

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.1

©Коллектив авторов

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С НЕОБРАТИМЫМИ И ОБРАТИМЫМИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ ИНГИБИТОРАМИ

О.В. Тихонова^{1,2}, В.С. Скворцов^{1,2}, О.А. Раевский²*

¹Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН, Москва;
тел.: +7-499-246-1641; эл. почта: ovt@ibmh.msk.su

²Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка,
Московская область

Методами молекулярного моделирования построены трёхмерные модели количественной взаимосвязи структура-активность (3D-QSAR) для необратимых и обратимых фосфорорганических ингибиторов ацетилхолинэстеразы. В случае необратимых ингибиторов дескрипторы CoMFA (сравнительный анализ молекулярных областей) или CoMSIA (сравнительный анализ индексов молекулярного подобия) при совместном использовании с полями HYBOT 3D обеспечивают получение более статистически достоверных моделей 3D-QSAR, что указывает на важность донорно-акцепторных взаимодействий для необратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы. В случае обратимых фосфорорганических ингибиторов модель, которая хорошо описывает взаимосвязь структура-активность, была построена с использованием полей CoMFA. Полученные модели обладают хорошей предсказательной силой и могут использоваться для оценки ингибиторной активности новых фосфорорганических соединений, которая, в свою очередь, коррелирует с токсичностью данных соединений.

Ключевые слова: Ацетилхолинэстераза, молекулярное моделирование, 3D-QSAR, HYBOT 3D, обратимые и необратимые ингибиторы.

ВВЕДЕНИЕ. Ацетилхолинэстераза (АХЭ; КФ 3.1.1.7) - хорошо известная мишень для многих биологически активных веществ, обладающих широким спектром действия: от лекарственных средств для лечения болезни Альцгеймера [1, 2] до пестицидов и отравляющих веществ, оказывающих нервно-паралитическое действие [3, 4]. Такое разнообразие биологических ответов организма на ингибирование АХЭ химическими соединениями объясняется в основном различиями в механизме ингибирования, связанного с наличием нескольких участков связывания в активном центре фермента (каталитическая триада и периферический участок связывания) и особенностями связывания ксенобиотиков с белком.

Выделяют три основных механизма взаимодействия ингибиторов с АХЭ. Первый, необратимое связывание, характерное для большинства фосфорорганических соединений (ФОС), представляет собой реакцию фосфорилирования фермента с образованием ковалентной связи между атомом фосфора ингибитора и кислородом ОН-группы серина, входящего в каталитическую триаду. Последующая реакция элиминации ("aging"), обычно включающая дезалкилирование или дезаминирование фосфорного конъюгата, приводит к образованию формы фермента, которую невозможно реактивировать известными антидотами, такими как оксимы [5, 6]. Второй механизм -

* - адресат для переписки

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С ИНГИБИТОРАМИ

псевдонеобратимое ингибирование АХЭ - также включает в себя образование ковалентной связи с остатком серина, но в данном случае фермент быстро подвергается спонтанной реактивации. Подобным образом действуют карбаматные производные и некоторые ФОС [6-8]. Третий механизм - обратимое ингибирование - обычно характерен для соединений различных химических классов, взаимодействующих с периферическим анионным участком связывания (PAS), который вовлечен в механизм "перекрестной связи" с активным центром фермента. В этом случае ингибирование осуществляется посредством водородных связей, π - π -стэкинг или π - π -взаимодействий. Так ведут себя производные такрина, галантамина, E2020 и др. [9-11].

Учитывая важность АХЭ, данный фермент и его ингибиторы неоднократно становились объектами исследований кристаллических структур комплексов, а также и объектами молекулярного моделирования [12]. Существует более 80 кристаллических структур АХЭ из различных организмов, включая комплексы с разными лигандами, помещенные в Protein Data Bank (PDB) [13]. Также имеются публикации по сравнительному анализу моделей QSAR и исследованиям процедур докинга для различных рядов химических соединений, включая ФОС [14-16]. В данных работах была показана важность гидрофобных и электростатических эффектов при связывании изучаемых соединений с ферментом (в основном обратимых ингибиторов, взаимодействующих с периферическим участком связывания). Моделирование комплексов АХЭ с известными ингибиторами, проведенные Bernard et al., показало, что ароматические и катионные уходящие группы ФОС ориентированы по направлению ко входу в активный центр [14]. Такая ориентация является благоприятной для взаимодействия с атомом фосфора, что также продемонстрировали для ингибиторов с тиохолиновой уходящей группой [17]. В работах по QSAR было показано, что ингибиторная активность ФОС напрямую связана с лабильностью фосфоэфирной связи уходящей группы и доказана важность стерических эффектов при связывании ингибиторов [3].

Неоднократно отмечалось, что токсичность ФОС напрямую связана с ингибированием АХЭ [3, 4, 18]. Используя регрессионный анализ, Maxwell et al. показали, что 93% изменений в величинах токсичности для крыс (LD_{50}) фосфорорганических соединений объясняется различиями в их константах ингибирования АХЭ [19].

Ранее О.А. Раевским с соавторами [20] были разработаны модели QSAR на основе дискретно-регрессионного анализа для фосфорильных и тиофосфорильных соединений. Данные соединения ингибируют АХЭ эритроцитов крови человека как необратимым, так и обратимым образом. Было обнаружено, что зависимость констант ингибирования АХЭ от информационно-топологических, физико-химических и донорно-акцепторных дескрипторов весьма существенно различается для соединений имеющих обратимый и необратимый механизм ингибирования. В настоящей работе фосфорорганические соединения из указанной выше работы были использованы для молекулярного моделирования комплексов ингибиторов с АХЭ, призванного прояснить механизмы взаимодействия обратимого и необратимого ингибирования фермента. На основании этих комплексов были построены трехмерные модели взаимосвязи структура-активность (3D-QSAR), способные предсказывать величины ингибиторной активности, что, в свою очередь, может позволить оценивать токсичность исследуемых соединений.

МЕТОДИКА.

Создание выборок необратимых и обратимых ингибиторов АХЭ и подготовка их к моделированию. Структуры необратимых и обратимых ингибиторов АХЭ и данные о величине их ингибиторной активности были предоставлены сотрудниками отдела компьютерного молекулярного дизайна ИФАВ РАН. Построение трехмерных моделей молекул, расчет частичных атомарных зарядов и геометрическая оптимизация молекул были выполнены средствами программного пакета SYBYL.

Вся совокупность соединений (для каждого из механизмов ингибирования) была разделена на обучающую и тестовую выборки. Первая использовалась при построении моделей 3D-QSAR, с помощью второй проверялась предсказательная сила полученных моделей. Отбор соединений в тестовую выборку осуществлялся методом, предложенным V.E. Kuzmin et al. [21]. Все молекулы в выборке были отсортированы по возрастанию активности и каждое n -ое соединение было отобрано для тестовой выборки. Имеющиеся наборы необратимых и обратимых ингибиторов состояли из нескольких химических рядов. Для того, чтобы избежать повторного попадания в тестовую выборку соединений из одного и того же ряда, в некоторых случаях в тестовую выборку отбирали соединение $n+1$.

В случае необратимых ингибиторов отбиралось каждое 9-10 соединение, таким образом, обучающая выборка содержала 50 соединений, а тестовая - 6 соединений (структуры соединений и величины их ингибиторной активности приведены в таблице 1, соединения из тестовой выборки помечены звездочкой). Ингибиторная активность представлена в виде десятичного логарифма истинной бимолекулярной константы необратимого ингибирования, выраженной в $\text{моль}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$ ($\lg K_a$), который изменяется в диапазоне от 1,47 до 7,39.

Таблица 1. Структуры необратимых ингибиторов АХЭ и величины их ингибиторной активности.

| № | Обозначение | Структура | $\lg K_a$ |
|---|-------------|--|-----------|
| $\begin{array}{c} \text{R}^1 \\ \\ \text{O}=\text{P}-\text{R}^2 \\ \\ \text{L} \end{array}$ | | | |
| 1 | п001 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{SCH}_3$ | 2,34 |
| 2 | п002 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{SCH}_2\text{CH}_3$ | 2,69 |
| 3 | п003 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ | 3,08 |
| 4 | п004* | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ | 3,40 |
| 5 | п005 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ | 3,66 |
| 6 | п006 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ | 3,76 |
| 7 | п007 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{SCH}(\text{CH}_3)_2$ | 1,48 |
| 8 | п008 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{SCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ | 1,70 |
| 9 | п009 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ | 1,85 |
| 10 | п016 | $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^2=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{SCH}_3$ | 2,46 |
| 11 | п017 | $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^2=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{SCH}_2\text{CH}_3$ | 2,58 |
| 12 | п018 | $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^2=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ | 2,41 |
| 13 | п019* | $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^2=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ | 2,76 |
| 14 | п020 | $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^2=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ | 3,06 |
| 15 | п021 | $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^2=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ | 3,33 |
| 16 | п022 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{SCH}_3$ | 3,87 |
| 17 | п023 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{SCH}_2\text{CH}_3$ | 4,08 |
| 18 | п024 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ | 3,93 |
| 19 | п025 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ | 4,06 |
| 20 | п026* | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ | 4,32 |
| 21 | п027 | $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ | 4,35 |
| 22 | п028 | $\text{R}^1=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}^+(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ | 5,00 |
| 23 | п029 | $\text{R}^1=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}^+(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ | 4,85 |
| 24 | п030* | $\text{R}^1=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}^+(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ | 5,04 |
| 25 | п031 | $\text{R}^1=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}^+(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ | 5,52 |
| 26 | п032 | $\text{R}^1=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{R}^2=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}^+(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ | 5,95 |
| 27 | п036 | $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^2=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$ | 2,18 |
| 28 | п037 | $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^2=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ | 2,45 |
| 29 | п038 | $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^2=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ | 2,60 |
| 30 | п039 | $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^2=\text{OCH}_2\text{CH}_3$; $\text{L}=\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ | 2,46 |

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С ИНГИБИТОРАМИ

Таблица 1. Продолжение.

| № | Обозначение | Структура | LgKa |
|--|-------------|---|------|
| $ \begin{array}{c} R^1 \\ \\ O=P-R^2 \\ \\ L \end{array} $ | | | |
| 31 | r040 | $R^1=C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_5CH_3$ | 3,11 |
| 32 | r044 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=S(CH_2)_2SCH_2CH_3$ | 4,18 |
| 33 | r045 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_2CH_3$ | 4,41 |
| 34 | r046 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_3CH_3$ | 4,46 |
| 35 | r047 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_4CH_3$ | 4,11 |
| 36 | r048 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_5CH_3$ | 4,52 |
| 37 | r049 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_6CH_3$ | 5,32 |
| 38 | r050 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_7CH_3$ | 5,34 |
| 39 | r051 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_8CH_3$ | 5,38 |
| 40 | r060 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=CH_3$; $L=SCH(C_6H_5)_2$ | 5,69 |
| 41 | r061 | $R^1=R^2=OCH_2CH_3$; $L=SCH(C_6H_5)_2$ | 5,26 |
| 42 | r062 | $R^1=R^2=CH_2CH_3$; $L=SCH(C_6H_5)_2$ | 3,16 |
| 43 | r063 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=C_6H_5$; $L=SCH(C_6H_5)_2$ | 4,44 |
| 44 | r097 | $R^1=C(CH_3)CHOCH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=S(CH_2)_2SCH_2CH_3$ | 2,30 |
| 45 | r103 | $R^1=O(CH_2)_3CH_3$; $R^2=CH_3$; $L=S(CH_2)_2SCH_2C_6H_5$ | 7,40 |
| 46 | r107* | $R^1=R^2=O(CH_2)_3CH_3$; $L=S(CH_2)_2SC_6H_5$ | 6,18 |
| 47 | r108 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=C_6H_5$; $L=S(CH_2)_2SC_6H_5$ | 5,04 |
| 48 | r109 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=CH_3$; $L=S(CH_2)_2SC_6H_4CH_3-p$ | 4,45 |
| 49 | r112 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=C_6H_{11}$; $L=S(CH_2)_2SCH_2CH_3$ | 2,18 |
| 50 | r113* | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=C_6H_{11}$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_2CH_3$ | 2,45 |
| 51 | r114 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=C_6H_{11}$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_3CH_3$ | 2,60 |
| 52 | r115 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=C_6H_{11}$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_4CH_3$ | 2,46 |
| 53 | r116 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=C_6H_{11}$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_5CH_3$ | 3,11 |
| 54 | r117 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=C_6H_{11}$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_6CH_3$ | 2,92 |
| 55 | r118 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=C_6H_{11}$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_7CH_3$ | 2,98 |
| 56 | r119 | $R^1=OCH_2CH_3$; $R^2=C_6H_{11}$; $L=S(CH_2)_2S(CH_2)_8CH_3$ | 3,18 |

Аналогичные данные для обратимых ингибиторов приведены в таблице 2. В этом случае отбиралось каждое 10-11 соединение, и обучающая выборка содержала 49 соединений, а тестовая - 5 соединений (помечены звездочкой). В случае обратимых ингибиторов активность представлена как десятичный логарифм обратной величины константы ингибирования, выраженной в моль/л, ($\lg(1/K_i)$) с диапазоном значений от 3,06 до 5,18.

Молекулярная динамика (МД). Данные о пространственной структуре АХЭ были получены из файла PDB 2JGF. Файл содержит структуру АХЭ в комплексе с ингибитором фенамифосом после фосфорилирования. Было решено использовать её в качестве прототипа для построения комплексов фермент-ингибитор, поскольку ход основной цепи в области каталитической триады активного центра мало отличается от такового в апо-структуре АХЭ [6]. При этом наличие у фенамифоса объемного амидного заместителя делает его схожим с фосфорорганическими соединениями из анализируемых выборок, также имеющими достаточно объемные заместители. Необратимый ингибитор VX и обратимые фосфорорганические ингибиторы r077 и r150 использовали для выявления оптимального расположения ингибиторов в активном

центре АХЭ. Соединения r077 и r150 являются представителями различных химических рядов (табл. 2). В каждом случае ингибитор “помещали” в активный центр АХЭ, используя выбранный прототип. Ориентации молекул в качестве первоначального положения ингибиторов для моделирования молекулярной динамики (MD) определяли при помощи выравнивания со структурой фенамифоса из комплекса 2JGF.

Таблица 2. Структуры обратимых ингибиторов АХЭ и величины их ингибиторной активности.

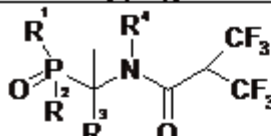
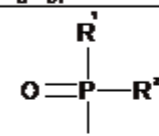
| № | Обозначение | Структура | lg(1/Ki) |
|--|-------------------|---|----------|
|  | | | |
| 1 | r077 | $R^1=R^2=OCH_2CH_3$; $R^3=CH_2CH_3$; $R^4=CH_3$ | 4,85 |
| 2 | r078 | $R^1=R^2=OCH_2CH_3$; $R^3=CH_3$; $R^4=CH_3$ | 4,41 |
| 3 | r079 ^a | $R^1=R^2=OCH_2CH_3$; $R^3=(CH_2)_3CH_3$; $R^4=CH_3$ | 4,19 |
| 4 | r084 | $R^1=R^2=OCH_2CH_3$; $R^3=CH_3$; $R^4=H$ | 3,20 |
| 5 | r085 | $R^1=R^2=OCH_2CH_3$; $R^3=CH_2CH_3$; $R^4=H$ | 4,12 |
| 6 | r086 | $R^1=R^2=OCH_2CH_3$; $R^3=(CH_2)_3CH_3$; $R^4=H$ | 4,51 |
| 7 | r087 | $R^1=R^2=OCH_2CH_3$; $R^3=CH_2CH(CH_3)_2$; $R^4=H$ | 5,10 |
| 8 | r088 | $R^1=R^2=OCH_2CH_3$; $R^3=C_6H_5$; $R^4=H$ | 4,92 |
|  | | | |
| 9 | r149 | $R^1=C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2SCH_2CH_3$ | 3,59 |
| 10 | r150 | $R^1=C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S(CH_2)_2CH_3$ | 3,82 |
| 11 | r151 | $R^1=C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S(CH_2)_3CH_3$ | 4,82 |
| 12 | r152 | $R^1=C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S(CH_2)_4CH_3$ | 4,82 |
| 13 | r154 | $R^1=C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2SCH_3$ | 3,06 |
| 14 | r159 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2SCH_2CH_3$ | 3,15 |
| 15 | r160 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S(CH_2)_2CH_3$ | 3,32 |
| 16 | r161 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S(CH_2)_3CH_3$ | 3,70 |
| 17 | r162 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S(CH_2)_4CH_3$ | 3,72 |
| 18 | r163 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S(CH_2)_5CH_3$ | 4,48 |
| 19 | r164 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S(CH_2)_6CH_3$ | 4,66 |
| 20 | r165 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S(CH_2)_7CH_3$ | 4,68 |
| 21 | r166 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S(CH_2)_8CH_3$ | 4,82 |
| 22 | r167 ^a | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)CH_2CH_3$ | 3,51 |
| 23 | r168 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_2CH_3$ | 3,29 |
| 24 | r169 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_3CH_3$ | 3,55 |
| 25 | r170 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_4CH_3$ | 3,31 |
| 26 | r171 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_5CH_3$ | 4,07 |
| 27 | r172 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_6CH_3$ | 4,00 |
| 28 | r173 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_7CH_3$ | 4,21 |
| 29 | r174 | $R^1=C_6H_{11}$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_8CH_3$ | 4,74 |
| 30 | r175 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)CH_2CH_3$ | 3,92 |
| 31 | r176 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_2CH_3$ | 3,68 |
| 32 | r177 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_3CH_3$ | 3,70 |
| 33 | r178 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_4CH_3$ | 4,11 |
| 34 | r180 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_6CH_3$ | 4,80 |
| 35 | r181 | $R^1=CH_2C_6H_5$; $R^2=OCH_2CH_3$; $L=O(CH_2)_2S^+(CH_3)(CH_2)_7CH_3$ | 4,60 |

Таблица 2. Продолжение.

| № | Обозначение | Структура | lg(1/Ki) |
|--|-------------|--|----------|
| $ \begin{array}{c} R^1 \\ \\ O=P-R^2 \\ \\ L \end{array} $ | | | |
| 36 | r182* | R ¹ =CH ₂ C ₆ H ₅ ; R ² =OCH ₂ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃)(CH ₂) ₈ CH ₃ | 4,68 |
| 37 | r183 | R ¹ =C ₆ H ₅ ; R ² =OCH ₂ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃) ₂ | 3,49 |
| 38 | r184* | R ¹ =C ₆ H ₅ ; R ² =OCH ₂ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃)CH ₂ CH ₃ | 3,89 |
| 39 | r185 | R ¹ =C ₆ H ₅ ; R ² =OCH ₂ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃)(CH ₂) ₂ CH ₃ | 4,07 |
| 40 | r186 | R ¹ =C ₆ H ₅ ; R ² =OCH ₂ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃)(CH ₂) ₃ CH ₃ | 4,96 |
| 41 | r187 | R ¹ =C ₆ H ₅ ; R ² =OCH ₂ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃)(CH ₂) ₄ CH ₃ | 5,18 |
| 42 | r188 | R ¹ =C ₆ H ₅ ; R ² =OCH ₂ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃)(CH ₂) ₅ CH ₃ | 5,17 |
| 43 | r190 | R ¹ =C ₆ H ₅ ; R ² =O(CH ₂) ₂ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃) ₂ | 3,96 |
| 44 | r191 | R ¹ =C ₆ H ₅ ; R ² =O(CH ₂) ₃ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃) ₂ | 4,74 |
| 45 | r192 | R ¹ =C ₆ H ₅ ; R ² =O(CH ₂) ₄ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃) ₂ | 4,80 |
| 46 | r193* | R ¹ =C ₆ H ₅ ; R ² =O(CH ₂) ₅ CH ₃ ; L=O(CH ₂) ₂ S ⁺ (CH ₃) ₂ | 5,03 |
| 47 | r194 | R ¹ =OCH ₂ CH ₃ ; R ² =CH ₂ C ₆ H ₅ ; L=O(CH ₂) ₂ SCH ₂ CH ₃ | 3,28 |
| 48 | r195 | R ¹ =OCH ₂ CH ₃ ; R ² =CH ₂ C ₆ H ₅ ; L=O(CH ₂) ₂ S(CH ₂) ₂ CH ₃ | 3,14 |
| 49 | r196 | R ¹ =OCH ₂ CH ₃ ; R ² =CH ₂ C ₆ H ₅ ; L=O(CH ₂) ₂ S(CH ₂) ₃ CH ₃ | 3,57 |
| 50 | r197 | R ¹ =OCH ₂ CH ₃ ; R ² =CH ₂ C ₆ H ₅ ; L=O(CH ₂) ₂ S(CH ₂) ₄ CH ₃ | 3,96 |
| 51 | r198 | R ¹ =OCH ₂ CH ₃ ; R ² =CH ₂ C ₆ H ₅ ; L=O(CH ₂) ₂ S(CH ₂) ₅ CH ₃ | 4,74 |
| 52 | r199 | R ¹ =OCH ₂ CH ₃ ; R ² =CH ₂ C ₆ H ₅ ; L=O(CH ₂) ₂ S(CH ₂) ₆ CH ₃ | 4,42 |
| 53 | r200 | R ¹ =OCH ₂ CH ₃ ; R ² =CH ₂ C ₆ H ₅ ; L=O(CH ₂) ₂ S(CH ₂) ₇ CH ₃ | 4,57 |
| 54 | r201 | R ¹ =OCH ₂ CH ₃ ; R ² =CH ₂ C ₆ H ₅ ; L=O(CH ₂) ₂ S(CH ₂) ₈ CH ₃ | 4,72 |

Моделирование молекулярной динамики комплексов АХЭ с ингибиторами проводили, используя программный пакет AMBER 9, при наличии явным образом определенного растворителя (воды) в периодических граничных условиях. В обоих случаях было добавлено 7729 молекул воды. Линейные размеры ячейки составляли 70×71×66 Å. Для того, чтобы скорректировать изначальные стерические конфликты, перед MD проводили оптимизацию структуры с использованием процедуры минимизации потенциальной энергии системы (3000 шагов). Разогрев системы до температуры 340 К выполняли в течение 20 пс с шагом 2 фс в условиях постоянного объема (NVT ансамбль). Выравнивание плотности системы проводили также в течение 20 пс с шагом 2 фс, но в условиях постоянного давления (NPT ансамбль). Система уравнивалась на протяжении 200 пс (с шагом 2 фс) в условиях постоянного давления 1 атмосфера, собственно моделирование MD проводилось для интервала 5 нс при одинаковых условиях для необратимого и обратимого ингибитора. Моделирование проводилось в силовом поле AMBER99 с использованием ланжевенновской динамики и термостата Берендсена с параметрами по умолчанию. Электростатические кулоновские и вандерваальсовы взаимодействия оценивались по решётке с использованием метода Эвальда (PME). Заряд системы компенсировался неявным образом.

Построение 3D-QSAR моделей. Подбор конформеров и выравнивание необратимых и обратимых ингибиторов проводили вручную на основании результатов молекулярной динамики, используя полученные ориентации VX и r150, соответственно. При этом учитывались размеры полости активного центра

и ориентация уходящей группы по направлению ко входу в активный центр (согласно выбранному прототипу). Для построения моделей 3D-QSAR использовали стандартные поля CoMFA и индексы CoMSIA (программный пакет SYBYL), а также разработанные для описания донорно-акцепторных свойств молекул при образовании водородных связей поля HYBOT 3D [22] в различных комбинациях. Для расчета стерических и электростатических молекулярных полей и индексов молекулярного сходства использовали атом углерода с типом гибридизации sp^3 и зарядом +1 в узлах решетки. Для расчета донорных и акцепторных полей в HYBOT 3D в узлы решетки помещалась молекула воды [22]. Решетки для CoMFA, CoMSIA и HYBOT 3D рассчитывались в автоматическом режиме с шагом 2 Å по всем трем направлениям.

Метод частичных наименьших квадратов (PLS) использовался для построения линейной зависимости между значениями дескрипторов молекулярных полей или индексов молекулярного сходства с использованием или без использования дескрипторов HYBOT 3D и числовыми значениями ингибиторной активности. Оптимальное количество компонентов PLS определяли при процедуре скользящего контроля с исключением по одному. Предсказательная способность оценивалась по величинам R^2_{cv} (коэффициента корреляции при скользящем контроле) и s_{cv} (стандартной ошибки при скользящем контроле), полученным в процедуре с исключением по одному, а также по результатам предсказания ингибиторной активности соединений из тестовой выборки R^2_{test} , рассчитанного по формуле:

$$R^2_{test} = 1 - \Sigma(y_{obs} - y_{pred})^2 / \Sigma(y_{obs} - y_{mean})^2,$$

где y_{obs} – наблюдаемое значение зависимой переменной; y_{pred} – предсказанное значение зависимой переменной, y_{mean} – среднее значение зависимых переменных тестовой выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. По результатам моделирования молекулярной динамики комплексов АХЭ с VX и r150 были отобраны оптимальные конформации и ориентации в полости активного центра для необратимых и обратимых фосфорорганических ингибиторов, соответственно. При выборе оптимальных конформаций и ориентаций использовали известные по литературным данным критерии. Так, ранее было показано, что для образования ковалентной связи между атомом фосфора ингибитора и кислородом боковой цепи Ser из каталитической триады фермента необходимо, чтобы группа P=O находилась на достаточно близком расстоянии от каталитического серина и была ориентирована по направлению к оксианионной щели, которую составляют остатки Gly121, Gly122 и Ala204 в структуре АХЭ мыши [5, 23]. Для образования прочного необратимого конъюгата также важна ориентация P-O-алкильного заместителя относительно His447, которая в дальнейшем приводила бы к образованию водородной связи, влекущей за собой разрушение водородных связей в каталитической триаде фермента и стабилизации конъюгата [6].

В случае необратимого ингибитора в течение 50 шагов молекулярной динамики расстояние от фосфора в структуре VX до кислорода Ser203 изменялось в диапазоне 2,82–4,49 Å, а расстояние от кислорода этоксигруппы VX до имидазольного кольца гистидина (His447) находилось в диапазоне 3,75–5,97 Å. В качестве оптимального расположения VX выбрали расположение с минимальным расстоянием от его атома фосфора до кислорода Ser203 (2,82 Å), и именно его использовали как шаблон для дальнейшего выравнивания выборки необратимых ингибиторов и проведения 3D-QSAR анализа. При выбранном оптимальном положении необратимого ингибитора в полости активного центра АХЭ фосфонильный кислород VX ориентирован таким образом и находится на таком расстоянии от остатков оксианионной щели, что возможно образование с ними водородных связей: Gly121 (2,1 Å), Gly122 (1,95 Å) и Ala204 (2,5 Å). Расстояние от кислорода этоксигруппы VX до имидазольного кольца гистидина His447

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С ИНГИБИТОРАМИ

составляет 5,2 Å. Расположение фосфорорганического соединения с необратимым типом действия (VX) в активном центре АХЭ, выбранное в качестве оптимального в результате молекулярной динамики, показано на рисунке 1. Следует отметить, что атом азота VX (отмечен + на рисунке 1) при такой ориентации расположен вблизи Trp 86, который ответственен за правильную ориентацию заряженной части уходящей группы ингибиторов, при входе в активный центр [24].

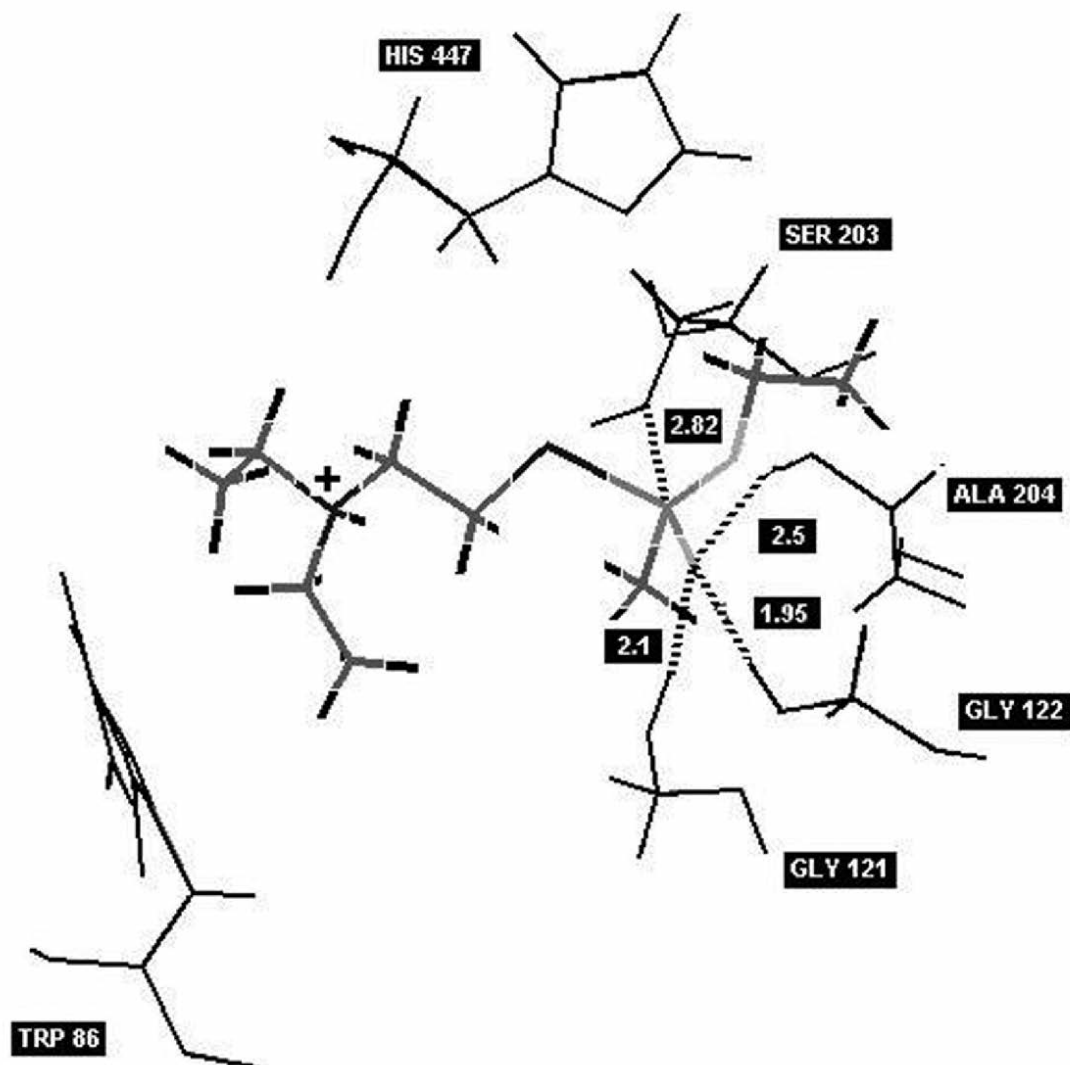


Рисунок 1.

Расположение фосфорорганического соединения с необратимым типом действия (VX) в активном центре АХЭ, полученное в результате моделирования молекулярной динамики.

Для обратимых ингибиторов оптимальная конформация и расположение в активном центре АХЭ были выбраны схожим образом. Наиболее оптимальный вариант ориентации обратимого ингибитора был получен при использовании r150. Объемная уходящая группа r077 не позволила данному соединению “правильно” разместиться в области каталитической триады: минимальное расстояние от атома фосфора в структуре r077 до кислорода каталитического серина составляет 5,16 Å. Фосфонильный кислород удалён на 4,6 Å от Ala204, 3,84 Å от Gly121 и на 2,76 Å от Gly122. В то же время, минимальное расстояние от атома фосфора в структуре

r150 до кислорода каталитического серина составляет 3,43 Å, и фосфонильный кислород r150 имеет правильную ориентацию относительно оксианионной щели. Расстояния до образующих ее аминокислот составляют 3,00 Å, 1,88 Å и 4,54 Å для Gly121, Gly122 и Ala204, соответственно. Данные величины расстояний указывают на снижение вероятности образования водородных связей с Ala204. Кроме того, при такой ориентации обратимого ингибитора расстояние до гистидина His447 превышает 7 Å. Расположение фосфорорганического соединения с обратимым типом действия (r150) в активном центре АХЭ, выбранное в качестве оптимального в результате моделирования молекулярной динамики, показано на рисунке 2.

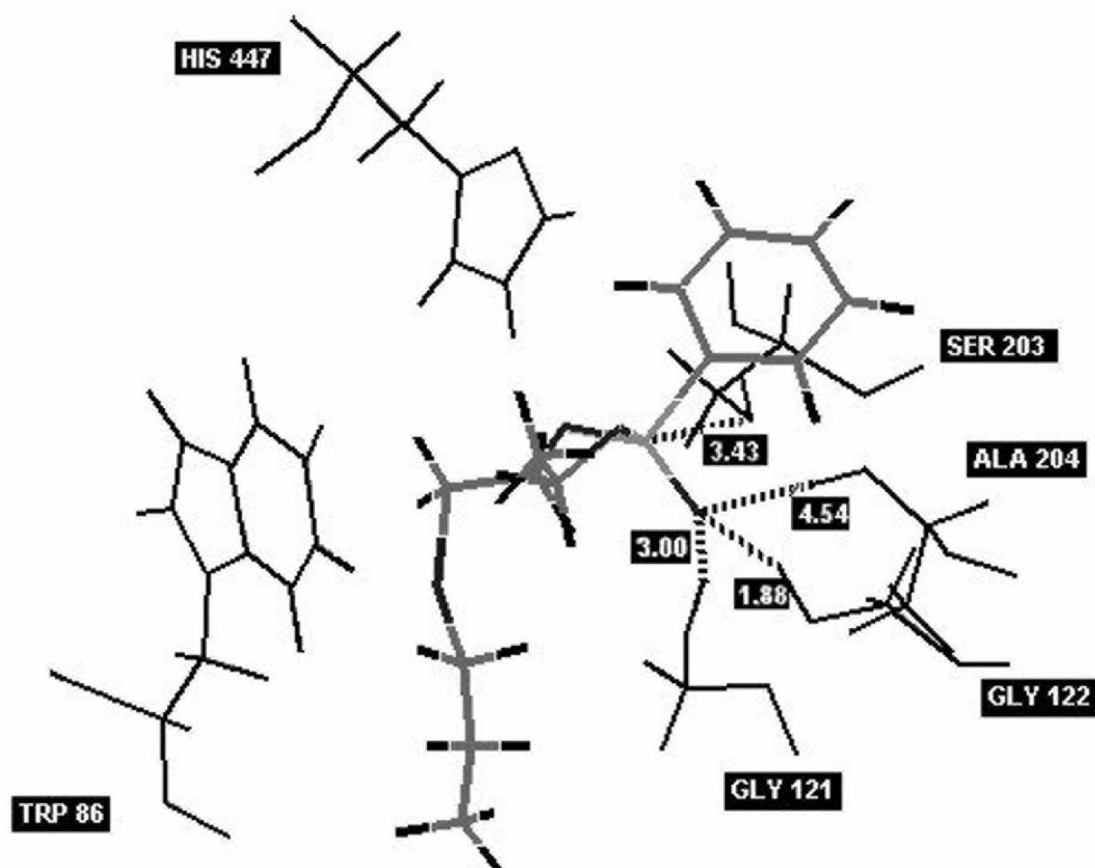


Рисунок 2.

Расположение фосфоорганического соединения с обратимым типом действия (r150) в активном центре АХЭ, полученное в результате моделирования молекулярной динамики.

Результаты моделирования молекулярной динамики с использованием обратимых и необратимого ингибитора отражают более благоприятные условия для образования ковалентной связи с Ser203 в случае необратимого ингибитора. Это хорошо согласуется с данными, что ФОС, которые содержат группу P-S-R, обладают более сильной ингибиторной активностью по сравнению с ФОС, содержащими P-O-R. Предполагают, что это связано с более высоким значением кинетической константы гидролиза связи P-S по сравнению с кинетической константой гидролиза связи P-O, а также различной вращательной свободой связей P-O и P-S в фосфорорганических соединениях [25].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С ИНГИБИТОРАМИ

Различия в расположении необратимых и обратимых ингибиторов в активном центре АХЭ, вероятно, вызваны отсутствием электроотрицательного атома в непосредственной близости от атома фосфора и наличием объемных заместителей в уходящей группе (как, например, в соединении r077 и его аналогов) или наличием более объемных негибких заместителей в положении R¹ и R² у атома фосфора (например, r167 и его аналоги, r175 и его аналоги). Таким образом, полученные результаты подтверждают тот факт, что хотя ингибиторная активность ФОС напрямую связана с электронодонорными свойствами уходящей группы, стерические эффекты также значительно влияют на ингибиторную активность ФОС [3]. В случае обратимых ингибиторов расстояние до имидазольного кольца His447 в процессе молекулярной динамики АХЭ с r150 и r077 оставалось достаточно большим, что снижает вероятность дополнительного взаимодействия этоксигруппы указанных соединений с His447, важного для последующей стабилизации полученного конъюгата.

Полученные в результате молекулярной динамики конформации необратимого и обратимого ингибитора использовали при построении 3D-QSAR моделей с использованием сравнительных молекулярных полей CoMFA, индексов молекулярного сходства CoMSIA и полей HYBOT 3D.

Параметры полученных моделей для обучающей выборки необратимых ингибиторов с использованием CoMFA, CoMFA+HYBOT3D, CoMSIA и CoMSIA+HYBOT3D полей представлены в таблице 3. Все модели были получены без дополнительного удаления соединений из анализа. Как видно из таблицы, добавление HYBOT3D полей в случае использования как CoMFA, так и CoMSIA дескрипторов позволяет улучшить статистические характеристики моделей, причем вклад акцепторных полей HYBOT3D в определение ингибиторной активности соединений в моделях CoMFA+HYBOT3D и CoMSIA +HYBOT3D составляет 36%. В качестве иллюстрации на рисунке 3 приведены распределения стерических (А) и акцепторных HYBOT 3D (Б) полей в модели CoMFA+HYBOT3D. Можно отметить неблагоприятную область для расположения объемных заместителей в положении R¹ у атома фосфора. При сопоставлении полученных в модели полей и пространственной структуры активного центра АХЭ оказалось, что область, благоприятная для наличия акцептора, соответствует положению остатков Ala204, Gly121 и Gly122 оксианионной щели, которые, как показано, участвуют в образовании водородных связей.

Таблица 3. Параметры 3D-QSAR моделей для необратимых ингибиторов.

| Поля | R^2_{cv} | s_{cv} | n_{opt} | R^2 | s | F | N | R^2_{test} |
|------------------------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|------------|-----------|--------------|
| CoMFA | 0,6 | 0,86 | 4 | 0,93 | 0,36 | 152 | 50 | 0,97 |
| CoMFA+3D HYBOT | 0,71 | 0,74 | 5 | 0,94 | 0,32 | 149 | 50 | 0,98 |
| CoMSIA | 0,62 | 0,83 | 3 | 0,87 | 0,48 | 106 | 50 | 0,82 |
| CoMSIA+3D HYBOT | 0,73 | 0,72 | 5 | 0,94 | 0,33 | 146 | 50 | 0,98 |

Примечание. R^2_{cv} - коэффициент корреляции при анализе со скользящим контролем (удаление по одному); s_{cv} - стандартная ошибка оценки при анализе со скользящим контролем; n_{opt} - оптимальное количество компонентов; R^2 - коэффициент корреляции при анализе без скользящего контроля; s - стандартная ошибка оценки; F - F-критерий; N - количество соединений, использованных при построении модели; R^2_{test} - коэффициент корреляции при анализе тестовой выборки.

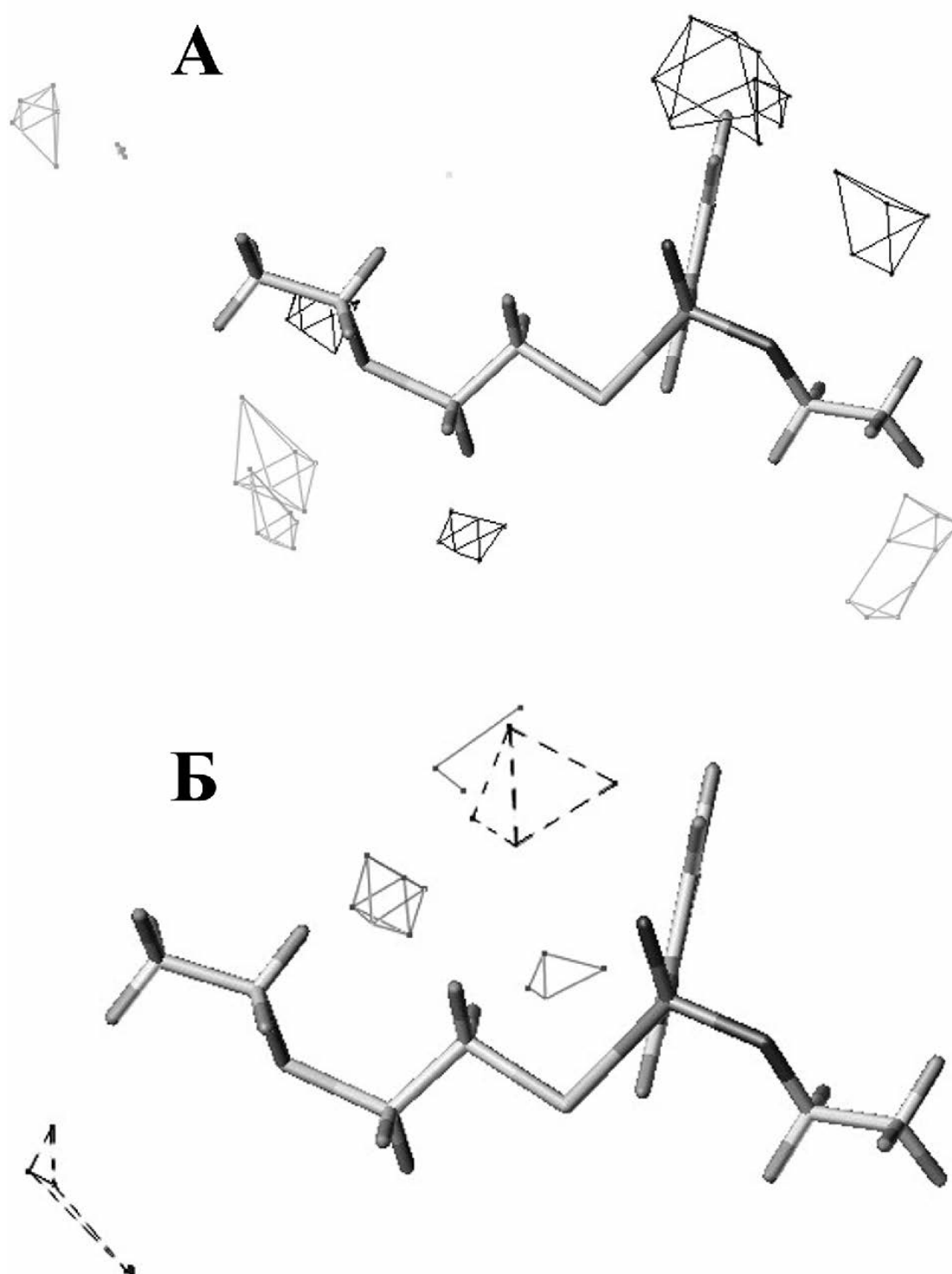


Рисунок 3.

Распределение стерических (А) и 3D HVBOT акцепторных (Б) полей в модели 3D-QSAR CoMFA+3D HVBOT для необратимых ингибиторов. (А) чёрным цветом указаны неблагоприятные для заместителей поля, серым - благоприятные, (Б) прерывистой линией указаны благоприятные для акцептора поля, сплошной линией - неблагоприятные для акцептора поля.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С ИНГИБИТОРАМИ

Используя тестовую выборку, мы провели оценку предсказательной силы полученных моделей. Структуры соединений тестовой выборки и величины наблюдаемой ($Lg(K_a)_{obs}$) и предсказанных ингибиторных активностей (LgK_a CoMFA+HYBOT3D, LgK_a CoMFA, LgK_a CoMSIA, LgK_a CoMSIA+HYBOT3D) показаны в таблице 4. Как видно из таблицы, наилучшие предсказанные величины были получены при использовании CoMFA+HYBOT3D и CoMSIA+HYBOT3D моделей. Рассчитанный R^2_{test} для величин предсказания ингибиторной активности тестовой выборки составил 0,98, 0,97, 0,82 и 0,98 для моделей CoMFA+HYBOT3D, CoMFA, CoMSIA и CoMSIA+HYBOT3D, соответственно (табл. 4).

Таблица 4. Предсказание ингибирующей активности для соединений тестовой выборки с использованием 3D-QSAR моделей для необратимых фосфорорганических ингибиторов.

| Обозначение | LgK_a_{obs} | LgK_a CoMFA+3D HYBOT | LgK_a CoMFA | LgK_a CoMSIA | LgK_a CoMSIA+3D HYBOT |
|-------------|---------------|------------------------------|------------------|-------------------|-------------------------------|
| r113 | 2,45 | 2,53 | 2,39 | 2,42 | 2,28 |
| r019 | 2,76 | 2,74 | 2,6 | 2,56 | 2,75 |
| r004 | 3,4 | 3,3 | 3,24 | 2,8 | 3,38 |
| r026 | 4,32 | 3,98 | 4,01 | 4,2 | 4,51 |
| r030 | 5,04 | 5,21 | 5,24 | 5,73 | 5,26 |
| r107 | 6,18 | 6,27 | 5,89 | 5,17 | 5,97 |

Параметры полученных моделей для обратимых ингибиторов с использованием CoMFA, CoMFA+HYBOT3D, CoMSIA и CoMSIA+HYBOT3D полей представлены в таблице 5. Наилучшей моделью является 3D-QSAR модель построенная с использованием CoMFA полей, поскольку она обладает наименьшей ошибкой предсказания при анализе со скользящим контролем (s_{cv}), наибольшим квадратом коэффициента корреляции при анализе со скользящим контролем (R^2_{cv}) и наибольшим F-критерием. Вклад CoMFA полей в данной модели состоит из 68% стерических и 32% электростатических взаимодействий. Распределение полей для модели с использованием CoMFA показано на рисунке 4.

Таблица 5. Параметры 3D-QSAR моделей для обратимых фосфоорганических ингибиторов.

| Поля | R^2_{cv} | s_{cv} | n_{opt} | R^2 | s | F | N | R^2_{test} |
|-----------------|------------|----------|-----------|-------|------|----|----|--------------|
| CoMFA | 0,72 | 0,34 | 4 | 0,89 | 0,22 | 79 | 46 | 0,74 |
| CoMFA+3D HYBOT | 0,58 | 0,43 | 4 | 0,87 | 0,24 | 51 | 45 | 0,43 |
| CoMSIA | 0,71 | 0,36 | 5 | 0,86 | 0,25 | 49 | 46 | 0,57 |
| CoMSIA+3D HYBOT | 0,5 | 0,46 | 3 | 0,73 | 0,34 | 36 | 45 | 0,57 |

Примечание. R^2_{cv} - коэффициент корреляции при анализе со скользящим контролем (удаление по одному); s_{cv} - стандартная ошибка оценки при анализе со скользящим контролем; n_{opt} - оптимальное количество компонентов; R^2 - коэффициент корреляции при анализе без скользящего контроля; s - стандартная ошибка оценки; F - F-критерий; N - количество соединений, использованных при построении модели; R^2_{test} - коэффициент корреляции при анализе тестовой выборки.

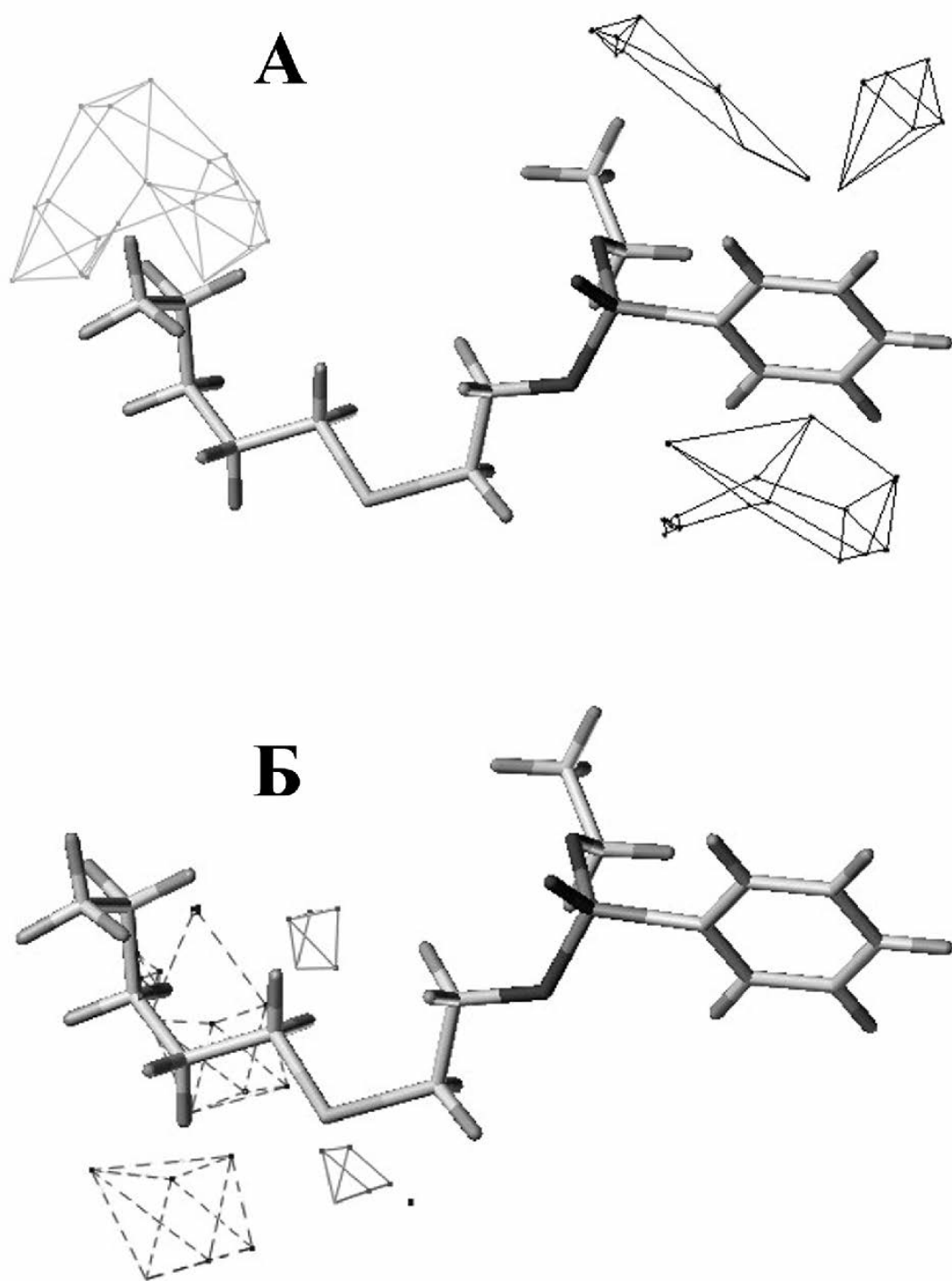


Рисунок 4.

Распределение стерических (А) и электростатических (Б) полей в модели 3D-QSAR CoMFA для обратимых ингибиторов, (А) черным цветом указаны неблагоприятные для заместителей поля, серым - благоприятные, (Б) сплошной линией указаны поля благоприятные для отрицательно заряженных заместителей, прерывистой линией - для положительно заряженных заместителей.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С ИНГИБИТОРАМИ

Используя тестовую выборку, провели оценку предсказательной силы полученных моделей. Структуры соединений тестовой выборки и величины наблюдаемой ($\text{Lg}(1/K_i)_{\text{obs}}$) и предсказанных ингибиторных активностей ($\text{Lg}(1/K_i)$ CoMFA+HYBOT3D, $\text{Lg}(1/K_i)$ CoMFA, $\text{Lg}(1/K_i)$ CoMSIA, $\text{Lg}(1/K_i)$ CoMSIA+HYBOT3D) показаны в таблице 6. Для оценки предсказательной силы был рассчитан R^2_{test} для величин предсказанной ингибиторной активности тестовой выборки, и он составил 0,74, 0,43, 0,57 и 0,57 для моделей CoMFA, CoMFA+HYBOT3D, CoMSIA и CoMSIA +HYBOT3D, соответственно (табл. 6).

Таблица 6. Предсказание ингибирующей активности для соединений тестовой выборки с использованием 3D-QSAR моделей для обратимых фосфорорганических ингибиторов.

| Обозначение | $\text{Lg}(1/K_i)_{\text{obs}}$ | $\text{Lg}(1/K_i)$ CoMFA | $\text{Lg}(1/K_i)$ CoMFA+3D HYBOT | $\text{Lg}(1/K_i)$ CoMSIA | $\text{Lg}(1/K_i)$ CoMSIA+3D HYBOT |
|-------------|---------------------------------|-----------------------------|---|------------------------------|--|
| r167 | 3,51 | 3,1 | 3,17 | 2,96 | 3,29 |
| r184 | 3,89 | 4,17 | 4,38 | 4,07 | 4,29 |
| r079 | 4,19 | 4,5 | 4,55 | 4,684 | 4,42 |
| r182 | 4,68 | 4,73 | 4,55 | 4,55 | 4,32 |
| r193 | 5,03 | 4,84 | 4,44 | 4,83 | 4,52 |

Распределения стерических полей в моделях различаются для обратимых и необратимых ингибиторов. В случае необратимого ингибирования отмечается область, благоприятная для размещения гибких объемных заместителей у атома фосфора в положении R^2 , тогда как для обратимых ингибиторов присутствие объемных заместителей в данном положении является неблагоприятным. То есть, ориентации и конформации обратимых и необратимых ингибиторов в активном центре фермента достаточно сильно отличаются, что и было выявлено при моделировании молекулярной динамики.

Сравнение распределения электростатических полей показало наличие области, благоприятной для положительно заряженного атома в уходящей группе в случае обратимого и необратимого ингибирования. Сопоставление электростатических полей и полости активного центра АХЭ показало, что данная область соответствует положению остатка Trp86 в активном центре АХЭ, ответственного за первоначальную ориентацию ингибиторов в активном центре [24].

Улучшение параметров моделей для необратимых ингибиторов при введении в них HYBOT3D дескрипторов указывает на важность донорно-акцепторных взаимодействий при таком типе связывания с ферментом. При сопоставлении донорно-акцепторных полей с полостью активного центра АХЭ обнаружено, что благоприятная для акцептора область располагается в непосредственной близости от остатков Ala204, Gly121 и Gly122 оксианионной щели, которые участвуют в образовании водородных связей [5, 23].

Сравнивая, например, соединения r036 - r039 из выборки необратимых ингибиторов и r149 - r152 из выборки обратимых ингибиторов, можно отметить, что только наличие атома серы в непосредственной близости от атома фосфора в уходящей группе ФОС определяет необратимый тип ингибирования АХЭ. Это согласуется с результатами молекулярной динамики и литературными данными о различиях свойств Р-О и Р-S связей в фосфорорганических соединениях [3, 25]. Использование дескрипторов, описывающих электронодонорные свойства уходящей группы, позволит

проводить классификацию новых фосфорильных и тиофосфорильных соединений на обратимые и необратимые ингибиторы АХЭ и применять для оценки их токсичности соответствующие модели 3D-QSAR, полученные в данной работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Информация о пространственной ориентации ФОС в активном центре при необратимом и обратимом взаимодействии и трехмерные дескрипторы, отражающие взаимодействие ингибиторов с АХЭ, позволили построить трёхмерные модели взаимосвязи структура-активность (3D-QSAR) для необратимых и обратимых фосфорорганических ингибиторов. В случае необратимых ингибиторов модели 3D-QSAR хорошо описывают зависимость ингибиторной активности от структуры ФОС при помощи CoMFA и CoMSIA дескрипторов совместно с использованием HYBOT3D полей, что указывает на важность донорно-акцепторных взаимодействий для необратимого ингибирования. Модель, построенная с использованием CoMFA полей хорошо описывает взаимосвязь структура-активность для обратимых (псевдообратимых) фосфорорганических ингибиторов АХЭ. Полученные модели обладают хорошей предсказательной силой и могут использоваться для оценки ингибиторной активности новых фосфорорганических соединений, которая, в свою очередь, коррелирует с токсичностью данных соединений.

Работа выполнена при поддержке грантов МНТЦ № 0888 и 3777. Авторы выражают признательность В.Ю. Григорьеву за предоставленные структуры и величины ингибиторной активности фосфорорганических соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Giacobini E.* (2000) *Neurochem. Res.*, **25**, 1185–1190.
2. *Marquis J.K.* (1990) *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 1071–1076.
3. *Roy Fukuto T.* (1990) *Environmental Health Perspectives*, **87**, 245–254.
4. *Marrs T.C.* (1993) *Pharmacol. Ther.*, **58**, 51–66.
5. *Guo J.X., Wu J.J., Wright J.B., Lushington G.H.* (2006) *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 209–216.
6. *Hornberg A., Tunemalm A.K., Ekstrom F.* (2007) *Biochemistry*, **46**, 4815–4825.
7. *Reiner E.* (1971) *Bull. Org. Mond. Sante.*, **44**, 109–112.
8. *Bajgar J.* (2004) *J. Med. Chem. Def.*, **1**, 1–16.
9. *Harel M., Schalk I., Ehret-Sabatier L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C., Axelsen P.H., Silman I., Sussman J.L.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9031–9035.
10. *Kryger G., Silman I., Sussman J.L.* (1999) *Structure*, **7**, 297–307.
11. *Kaur J., Zhang M.Q.* (2000) *Curr. Med. Chem.*, **7**, 273–294.
12. *El Yazal J., Rao S.N., Mehl A., Slikker W.Jr.* (2001) *Toxicol. Sci.*, **63**, 223–232.
13. *Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E.* (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235–242.
14. *Bernard P., Kireev D.B., Chretien J.R., Fortier P.L., Coppet L.* (1998) *J. Mol. Model.*, **4**, 323–334.
15. *Hirashima A., Kuwano E., Eto M.* (2000). *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 653–656.
16. *Recanatini M., Cavalli A., Belluti F., Piazzzi L., Rampa A., Bisi A., Gobbi S., Valenti P., Andrisano V., Bartolini M., Cavrini V.* (2000) *J. Med. Chem.*, **43**, 2007–2018.
17. *Hosea N.A., Radic Z., Tsigelny I., Berman H.A., Quinn D.M., Taylor P.* (1996) *Biochemistry*, **35**, 10995–11004.
18. *Taylor P.* (2001) in: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, (Hardman J.G. and Limbird L.E. eds.), McGraw-Hill, New York, pp. 175–191.
19. *Maxwell D.M., Brecht K.M., Koplovitz I., Sweeney R.E.* (2006) *Arch. Toxicol.*, **80**, 756–760.
20. *Раевский О.А., Чистяков В.В., Агабекян Р.С., Сапегин А.М., Зефирова Н.С.* (1990) *Биоорган. химия*, **16**, 1509–1522.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С ИНГИБИТОРАМИ

21. Kuzmin V.E., Artemenko A.G., Muratov E.N. (2008) J. Comput. Aided Mol. Des., **22**, 403-421.
22. Raevsky O.A., Skvortsov V.S. (2002) J. Comput. Aided Mol. Des., **16**, 1-10.
23. Ordentlich A., Barak D., Kronman C., Benschop H.P., De Jong L.P., Ariel N., Barak R., Segall Y., Velan B., Shafferman A. (1999) Biochemistry, **38**, 3055-3066.
24. Sussman J.L., Harel M., Frolova F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I. (1991) Science, **253**, 872-879.
25. Mastrantonio G., Mack H.G., Della Vudova C.O. (2008) J. Mol. Model., **14**, 813-821.

Поступила: 07. 12. 2009.

MOLECULAR MODELING OF ACETYLCHOLINESTERASE INTERACTION WITH IRREVERSIBLE AND REVERSIBLE ORGANOPHOSPHOROUS INHIBITORS

O.V. Tikhonova^{1,2}, V.S. Skvortsov^{1,2}, O.A. Raevsky²

¹Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow; tel.: +7-499-246-1641; e-mail: ovt@ibmh.msk.su

²Institute of Physiologically Active Compounds, Chernogolovka, Moscow region

Three-dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship models were designed for irreversible and reversible acetylcholinesterase inhibitors by molecular modeling methods. In case of irreversible inhibitors CoMFA (the comparative analysis of molecular fields) or CoMSIA (the comparative analysis of indexes of molecular similarity) descriptors together with HYBOT 3D fields provide more statistically valid 3D-QSAR models. This indicates importance of donor-acceptor interactions for irreversible acetylcholinesterase inhibition. In case of reversible organophosphorous inhibitors good quality model for structure-activity relationships was developed using CoMFA fields. The obtained models have good predictive power and can be used for estimation of new organophosphorous compounds inhibitor activity that in turn correlates with toxicity of these compounds.

Key words: Acetylcholinesterase, molecular modeling, 3D-QSAR, HYBOT 3D, reversible and irreversible inhibitors.