

УДК: 577.152.3.

©Коллектив авторов

АЗОЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЦИТОХРОМА P450 51A (*Mycobacterium tuberculosis*): МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ И ПРЕДСКАЗАНИЕ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ

Скворцов В.С., Карузина И.И., Иванов А.С., Арчаков А.И.

ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН им. В.Н. Ореховича
119121, г.Москва, ул. Погодинская д.10; тел.: 245-0768; факс: 245-0857;
эл.почта: vladlen@ibmh.msk.su

Работа посвящена созданию оценочной функции, которая могла бы быть использована для поиска и создания азольных ингибиторов с высоким сродством к цитохрому P450 51A (*Mycobacterium tuberculosis*). Актуальность работы определяется потенциальной возможностью использовать такие вещества как противотуберкулёзные средства. В работе рассматривается набор регрессионных уравнений, построенных для предсказания спектральной константы связывания. Ряд предсказаний был проверен экспериментально.

Ключевые слова: цитохром P450, азолы, молекулярное моделирование.

ВВЕДЕНИЕ. Цитохромы P450 являются гемсодержащими монооксигеназами - ферментами, присущими почти всем живым существам и окисляющими как эндогенные, так и экзогенные низкомолекулярные органические соединения. К этому обширному надсемейству принадлежит и цитохром P450 51A из *Mycobacterium tuberculosis* (CYP51Amtu). К сожалению, о его реальной роли в жизни микобактерии пока точно ничего не известно, в то же время, хорошо известна роль аналогичных белков у эукариот (участие в биосинтезе холестерина), растений - (синтез фитостеролов) и грибов (синтез эргостерола). Однако, наиболее интересным фактом является то, что азольные ингибиторы CYP51A - широко известные противогрибковые препараты, например, клотримазол, низорал (кетконазол), итраконазол [1,2]. Это послужило отправной точкой в попытке использовать азольные ингибиторы CYP51Amtu в качестве противотуберкулёзных препаратов.

Вычислительные методы при создании азольных ингибиторов широко применялись и ранее [3]. В основном это были методы так называемого "de novo design". Число известных азольных соединений, которые могли бы эффективно ингибировать CYP51Amtu, достаточно велико. Тем не менее, представляется интересным сочетание проверки уже известных ингибиторов (имея в виду моделирование их комплексов с белком) с их виртуальной модификацией и созданием существенно отличных структур. Необходимой предпосылкой при этом является знание трехмерной структуры участка связывания молекулы-лиганда в белке, что в данном случае выполнимо: имеется трёхмерная структура комплекса CYP51Amtu с ингибитором флуконазолом (файл: 1ea1 в Protein Data Bank [4]). Кроме того, критичным является наличие быстрого метода сравнения возможных ингибиторов между собой.

Данная работа посвящена созданию оценочной функции, которая могла бы быть использована для поиска и создания азольных ингибиторов с высоким сродством к CYP51Amtu.

МЕТОДИКА. В качестве базовой структуры для моделирования комплексов азольных ингибиторов и CYP51Amtu использовался комплекс CYP51Amtu с флуконазолом (PDB 1ea1). Данные о спектральных константах связывания 7 азольных ингибиторов были получены группой профессора S.Kelly [1,5] и представлены в таблице

1. Необходимо отметить, что азольные ингибиторы связываются с цитохромами по второму типу, т.е. образуют комплексную связь между атомом железа гема и одним из азотов азольного кольца.

Таблица 1. Спектральные константы связывания (K_s) ингибиторов CYP51Amtu.

Ингибитор	K_s , мкМ
Тебуконазол	2,55
Флуконазол	21,16
Кетоконазол	4,74
Итраконазол	1,96
Триадеминол	25,51
Миконазол	1,01
Клотримазол	0,53

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Моделирование комплексов. Моделирование всех 7 комплексов проводилось с использованием программы AutoDock [6]. Выбор программы докинга в немалой степени был обусловлен тем, что среди имеющихся азольных ингибиторов большинство не просто конформационно подвижны, а имеют очень большое число связей, вокруг которых возможно вращение. Существенную проблему представляла имеющаяся координационная связь между атомом азота ингибитора и атомом железа цитохрома. Решена эта проблема была следующим образом:

В качестве мишени для докирования использовался модифицированный (относительно файла из PDB) CYP51Amtu. Атом железа был углублен в сторону цистеина (аналогично пяти-координационной форме).

По результатам докирования комплексы отбирались по оценочной функции программы AutoDock, но только среди тех вариантов, у которых атом азота азольного кольца был расположен в непосредственной близости от атома железа.

Задавалась связь "азот-железо" и проводилась оптимизация структуры комплекса по комбинированной схеме (сольватация, краткая минимизация, краткая молекулярная динамика (5 пс) в условиях сохранения общей энергии системы и нулевыми начальными скоростями, продолжительная минимизация) [7].

Так как эта же процедура выполнялась и для комплекса CYP51Amtu с флуконазолом, то сравнение полученного результата с кристаллической структурой позволяет надеяться, что данная процедура адекватна (рис.1). Суперпозиция всех 7 ингибиторов приведена на рисунке 2а. Для удобства ингибиторы разделены на 2 группы. Видно что для таких ингибиторов как кетоконазол (рис.2d) и итраконазол (рис.2с) были получены весьма близкие положения, в то время как расположение заместителей у небольших ингибиторов более вариабельно. Кроме вышеперечисленных 7 ингибиторов были смоделированы комплексы ещё 30 азольных молекул, взятых из базы данных MDDR фирмы "MDL Information Systems" [8], имеющих сходную активность на различных цитохромах P450. В данной статье будут рассмотрены 2 из них (доконазол и парконазол), для которых была выполнена экспериментальная проверка.

Расчёт параметров комплексов.

Для каждого полученного комплекса был рассчитан набор параметров, которые впоследствии были использованы в качестве независимых переменных при построении

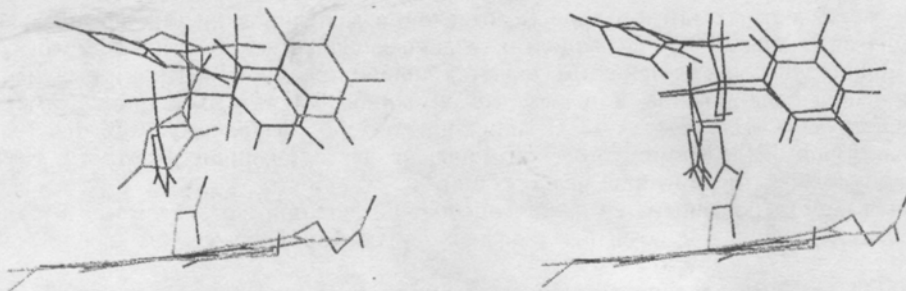


Рисунок 1.

Сравнение положения флуконазола в активном центре цитохрома P450MT, полученного после докинга (слева) и последующей минимизации (справа) с положением в кристалле.

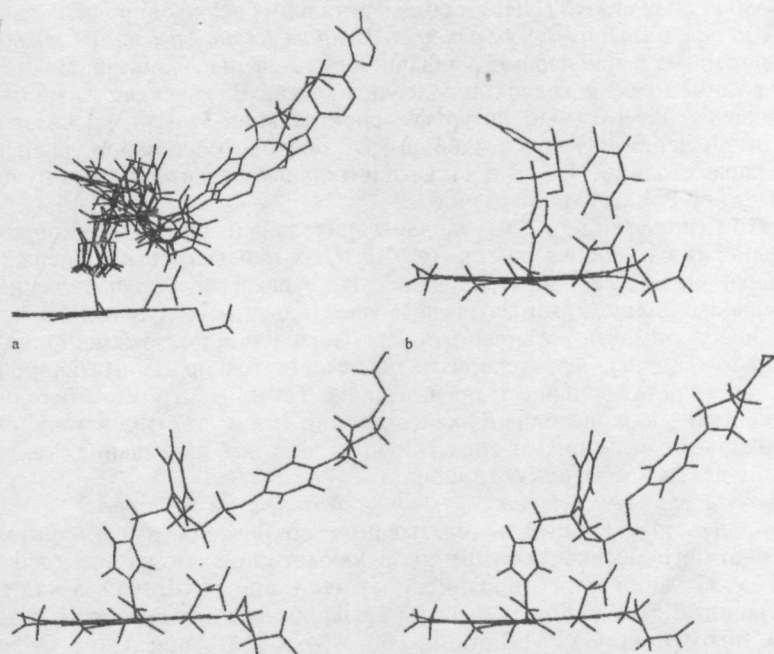


Рисунок 2.

Пространственное наложение наилучших позиций 7 ингибиторов полученных в результате докирования к CYP51Amtu и последующей минимизации (а). Отдельно показаны: флуконазол (b), итраконазол (с) и кетоконазол (d).

корреляционных уравнений. Ниже приведены те из них которые вошли в уравнения, обсуждаемые в настоящей работе:

1. Величина электростатического взаимодействия лиганда и макромолекулы (EI). 1-4 взаимодействия в "окружении комплексной связи" не учитывались, считая, что их вклад, как и вклад собственно связи N-Fe для всех ингибиторов одинаков.

2. Величина скрытой поверхности комплекса (buried surface, BS). Данный параметр хорошо коррелирует с ван-дер-ваальсовым взаимодействием (рис.3), но менее чувствителен к неточностям при оптимизации структуры комплекса.

3. Величина "гидрофобного взаимодействия" молекул (MLP). Данная величина

$$MLP = \frac{\sum_{i=1}^{N(\text{лиганд})} \sum_{j=1}^{N(\text{мишень})} f_i f_j \cdot g(d_{ij})}{\sum_{j=1}^{N(\text{мишень})} g(d_{ij})}$$

$$g(d_{ij}) = \frac{e^{-C_1 C_2} + 1}{e^{-C_1(d_{ij} - C_2)} + 1}$$

рассчитывается на основе молекулярного потенциала липофильности [9] (расчёт проводится только для атомов расположенных на расстоянии не более 5,5 Å):

d_{ij} - расстояние от j-го атома пространства до i-го атома,

C_1 и C_2 - константы Ферми, эмпирически определенные как 1 и 4 соответственно,

f_i (f_j) - криппеновские частичные липофильности атомов.

Полученное значение характеризует комплементарность гидрофобных и гидрофильных участков на поверхностях лиганда и белка-мишени. Эта величина является условной оценкой и не несёт физического смысла.

4. Энергия водородного связывания в комплексе. Энтальпия каждой водородной связи оценивалась по методу предложенному одним из авторов в соавторстве с О.А.Раевским и реализованной в программе 3D HVBOT [10]. Учитывались только те связи, для которых значение вычисленной энтальпии было меньше -0,1 ккал/моль (т.е.

слабые взаимодействия игнорировались). Как независимые переменные, использовались число водородных связей (NHb) и общая энтальпия всех водородных связей (HHb).

Создание базовой модели для предсказания Ks по 7 азольным ингибиторам.

Описанные выше параметры были использованы как независимые переменные для создания линейных регрессионных уравнений. В качестве зависимой переменной использовался натуральный логарифм спектральной константы связывания. Диапазон изменения значений $\ln(K_s)$ - от -0,64 до 3,24. Был построен набор уравнений с различным числом параметров (5, 4, 3, 2 и 1). Сравнительные характеристики лучших уравнений в каждой группе приведены в таблице 2.

Из таблицы видно, что удовлетворительный или даже хороший результат, с формальной точки зрения, дают 5-ти, 4-х и 3-х параметровые модели (рис.4). Конечно, число переменных для 7-ми наблюдений для первых двух случаев велико, тем не менее, процедура скользящего контроля позволяет надеяться, что мы на правильном пути. Однако, необходимость увеличения числа наблюдений неизбежно привела нас к попытке получить эти данные из эксперимента самостоятельно. Попутно, решалась и другая задача: проверка правильности предсказания. Такой эксперимент был поставлен. Выбор доконазола и парконазола в качестве объектов тестирования определялся как предсказанными величинами спектральных констант связывания, так и возможностью получения чистых образцов соединений.

Определение константы связывания азольных ингибиторов.

Определение константы связывания доконазола и парконазола проводилось спектрофотометрическим методом по двухкюветной схеме на спектрофотометре Hewlett Packard 8453. Азолы растворялись в смеси ацетон/ДМСО в соотношении 1:1 в концентрации 2,5 мМ. Контрольная и экспериментальная кюветы содержали 0,8 мкМ раствор цитохрома CYP51Amtu в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH = 7,4), содержащем 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и 20% глицерина. Экспериментальную кювету титровали ингибиторами в диапазоне концентраций от 0,02 до 40 мкМ. Соответствующие аликвоты растворителя добавлялись в контрольную кювету. Дифференциальные спектры поглощения были записаны в диапазоне от 400 до 450 нм.

Таблица 2. Характеристики различных вариантов регрессионных уравнений (обучающая выборка состоит из 7 наблюдений).

Число параметров	5	4	3	2	1
Наличие постоянного члена	нет	нет	нет	нет	нет
R^2 настройки	0,98	0,88	0,86	0,74	0,46
Среднеквадратичная ошибка настройки	0,02	0,22	0,27	0,48	0,99
Максимальная ошибка настройки	0,23	0,86	0,99	0,94	1,93
R^2 при процедуре скользящего контроля	0,89	0,70	0,74	0,55	0,40
Среднеквадратичная ошибка при скользящем контроле	0,21	0,61	0,52	0,84	1,10
Максимальная ошибка при скользящем контроле	0,49	1,29	1,34	1,17	1,93

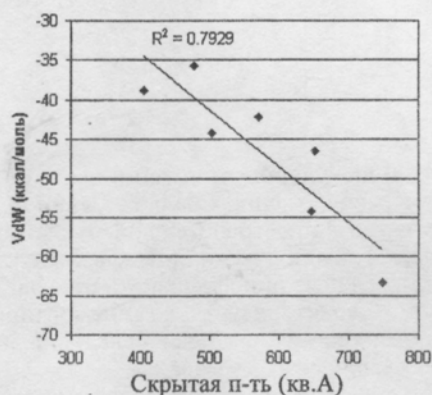


Рисунок 3.

Соотношение величины скрытой поверхности комплекса и величины ван-дер-ваальсового взаимодействия.

Таблица 3. Корреляционная матрица независимых переменных и целевой величины (выборка состоит из 9 наблюдений).

Параметр	EI	MLP	BS	NHb	HHb	ln(Ks)
EI	1,00					
MLP	-0,14	1,00				
BS	-0,73	0,07	1,00			
NHb	0,03	0,03	0,28	1,00		
HHb	-0,09	-0,26	-0,02	-0,84	1,00	
ln(Ks)	0,22	0,64	-0,07	0,14	-0,53	1,00

Таблица 4. Характеристики различных вариантов регрессионных уравнений (обучающая выборка состоит из 9 наблюдений).

Число параметров	5	4	3	2	1
Наличие постоянного члена	нет	нет	нет	нет	нет
R^2 настройки	0,98	0,92	0,71	0,55	0,41
Среднеквадратичная ошибка настройки	0,07	0,32	1,17	1,82	2,38
Максимальная ошибка настройки	0,48	1,02	2,43	3,29	3,31
R^2 при процедуре скользящего контроля	0,79	0,71	0,43	0,36	0,33
Среднеквадратичная ошибка при скользящем контроле	0,41	1,59	3,38	2,66	2,77
Максимальная ошибка при скользящем контроле	1,07	2,23	3,8	3,61	3,63

Полученные для доконазола и парконазола спектры связывания соответствуют второму типу, с характерным минимумом на 418 нм и максимумом на 432 нм. Амплитуда спектра увеличивалась в зависимости от добавленной концентрации ингибитора, достигая насыщения при концентрации $x > 5$ мкМ для доконазола и $> 0,4$ мкМ для парконазола. Для определения константы связывания была построена зависимость разности поглощения в экстремумах спектра от концентрации добавленного ингибитора в обратных координатах.

На рисунке 4 приведено сравнение предсказанных и экспериментально измеренных величин $\ln(K_s)$ для доконазола и парконазола. Видно что величины очень близки (отклонения составляют 0,07 и 1,4 соответственно). Показательно, что величина, предсказанная для парконазола, лежит вне диапазона значений $\ln(K_s)$ обучающей выборки, тем не менее, в случае 5-ти параметровой модели величина предсказана достаточно точно.

Уточнённая модель модели предсказания K_s по 9 азольным ингибиторам.

Так как в результате экспериментальных измерений было добавлено 2 наблюдения, весь набор регрессионных уравнений был пересчитан. Диапазон значений при этом расширился (от -3.91 до 3.24). Результаты представлены в таблицах 3, 4 и на рисунке 5.

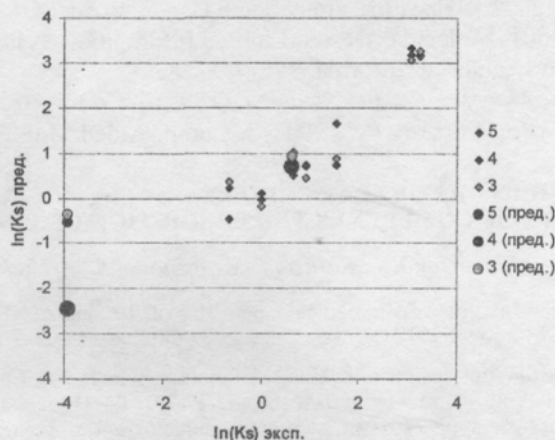


Рисунок 4.

Предсказанные по 5-ти, 4-х и 3-х параметровой модели и наблюдаемые K_s (кружками отмечены доконазол и парконазол, ромбами ингибиторы из обучающей выборки).

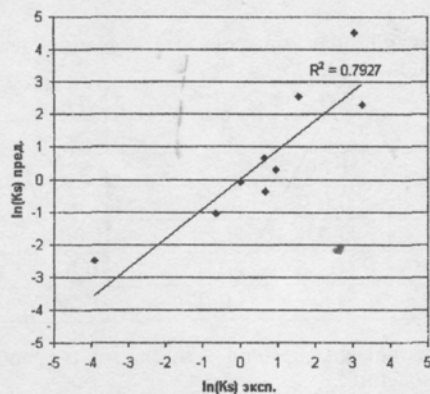


Рисунок 5.

Сравнение экспериментальных величин констант связывания с величинами, предсказанными при процедуре скользящего контроля.

Из анализа процедуры скользящего контроля следует, что полученное регрессионное уравнение демонстрирует хорошую предсказательную способность. Необходимо отметить, что коэффициенты при переменных для уравнений, построенных по 7 и 9 наблюдениям, очень близки. Тем не менее, учитывая малый размер выборки, было бы преждевременно считать, что полученные с помощью данного уравнения предсказания будут всегда точны. Необходимым представляется увеличение размера обучающей выборки, что и планируется в ближайшее время.

Авторы благодарят за поддержку Center for Molecular Design (подразделение Janssen Research Foundation, Бельгия).

ЛИТЕРАТУРА.

1. Jackson C.J., Lamb D.C., Marczylo T.H., Parker J., Manning N.L., Kelly D.E., Kelly S.L. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 558-563.
2. Lamb D.C., Kelly D.E., Kelly S.L. (1998) *FEBS Lett.*, **425**, 263-265.
3. Kelly S.L., Lamb D.C., Kelly D.E. (1999) in: *Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes* (E. Arinc ed.) Kluwer Academic, New-York, pp. 157-172.
4. Podust L.M., Poulos T.L., Waterman M.R. (2001) *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, **98**, 3068.
5. Jackson C.J., Lamb D.C., Kelly D.E., Kelly S.L. (2001) in: *Proceedings of 12th International Conference on Cytochrome P450 Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*, La Grande Motte, France, P312.
6. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R.S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K. and Olson A. J. (1998) *J. Comp. Chem.*, **19**, 1639-1662.
7. Sybyl 6.9, 2002, -Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, Missouri, 63144. USA.
8. MDDR, 2001, Molecular Design Limited Information Systems, Inc., 14600 Catalina Street, San Leandro, California, 94577, USA.
9. Heiden W., Moeckel, G., Brickmann J. (1993) *J. Comp.-Aided Mol. Des.*, **7**, 503-514.
10. Raevsky O.A., Skvortsov V.S. (2002) *J. Comp.-Aided Mol. Des.*, **16**, 1-10.

AZOLE INHIBITORS OF CYTOCHROME P450 51A (*Mycobacterium tuberculosis*): MODELLING OF COMPLEXES AND PREDICTION OF BINDING PROPERTIES

Skvortsov V.S., Karuzina I.I., Ivanov A.S., Archakov A.I.

V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences
10 Pogodinskay str., Moscow, 119121, Russia; tel: 245-07-68; fax: 245-08-57; e-mail: vladlen@ibmh.msk.su

This paper deals with design of evaluation function, which could be used for search and creation of azole inhibitors having affinity with cytochrome P450 51A (*Mycobacterium tuberculosis*). This is important due to possible application of such compounds as antituberculous drugs. A set of regression equations for prediction of spectral binding constant has been considered. Several of predictions were experimentally tested.

Key words: cytochrome P450, azoles, molecular modeling.