход, включающий биоинформатический анализ, компьютерное молекулярное моделирование и технологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR). С помощью *in silico* моделирования были предсказаны сайты связывания ацетилсалициловой кислоты, ибупрофена, хлорпромазина, галоперидола (которые по литературным данным проявляли антимикотическую активность) в активном центре CYP51 *Candida albicans* и CYP51 *Candida glabrata*. SPR анализ позволил установить значения K_d комплексов ацетилсалициловой кислоты, ибупрофена и галоперидола с CYP51, которые были в диапазоне от 18 мкМ до 126 мкМ. Также было показано, что структурные производные галоперидола, содержащие различные заместители, могут позиционироваться в активном центре CYP51 *Candida albicans* с возможным образованием координационных связей между гидроксильными группами производных и атомом железа в геме CYP51. Таким образом, были предложены потенциальные базовые структуры неазольных соединений, которые могут быть основой для создания новых ингибиторов CYP51 грибов рода *Candida*.

Ключевые слова: ингибиторы CYP51; поверхностный плазмонный резонанс; докинг; антимикотики; лекарства

DOI: 10.18097/PBMC20216701042

ВВЕДЕНИЕ

В мире ежегодно умирает от грибковых инфекций порядка 1,6 миллиона человек. Возбудителями данных инфекций являются различные виды грибов, основную массу которых составляют грибы рода *Candida*, представляющие нормальную микрофлору слизистых оболочек рта, а также других органов. Однако среди лиц с развивающимся иммунодефицитом, который ассоциирован с ВИЧ-инфекцией, химио- и иммуносупрессивной терапией, грибы рода *Candida* могут вызывать системные микозы. Для терапии микозов в настоящее время широко используются лекарственные соединения из группы азолов [1]. Их механизм действия заключается в ингибировании ферментативной активности стерол-14-альфа деметилазы (цитохром P450 51, CYP51), которая отщепляет у молекулы ланостерола метильную группу в 14-альфа положении. Данная реакция является одной из ключевых в биосинтезе эргостерола, и её торможение приводит к нарушению формирования клеточных мембран гриба. Дефицит синтеза эргостерола и накопление 14-альфа-метилстерола существенно ограничивает рост гриба. Возможный механизм побочного токсического действия азольных ингибиторов может быть обусловлен неселективной активностью

в отношении CYP51 и других цитохромов P450 человека [2]. В последнее время системные микозы, вызванные азол-резистентными штаммами патогенных грибов [3], например, *Candida glabrata*, получили широкое распространение среди лиц из соответствующих групп риска. В связи с этим поиск новых низкомолекулярных соединений неазольной природы (в том числе среди известных ингибиторов CYP, способных взаимодействовать с CYP51 [4]), которые бы могли ингибировать CYP51 клинически значимых грибов, представляется одним из подходов к решению этой проблемы.

Данная работа представляет собой попытку поиска потенциальных ингибиторов CYP51 патогенных грибов среди лекарств неазольной природы. Такие соединения могут стать базовыми структурами для дизайна новых ингибиторов CYP51. Для этого был применён комплексный подход, использующий биоинформатический анализ, компьютерное молекулярное моделирование и технологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Первоначально нами на основе литературных данных была сформирована выборка из 46 лекарственных соединений, для которых экспериментально была выявлена антимикотическая активность наряду с их основным действием [5, 6]. Для семи соединений (ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, галоперидол, хлорпромазин, трифлуоперазин,

флунаризин и циннаризин) с помощью программы PassOnline [7] была предсказана потенциальная ингибиторная активность в отношении CYP51. С использованием метода компьютерного молекулярного докинга были построены модели комплексов трёх соединений (ацетилсалициловая кислота, ибупрофен и галоперидол) в активном центре CYP51 *Candida albicans* и CYP51 *Candida glabrata*. С помощью SPR технологии были определены значения константы диссоциации комплексов (K_d) этих соединений с CYP51 обоих штаммов *Candida*, которые находились в диапазоне порядка 18-126 мкМ.

МЕТОДИКА

Рекомбинантные белковые препараты и химические соединения

В работе были использованы высокоочищенные (>95% по данным электрофореза в полиакриламидном геле) препараты рекомбинантных белков CYP51 *Candida albicans* и *Candida glabrata*, полученные путем их гетерологичной экспрессии в *E. coli* в Институте биорганической химии Национальной академии наук Республики Беларусь [8, 9]. Препараты лекарственных соединений аналитической чистоты были получены от “Cayman Chemical” (США) (ибупрофен, кат. № 70280, ацетилсалициловая кислота, кат. № 70260). Стоковые растворы соединений 55,5 мМ ацетилсалициловой кислоты (10 мг/мл) и 192,5 мМ ибупрофена (39,7 мг/мл) готовили, используя 96% этанол. Препарат галоперидола, использованный в работе, представлял собой аптечный препарат (“Галоперидол-Ратиофарм” (“Haloperidol-Ratiopharm”), капли для приёма внутрь 2 мг/мл, производитель “MERCKLE, GmbH” (Германия), владелец регистрационного удостоверения: “Ratiopharm” (Германия)).

Биоинформатический анализ и компьютерное моделирование

Выборка известных лекарственных соединений, обладающих антимикотической активностью, была сформирована по литературным данным [5, 6, 10]. Для предсказания активности данных соединений в отношении CYP51 был использован Web-сервис PassOnline (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>) [7]. Для выполнения процедур молекулярного докинга были использованы пространственные структуры CYP51 *Candida glabrata* (PDB ID 5JLC, разрешение 2,4 Å) и CYP51 *Candida albicans* (PDB ID 5TZ1, разрешение 2,0 Å), полученные из банка данных PDB (<https://www.rcsb.org/>). Для удаления молекул воды и лигандов из кристаллических структур, добавления атомов водорода, зарядов и выполнения процедуры минимизации энергии (300 шагов) был использован алгоритм DockPrep программы USCF Chimera [11]. Файлы с 3D структурами соединений были взяты из базы данных PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Молекулярный докинг структур лекарственных соединений ко всей поверхности белков-мишеней был выполнен

с использованием Web-сервиса SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>) [12, 13]. Селекцию лучших моделей комплексов выполняли по наименьшим значениям энергии связывания (ΔG), наличию водородных связей и значениям оценочной функции (Fitness).

Для поиска структурных производных галоперидола был использован Web-сервис SwissSimilarity (<http://www.swiss similarity.ch/>) [14]. Предсказание противогрибковой активности соединений было выполнено на Web-сервере FungiPAD [15] (<http://chemyang.ccnu.edu.cn/ccb/database/FungiPAD/>). Кластеризацию по физико-химическим свойствам и вычисление значений коэффициентов подобия выполняли на Web-сервере ChemMine (<https://chemminetools.ucr.edu/>) [16]. Вычисление расстояний от атома кислорода гидроксильной группы низкомолекулярного соединения до атома железа гема CYP51 и углов между атомами азота тетрапиррольных колец гема, атомом железа гема и атомом кислорода соединения (N--Fe--O угол) в предсказанных докингом моделях выполняли в программе Chimera X 1.1 [17].

Исследование взаимодействия лекарственных соединений с CYP51 методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Регистрация межмолекулярных взаимодействий была выполнена с использованием SPR биосенсора Biacore 8K (“Cytiva”, США (ранее “GE Healthcare Life Sciences”, США)) на оптических чипах CM5 серии S при температуре 25°C. Сигналы биосенсора регистрировали в режиме реального времени с частотой 10 Гц в резонансных единицах RU (от resonance units, 1 RU соответствует 1 пг белка). В качестве рабочего буфера использовали буфер HBS-N (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,4). Белковые препараты CYP51 *Candida albicans* и CYP51 *Candida glabrata* иммобилизовали путём формирования амидных связей между доступными аминокислотными группами белка и карбоксильными группами на поверхности чипа. Процедуру иммобилизации осуществляли с использованием автоматизированного протокола “Immobilization”. Поверхность оптического чипа активировали пропусканием смеси равных объёмов 0,5 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) и 0,1 М N-гидроксисукцинимид (NHS) в течение 7 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Далее производили инъекцию раствора CYP51 (20 мкг/мл) в 10 мМ малеатном буфере (pH 6,5) в течение 5 мин при скорости потока 15 мкл/мин. После процедуры иммобилизации все каналы биосенсора промывали в течение 1 ч рабочим буфером HBS-N и в конце дважды промывали регенерирующим раствором, содержащим 1 М NaCl и 0,5% CHAPS (w/v). При выполнении SPR анализа взаимодействий лекарственных соединений с иммобилизованными CYP51 использовали рабочий буфер HBS-N, с добавлением 0,5% этанола (буфер HBS-N-EtOH). Растворы лекарственных соединений в буфере HBS-N-EtOH в концентрациях 25 мкМ, 50 мкМ, 75 мкМ и 100 мкМ

СКРИНИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ CYP51

инжектировали последовательно через рабочий и контрольный каналы биосенсора в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. При этом регистрировали формирование комплексов лекарства с белком-мишенью. Последующую диссоциацию молекулярных комплексов регистрировали в течение 10 мин при той же скорости потока. По окончании каждого измерения каналы биосенсора дважды промывали регенерирующим раствором в течение 30 с при скорости потока 35 мкл/мин. Результирующие сенсограммы взаимодействия соединений с CYP51 получали путём вычитания сигнала контрольного канала из сигнала рабочего канала. Серии сенсограмм анализировали с помощью программного комплекса BIAevaluation v. 4.1.1 ("Cytiva"). Константы диссоциации комплексов (K_d) рассчитывали согласно модели поверхностного связывания Лэнгмюра (взаимодействие двух молекул — 1:1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первоначально на основе литературных данных нами была сформирована выборка

из 46 лекарственных соединений, для которых наряду с их основным действием была выявлена *in vitro* антимикотическая активность в отношении условно-патогенных грибов рода *Candida* [5, 6]. Для семи соединений из данной выборки с помощью Web-сервиса PassOnline была предсказана ингибирующая активность в отношении ланостерол 14-альфа деметилазы (табл. 1). С помощью метода молекулярного докинга данных соединений ко всей поверхности CYP51 *Candida albicans* и CYP51 *Candida glabrata* были построены компьютерные модели возможных комплексов. Модели комплексов трёх лекарственных соединений (трифлуоперазина, флунаризина и циннаризина) с CYP51 имели неудовлетворительную оценочную функцию и энергию связывания и далее не использовались в работе. Для четырёх остальных соединений (галоперидол, ацетилсалициловая кислота, хлорпромазин, ибупрофен) были предсказаны сайты связывания с CYP51 (табл. 2). Пример модели комплекса галоперидола в активном центре CYP51 *Candida albicans* показан на рисунке S1 дополнительных материалов.

Таблица 1. Лекарственные соединения с подтверждённой *in vitro* антимикотической активностью в отношении условно-патогенных грибов

Название лекарственного соединения	DrugBank ID	Литература	ра/рi*
Галоперидол	DB00502	<i>Candida spp</i> [6]	0,145/0,034
Хлорпромазин	DB00477	<i>Candida spp</i> [5]	0,165/0,02
Ибупрофен	DB01050	<i>Candida spp</i> [5]	0,116/0,084
Ацетилсалициловая кислота	DB00945	<i>Cryptococcus neoformans</i> [10]	0,117/0,08
Трифлуоперазин	DB00831	<i>Candida spp</i> [5]	0,131/0,052
Флунаризин	DB04841	<i>Candida spp</i> [5]	0,235/0,005
Циннаризин	DB00568	<i>Candida spp</i> [5]	0,201/0,009

Примечание: *ра/рi — предсказание вероятности наличия/отсутствия ингибирующей активности соединения в отношении CYP51 по данным Pass Online: ра — вероятность того, что соединение будет иметь данную активность, рi — вероятность того, что соединение будет не иметь данную активность.

Таблица 2. Описание моделей комплексов лекарственных соединений с CYP51 *Candida albicans* и *Candida glabrata*

Название лекарственного соединения	CYP51 <i>Candida albicans</i>					
	Область белка*	кластер	FullFitness** (ккал/моль)	Энергия связывания, ΔG (ккал/моль)	Водородные связи с а.о. белка	SimpleFitness** (ккал/моль)
Галоперидол	I	0(0)	-2098	-7,7	Tyr118	-11,56
	I	0(1)	-2095	-7,7	Tyr118, Tyr132	-10,36
Ацетилсалициловая кислота	II	6(0)	-2061	-6,6	Gln67, Tyr505, Met372	6,78
	II	19(1)	-2059	-6,4	Lys499, Lys499	6,17
Ибупрофен	II	2(0)	-2075	-7,1	Val500, Glu325	-16,54
	II	8(0)	-2033	-7,0	Glu420	-14,18
Хлорпромазин	II	0(1)	-2071	-9,4	Glu420	3,92
	CYP51 <i>Candida glabrata</i>					
	Область белка*	кластер	FullFitness** (ккал/моль)	Энергия связывания, ΔG (ккал/моль)	Водородные связи с а.о. белка	SimpleFitness** (ккал/моль)
Галоперидол	I	0(0)	-2062	-7,8	нет	-11,77
	I	11(1)	-2057	-7,2	нет	-14,39
	I	17(1)	-2055	-7,8	Tyr127	-6,35
Ацетилсалициловая кислота	I	6(3)	-2025	-6,1	Tyr141	8,91
	I	8(0)	-2027	-6,3	Tyr141, Tyr127, Ser383	9,22
	I	26(2)	-2025	-6,0	Tyr127, Tyr141	9,63
Ибупрофен	I	0(0)	-2048	-7,8	His382, Met512	-20,59
	I	1(0)	-2045	-7,0	Tyr141	-16,45
	I	8(0)	-2040	-6,9	Val513	-12,71
	I	10(0)	-2040	-6,9	Tyr127, Ser383	-10,52
Хлорпромазин	II	13(2)	-2034	-7,8	Glu426	9,18

Примечание: *область белка: I — сайты связывания в активном центре, II — сайты связывания на поверхности белка; **параметры оценочной функции докинга в приложении SwissDock (см. подробно [12, 13]), а.о. — аминокислотный остаток.

Частичная экспериментальная проверка прямого взаимодействия соединений с CYP51 была выполнена с помощью SPR технологии. Для этого два белка CYP51 *Candida albicans* и CYP51 *Candida glabrata* были иммобилизованы в рабочих каналах SPR биосенсора. Средний уровень иммобилизации белков составил 6439 ± 590 RU ($n=3$) и 7897 ± 649 RU ($n=3$) соответственно. На рисунке 1 показана диаграмма средних значений K_d комплексов ацетилсалициловой кислоты, галоперидола и ибупрофена с CYP51 *Candida albicans* и CYP51 *Candida glabrata*, определённых с помощью SPR анализа.

Из рисунка 1 следует, что тестируемые соединения взаимодействовали с CYP51 со значениями K_d от 18 мкМ до 126 мкМ. Взаимодействие ибупрофена с CYP51 *Candida glabrata* не было зарегистрировано. Ацетилсалициловая кислота и галоперидол формировали в 2,5–3 раза более высокоаффинные комплексы с CYP51 *Candida albicans* по сравнению с CYP51 *Candida glabrata*, что указывало на вероятное наличие внутривидовой специфичности комплексообразования. В качестве примера SPR анализа на рисунке 2 приведён пример сенсограмм взаимодействия разных концентраций низкомолекулярного анализита с иммобилизованным на оптическом чипе CYP51.

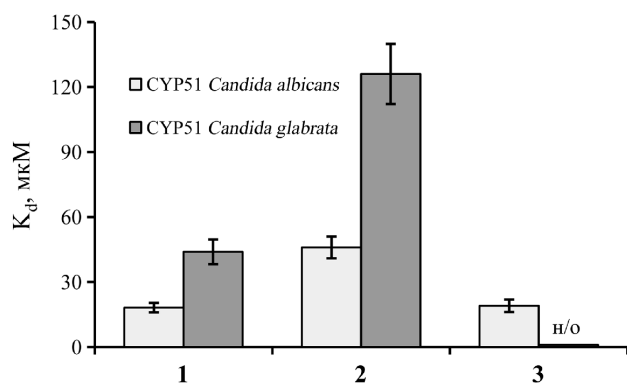


Рисунок 1. Константы диссоциации комплексов (K_d) ацетилсалициловой кислоты (1), галоперидола (2) и ибупрофена (3) с CYP51 *Candida albicans* и CYP51 *Candida glabrata*. н/о — взаимодействие не было определено.

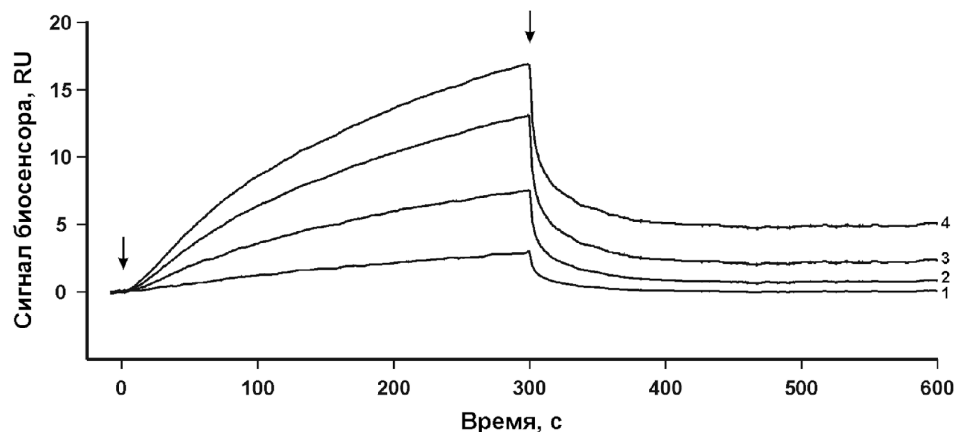


Рисунок 2. Сенсограммы взаимодействия галоперидола (аналит) с иммобилизованным на оптическом чипе белком-лигандом (CYP51 *Candida albicans*). Концентрации анализита (мкМ): (1) — 25, (2) — 50, (3) — 75, (4) — 100. Начало и конец инъекции анализита отмечены стрелками.

Согласно базе данных SuperCYP (<http://bioinformatics.charite.de/supercyp>) [18] имеется информация о том, что взаимодействующие с CYP51 соединения (согласно SPR анализу) являются ингибиторами ряда изоформ микросомальных цитохромов P450 (1A2, 2C8, 2C9, 2B6, 2E2, 3A4), которые, в свою очередь, проявляют межвидовую функциональную консервативность и гомологичны CYP51 патогенных грибов. Мы предположили, что изучаемые в работе лекарственные соединения могли бы служить в качестве базовых структур для поиска неазольных ингибиторов CYP51 *Candida*. Ранее было показано, что галоперидол и его производные обладают противогрибковой активностью в отношении представителей рода *Candida* [19]. Поэтому для проверки этой гипотезы *in silico* была использована структура галоперидола, который, согласно молекулярному докингу, мог связываться в активном центре CYP51 как *Candida albicans*, так и *Candida glabrata* с благоприятными значениями энергии связывания (табл. 2) в сравнении с остальными соединениями, а также показал позитивный результат в SPR анализе (рис. 1). Выполненный с помощью Web-сервиса SwissSimilarity поиск в базе данных ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) структурных производных галоперидола с коэффициентами подобия $\geq 0,6$ и проявляющих разный спектр биологической активности при концентрациях <10 мкМ выявил только 11 соединений, для которых была предсказана антимикотическая активность (Web-сервис FungiPAD) и активность в отношении CYP51 (Web-сервис PassOnline). Для всех отобранных структур был выполнен молекулярный докинг ко всей поверхности белка-мишени CYP51 *Candida albicans* на Web-сервисе SwissDock (табл. 3). Из таблицы 3 видно, что для 4 структур с коэффициентом подобия галоперидолу ниже 0,8 не было предсказано сайтов связывания в активном центре CYP51. Для структур с коэффициентом подобия $>0,8$ были построены модели комплексов с CYP51 с разными величинами расчётной энергии связывания. Анализ этих данных подтвердил, что как галоперидол, так и некоторые его структурные производные (показавшие в ряде

СКРИНИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ CYP51

Таблица 3. Описание моделей комплексов структурных производных галоперидола с CYP51 *Candida albicans*

Web-сервис	Swiss similarity	PASS Online	SwissDock				
База данных ChEMBL (ID №)	Коэффициент подобия	ра/рi*	кластер	FullFitness** (ккал/моль)	Энергия связывания, ΔG (ккал/моль)	Водородные связи с а.о. белка	SimpleFitness** (ккал/моль)
1940402	0,974	0,217/0,007	0(0)	-2195	-9,0	нет	-25,77
1036	0,963	0,169/0,018	0(5)	-2173	-8,2	Tyr118	-6,44
			16(0)	-2178	-8,8	Tyr132, Gly303	-4,28
1946123	0,93	0,182/0,013	0(0)	-2179	-9,1	нет	-13,08
1940404	0,907	0,201/0,009	0(2)	-2192	-8,7	нет	-13,04
59213	0,865	0,165/0,020	16(2)	-2181	-7,3	Tyr132	-22,27
1946122	0,845	0,169/0,018	36(0)	-2135	-6,2	Tyr132	37,90
			0(0)	-2182	-8,96	нет	-5,63
456430	0,840	0,182/0,013	0(0)	-2166	-8,2	нет	6,20
1940403	0,816	0,162/0,020	0(3)	-2189	-8,5	нет	-11,79
392753	0,666	0,222/0,006	нет	—	—	—	—
228913	0,664	0,198/0,009	нет	—	—	—	—
232066	0,613	0,198/0,009	нет	—	—	—	—

Примечание: *ра/рi — предсказание вероятности наличия/отсутствия ингибирующей активности соединения в отношении CYP51 по данным Pass Online: ра — вероятность того, что соединение будет иметь данную активность, рi — вероятность того, что соединение будет не иметь данной активности; ** — параметры оценочной функции докинга в приложении SwissDock (см. подробно [12, 13]), а.о. — аминокислотный остаток.

случаев более выгодные значения энергии связывания) могли связываться в активном центре CYP51 *Candida albicans*. Следовательно, базовая структура галоперидола может рассматриваться в качестве скаффолда потенциального неазольного ингибитора CYP51.

Далее на основе галоперидола была сформирована библиотека, состоящая из 22 структур с модификациями различных химических групп (табл. 4), физико-химические свойства которых приведены на рисунке S2 дополнительных материалов. Каждую структуру докировали ко всей поверхности CYP51 *Candida albicans*. Поскольку известно, что замещение молекулы воды у атома железа гема характерно для ингибиторов цитохромов P450 [20, 21], то особый интерес представляли структуры, функциональные группы которых теоретически могли быть способны образовывать координационную связь с атомом железа гема. С этой точки зрения, замещение атома хлора или фтора на гидроксильную группу в структуре галоперидола (дополнительные материалы, табл. S1) может создавать условия взаимодействия последней с атомом железа гема. Оценка возможности образования координационной связи с атомом железа гема была выполнена путём измерения расстояния и угла между атомом кислорода гидроксила в структурах и атомом железа с помощью программы Chimera X 1.1. Критериями для возможного образования координационных связей выбрали расстояние от атома кислорода гидроксильной группы соединения до железа гема от 2,5 Å до 3,5 Å. Последнее следовало из анализа известных кристаллов CYP51 в комплексе с ингибитором (PDB ID 3LD6) и субстратом (PDB ID 6UEZ), а также из работ [22, 23]. При этом связь между кислородом

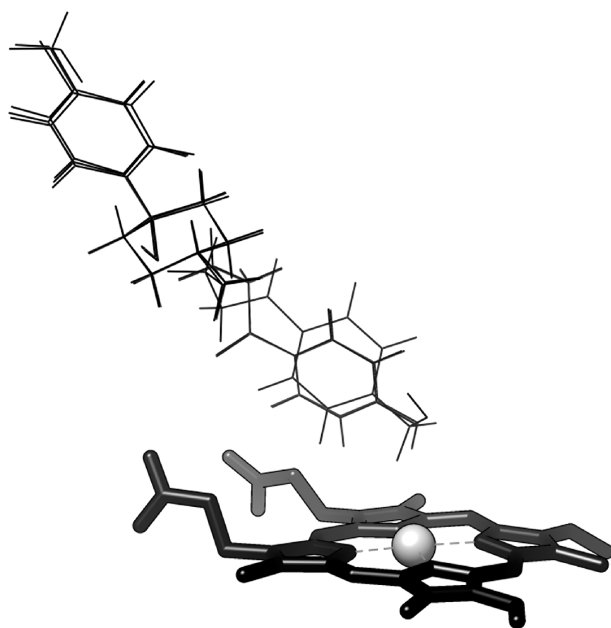
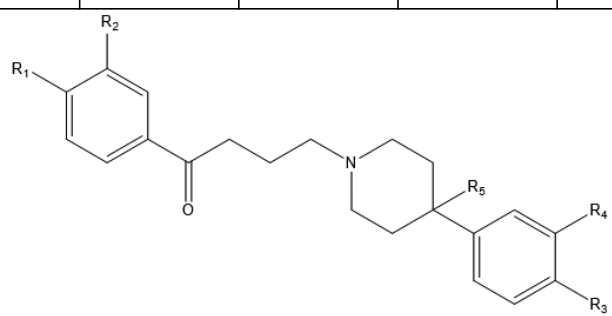
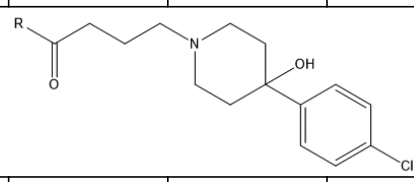
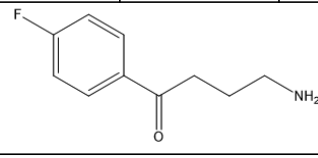
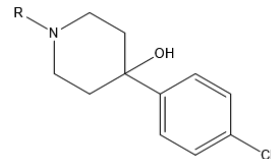


Рисунок 3. Предсказание ориентации производных галоперидола (структуры № 3, 12, 13 (таблица 4)) относительно плоскости гема в активном центре CYP51 *Candida albicans* (по данным молекулярного докинга в SwissDock).

гидроксила низкомолекулярного соединения и атомом железа гема (N--Fe--O угол) должна была быть перпендикулярна плоскости гема (отклонение угла от 90° не должно было превышать 10°). Пример возможной ориентации структур 3, 12, 13 (табл. 4), которые, предположительно, смогут образовывать координационную связь с атомом железа, показан на рисунке 3.

Таблица 4. Структуры производных галоперидола (соединение №0) с модифицированными химическими группами

№ структуры	R1	R2	R3	R4	R5	MCS*	Tc**
							
0	-F	-H	-Cl	-H	-OH	1	1
1	-H	-H	-Cl	-H	-OH	0,9615	0,7908
2	-H	-OH	-Cl	-H	-OH	0,9259	0,7241
3	-OH	-H	-Cl	-H	-OH	0,9259	0,8571
4	-NH ₂	-H	-Cl	-H	-OH	0,9259	0,8571
5	-H	-NH ₂	-Cl	-H	-OH	0,9259	0,7195
6	-F	-H	-OH	-H	-OH	0,9259	0,8571
7	-F	-H	-H	-OH	-OH	0,9259	0,7241
8	-F	-H	-H	-NH ₂	-OH	0,9259	0,7195
9	-F	-H	-NH ₂	-H	-OH	0,9259	0,8571
10	-F	-H	-H	-H	-OH	0,9615	0,7908
11	-H	-H	-H	-H	-OH	0,9231	0,6243
12	-OH	-H	-OH	-H	-OH	0,8571	0,7379
13	-CH ₂ OH	-H	-CH ₂ OH	-H	-OH	0,8000	0,6463
14	-F	-H	-CN	-H	-OH	0,8000	0,6463
15	-CN	-H	-Cl	-H	-OH	0,8929	0,7978
16	-F	-H	-Cl	-H	-CH ₂ OH	0,8929	0,8419
							
—	R	—	—	—	—	—	—
17	-OH	—	—	—	—	0,7037	0,5236
18	-COOH	—	—	—	—	0,7037	0,52366
19						0,5000	0,1958
							
—	R	—	—	—	—	—	—
20	-H	—	—	—	—	0,5385	0,2307
21	-CH ₂ CH ₂ OH	—	—	—	—	0,5926	0,3519
22	-CH ₂ OH	—	—	—	—	0,5556	0,3126

Примечание. *MCS — коэффициент максимального подобира подструктуры (от англ. Maximum Common Substructure), является мерой предсказания подобира химической структуры и активности. Варьирует от 0 (нет сходства) до 1 (полная идентичность). Коэффициент рассчитан относительно молекулы галоперидола с помощью Web-сервера ChemMine [16]. **Tc — коэффициент подобира Танимото (от англ. Tanimoto coefficient). Предназначен для оценки сходства двух множеств, варьирует от 0 (нет сходства) до 1 (полная идентичность). В случае химических соединений это соотношение между числом консервативных признаков двух молекул и общим числом всех признаков каждой молекулы. Коэффициент рассчитан относительно молекулы галоперидола с помощью Web-сервера ChemMine [16].

ОБСУЖДЕНИЕ

Предсказанные молекулярным докинг-ом сайты связывания галоперидола, ибупрофена и ацетилсалициловой кислоты находились в активном центре CYP51. Анализ результатов выравнивания аминокислотных последовательностей CYP51 (дополнительные материалы, рис. S3) показал, что связывание может происходить по функционально важным консервативным аминокислотным остаткам тирозина альфа-спиралей в положениях Tyr118 и Tyr127 (CYP51 *Candida albicans*) и Tyr132 и Tyr141 (CYP51 *Candida glabrata*). Так, согласно литературным данным, остатки тирозина участвуют в связывании азольных ингибиторов и определяют ферментативную активность CYP51 [24, 25]. Ацетилсалициловая кислота и ибупрофен связывались с CYP51 *Candida albicans* и CYP51 *Candida glabrata* в концентрациях выше 10 мкМ, что говорит о невысокой аффинности этих соединений к CYP51. В этом контексте соединения, репозиционируемые как антимиотики, могут быть лишь основой для дизайна новых структур неазольных ингибиторов CYP51. Для проверки этого тезиса *in silico* выясняли, насколько значительные изменения можно вносить в структуру репозиционируемого лекарства без потери его способности взаимодействовать с CYP51 клинически значимых грибов. В качестве примера мы выбрали структуру галоперидола. Была сформирована выборка соединений из базы данных ChEMBL, структурно схожих с галоперидолом (коэффициент подобия >0,8). Для этих соединений были построены модели комплексов с CYP51 с параметрами, близкими к параметрам комплексов галоперидола с CYP51 (табл. 3). Далее решался вопрос о модификациях структуры молекул с целью создания неазольного ингибитора CYP51 клинически значимых грибов. Основным направлением модификаций было введение новых гидроксильных групп, способных формировать координационные связи с атомом железа в геме CYP51 (соединения 2, 3, 6, 7, 12, 13, табл. 4), либо укорочение молекулы галоперидола, которое могло бы позволить гидроксилу пиридинового цикла формировать данную связь (17, 18, 20, 21, 22, табл. 4). В результате были сгенерированы 22 структуры производных галоперидола (табл. 4), которые были докированы в активный центр CYP51 *Candida albicans*. После селекции моделей было обнаружено, что гидроксильные группы структур 3, 8, 10, 12, 13, 21 (табл. 4), полученные замещением атомов галогенов (хлора или фтора), находились в непосредственной близости к атому железа гема CYP51, что указывало на возможность образования координационной связи (дополнительные материалы, табл. S1). Анализ полученных моделей показал, что ближе всего к атому железа была расположена гидроксильная группа, которая замещает атом фтора в молекуле галоперидола — расстояние от кислорода гидроксильной группы структур 3, 12 и 13 (табл. 4) до атома железа составляет 3,65 Å, 3,56 Å и 4,01 Å соответственно. Отклонения значений N--Fe--O углов от 90° для соединений 3, 12, 13 составляли <21°.

Наибольшее отклонение угла (21°) было у соединения 3, а наименьшее у соединения 13 (<8°). Согласно модели комплекса, гидроксильная группа радикала $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (соединение 21) была расположена ближе всего к атому железа гема CYP51 *Candida albicans*. Расстояние от атома кислорода OH группы до атома железа составило 3,12 Å, а отклонение N--Fe--O угла от прямого было <6°. Структуры соединений 8 и 10 в полученных с помощью докинга моделях были ориентированы гидроксильной группой пиридинового кольца к атому железа гема, расстояние составило 3,596 Å и 3,419 Å соответственно. Однако в случае соединений 8 и 10 N--Fe--O угол значительно отклонялся от 90°, что говорит о невозможности формирования координационной связи с вытеснением молекулы воды.

Таким образом, результаты компьютерного моделирования (дополнительные материалы, табл. S1) показали, что введение дополнительных гидроксильных групп в структуру галоперидола увеличивает потенциал производных к образованию координационных связей с атомом железа гема CYP51. Верность предположения о том, что структуры 3, 8, 10, 12, 13, 21 могут позиционироваться в активном центре CYP51, ещё предстоит проверить в экспериментах *in vitro* путём SPR анализа прямого взаимодействия соединений с CYP51 и сравнительного спектрального анализа CYP51 и его комплексов с данными соединениями. Однако известно, что связывание соединения в активном центре CYP51, ближайший атом которого находится на расстоянии менее 6 Å до атома железа гема [22], может нарушать протекание каталитического цикла цитохрома P450, препятствуя связыванию субстрата. В связи с этим следует упомянуть, что нейрорептиктики на основе 1-фенилбутан-1-она обладают рядом побочных эффектов, которые могут быть обусловлены неспецифическим действием на цитохромы P450 человека [26]. Поэтому при дизайне новых структур потенциальных ингибиторов CYP51, используя в качестве базовой структуры галоперидол, следует сфокусировать внимание на изучении селективности их действия и снижения нейрорептиктической активности производных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое распространение резистентности к азольным ингибиторам цитохромов P450 среди патогенных и условно-патогенных штаммов грибов [3] определяет актуальность поиска новых противогрибковых средств. Согласно данным платформы Cortellis ("Clarivate Analytics"), клинические испытания проходят несколько новых ингибиторов CYP51 азольной структуры, однако, существуют патенты и на ингибиторы CYP51 неазольной природы, например, рестриктицин (Cas. № 135357-96-9, "Roche Holding AG"). Соединения 2-(((4-((2-цианозтил) (метил)амино)бензиден)амино)-5-(3,4-диметоксифенил)-4-метилтиофен-3-карбонитрил и 2-(((1,1'-бифенил)-4-илметил)амино)-5-(3,4-диметоксифенил)-4-метилтиофен-3-карбонитрил

продемонстрировали ингибиторную активность в отношении CYP51 *Saccharomyces cerevisiae* и CYP51 *Candida albicans*, при этом не влияли на активность цитохромов P450 человека [27]. С другой стороны, была выявлена противогрибковая активность в отношении 5 разных штаммов возбудителей среди производных бензопирона с короткими алкильными цепями, механизм действия которых связывали с ингибированием CYP51 [28]. Очевидно, что неазольные ингибиторы CYP51 могут представлять альтернативу традиционным азольным ингибиторам и отличаться спектром селективности действия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Биоинформатический анализ и компьютерное моделирование были выполнены в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы). SPR исследования были выполнены при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ), грант №20-04-00014, с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” при Институте биомедицинской химии (финансовая поддержка Минобрнауки в рамках соглашения №075-15-2019-1502 от 5 сентября 2019 года).

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.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., Clancy C.J., Marr K.A., Ostrosky-Zeichner L., Reboli A.C., Schuster M.G., Vazquez J.A., Walsh T.J., Zaoutis T.E., Sobel J.D. (2016) Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am., **62**, e1-50. DOI: 10.1093/cid/civ933.
2. Warrilow A.G., Parker J.E., Kelly D.E., Kelly S.L. (2013) Antimicrob. Agents Chemother., **57**, 1352-1360.
3. Wang F.-J., Zhang D., Liu Z.-H., Wu W.-X., Bai H.-H., Dong H.-Y. (2016) Chin. Med. J. (Engl.), **129**, 1161-1165.
4. Masamrekh R., Kuzikov A., Veselovsky A., Toropygin I., Shkel T., Strushkevich N., Gilep A., Usanov S., Archakov A., Shumyantseva V. (2018) J. Inorg. Biochem., **186**, 24-33.
5. Afeltra J., Verweij P.E. (2003) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol., **22**, 397-407.
6. Stylianou M., Kuleskiy E., Lopes J.P., Granlund M., Wennerberg K., Urban C.F. (2014) Antimicrob. Agents Chemother., **58**, 1055-1062.
7. Lagunin A., Stepanchikova A., Filimonov D., Poroikov V. (2000) Bioinformatics, **16**, 747-748.
8. Shkel T.V., Vasilevskaya A.V., Gilep A.A., Usanov S.A., Chernovetsky M.A., Lukyanea'ko I.G. (2017) Dokl. Nat. Akad. Nauk Belarus, **56**, 64-71.
9. Shkel T.V., Grabovec I.P., Gilep A.A., Varaksa T.S., Strushkevich N.V., Dolgopalets V.I., Charnou Y.G. (2019) Proc. Natl. Acad. Sci. Belarus Chem. Ser., **54**, 450-454.
10. Kim J.H., Chan K.L., Cheng L.W., Tell L.A., Byrne B.A., Clothier K., Land K.M. (2019) Methods Protoc., **2**, 31. DOI: 10.3390/mps2020031.
11. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004) J. Comput. Chem., **25**, 1605-1612.
12. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. (2011) Nucl. Acids Res., **39**, W270-W277.
13. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. (2011) J. Comput. Chem., **32**, 2149-2159.
14. Zoete V., Daina A., Bovigny C., Michielin O. (2016) J. Chem. Inf. Model., **56**, 1399-1404.
15. Wang M.-Y., Wang F., Hao G.-F., Yang G.-F. (2019) J. Agric. Food Chem., **67**, 1823-1830.
16. Backman T.W.H., Cao Y., Girke T. (2011) Nucl. Acids Res., **39**, W486-W491.
17. Goddard T.D., Huang C.C., Meng E.C., Pettersen E.F., Couch G.S., Morris J.H., Ferrin T.E. (2018) Protein Sci. Publ. Protein Soc., **27**, 14-25.
18. Preissner S., Kroll K., Dunkel M., Senger C., Goldsobel G., Kuzman D., Guenther S., Winnenburger R., Schroeder M., Preissner R. (2010) Nucl. Acids Res., **38**, D237-D243.
19. Ji C., Liu N., Tu J., Li Z., Han G., Li J., Sheng C. (2020) ACS Infect. Dis., **6**, 768-786.
20. Schenkman J.B., Remmer H., Estabrook R.W. (1967) Mol. Pharmacol., **3**, 113-123.
21. von Kries J.P., Warrier T., Podust L.M. (2010) Curr. Protoc. Microbiol., **Chapter 17**, Unit17.4. DOI: 10.1002/9780471729259.mc1704s16
22. Shahrokh K., Orendt A., Yost G.S., Cheatham T.E. (2012) J. Comput. Chem., **33**, 119-133.
23. Schlichting I., Berendzen J., Chu K., Stock A.M., Maves S.A., Benson D.E., Sweet R.M., Ringe D., Petsko G.A., Sligar S.G. (2000) Science, **287**, 1615-1622.
24. Chen S.-H., Sheng C.-Q., Xu X.-H., Jiang Y.-Y., Zhang W.-N., He C. (2007) Biol. Pharm. Bull., **30**, 1246-1253.
25. Siqueira T.H., Martínez L. (2020) J. Biomol. Struct. Dyn., **38**, 1659-1669.
26. Gervasini G., Caballero M.J., Carrillo J.A., Benitez J. (2013) ISRN Pharmacol., **2013**, 792456. DOI:10.1155/2013/792456.
27. Tani N., Rahnasto-Rilla M., Wittekindt C., Salminen K.A., Ritvanen A., Ollakka R., Koskiranta J., Raunio H., Juvonen R.O. (2012) Eur. J. Med. Chem., **47**, 270-277.
28. Lv Z., Sheng C., Zhang Y., Wang T., Feng J., Sun H., Zhong H., Zhang M., Chen H., Li K. (2010) Bioorg. Med. Chem. Lett., **20**, 7106-7109.

Поступила в редакцию: 29. 10. 2020.
После доработки: 30. 11. 2020.
Принята к печати: 02. 12. 2020.

SCREENING OF POTENTIAL NON-AZOLE INHIBITORS
OF LANOSTEROL 14-ALPHA DEMETHYLASE (CYP51) OF *CANDIDA* FUNGI

L.A. Kaluzhskiy¹*, P.V. Ershov¹, E.O. Yablokov¹, Y.V. Mezentshev¹,
O.V. Gnedenko¹, T.V. Shkef², A.A. Gilep², S.A. Usanov², A.S. Ivanov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: leonid.kaluzhskiy@ibmc.msk.ru

²Institute of Bioorganic Chemistry, 5, bld. 2 Kuprevich str., Minsk, 220141 Belarus

Currently, opportunistic fungi of the genus *Candida* are the main causative agents of mycoses, which are especially severe upon condition of acquired immunodeficiency. The main target for the development of new antimycotics is the cytochrome P450 51 (CYP51) of the pathogenic fungus. Due to the widespread distribution of *Candida* strains resistancy to inhibitors of the azole class, the screening for CYP51 inhibitors both among non-azole compounds and among clinically used drugs repurposing as antimycotics is becoming urgent. To identify potential inhibitors from the non-azole group, an integrated approach was applied, including bioinformatics analysis, computer molecular modeling, and a surface plasmon resonance (SPR) technology. Using *in silico* modeling, the binding sites for acetylsalicylic acid, ibuprofen, chlorpromazine and haloperidol (this compounds, according to the literature, showed antimycotic activity) were predicted in the active site of CYP51 of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. The K_d values of molecular complexes of acetylsalicylic acid, ibuprofen and haloperidol with CYP51, determined by SPR analysis, ranged from 18 μ M to 126 μ M. It was also shown that structural derivatives of haloperidol, containing various substituents, could be positioned in the active site of CYP51 of *Candida albicans* with the possible formation of coordination bonds between the hydroxyl groups of the derivatives and the iron atom in the heme of CYP51. Thus, the potential basic structures of non-azole compounds have been proposed, which can be used for the design of new CYP51 inhibitors of *Candida* fungi.

Key words: CYP51 inhibitors; surface plasmon resonance; docking; antimycotic; drugs

Funding. Bioinformatic analysis and computer modeling were done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021-2030. SPR studies were funded by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant no. 20-04-00014, using the equipment of “Human Proteome” Core Facility of the Institute of Biomedical Chemistry (funded by MINOBRNAUKI, Agreement no. 075-15-2019-1502 from 5 September 2019).

Received: 29.10.2020, revised: 30.11.2020, accepted: 02.12.2020.