

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2010

А. А. Погребной, М. А. Гришина, В. А. Потемкин, Д. А. Сысаков

## МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ СУБСТРАТОВ С ЦИТОХРОМОМ P450 2C9

Челябинская государственная медицинская академия, Челябинск, Россия

С применением 3D-QSAR алгоритма CiS выполнено моделирование комплексов 16 субстратов с изоформой 2C9 на основе комплекса 1R9O из базы данных PDB. В полученных при моделировании комплексах проанализировано расположение молекул субстратов и ориентация реакционных центров молекул относительно гема. Полученная при моделировании ориентация молекул субстратов позволяет объяснить наблюдаемые экспериментально метаболические реакции. Применение использованного при моделировании комплексов алгоритма CiS делает возможным прогнозирование направления метаболических превращений.

**Ключевые слова:** докинг, моделирование, комплекс, субстрат P450, 2C9, 1R9O.

Окислительный метаболизм веществ с участием различных изоформ цитохрома P450 является важной частью системы детоксикации ксенобиотиков. Изоформа цитохрома P450 2C9 является одной из распространённых изоформ печени человека. Субстратами этой изоформы, так же как и других изоформ цитохрома P450, является большое количество лекарственных веществ самой разнообразной химической структуры.

К настоящему времени имеется достаточно много исследований, связанных с моделированием субстратной специфичности различных изоформ цитохрома P450, в том числе и изоформы 2C9 [1]. Основными направлениями подобных исследований в настоящее время являются учёт конформационной гибкости молекул субстратов [2], а также прогноз участков молекул, подвергающихся метаболизму [3, 4]. Недавнее установление структуры комплекса изоформы 2C9 с (S)-флурбипрофеном по данным рентгено-структурного анализа (РСА) [5] делает возможным создание более совершенных моделей субстратной специфичности по отношению к этой изоформе.

В настоящей работе с использованием методов молекулярного докинга выполнено моделирование комплексов субстратов с изоформой 2C9, структура которой известна по результатам РСА (регистрационный код в базе данных PDB — 1R9O) [5]. Моделирование комплексов проведено с использованием выборки из 16 субстратов изоформы цитохрома P450 2C9 (таблица). Данные о константах Михаэлиса, характеризующих степень сродства субстратов к изоформе, а также направлениях метаболических реакций получены из литературных источников [6 – 21].

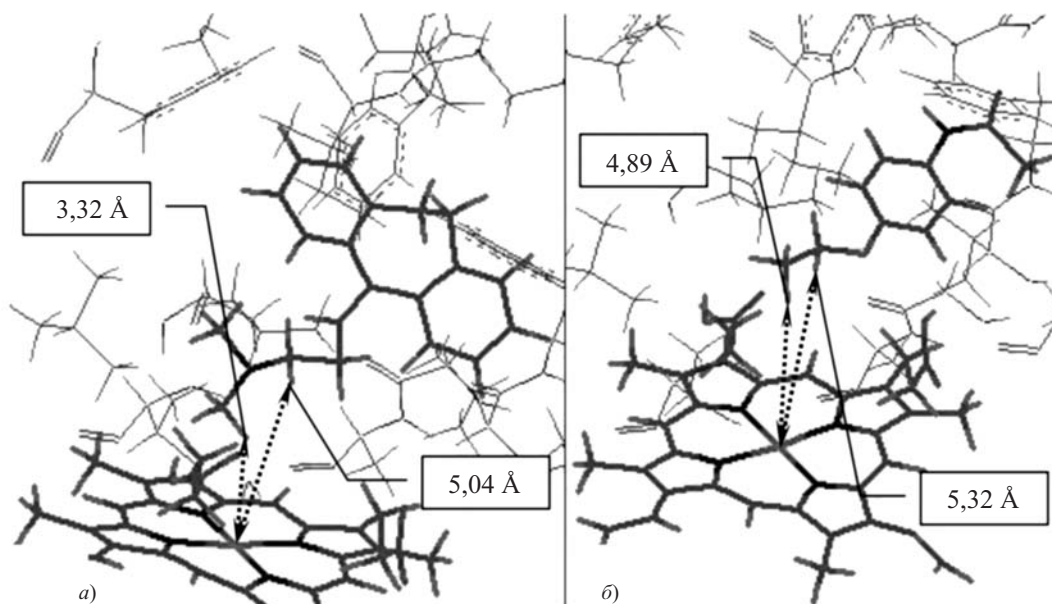
При построении моделей учтена возможность конформационных превращений молекул субстратов, а

также возможность существования изоэнергетических зеркально противоположных конформеров, которые могут различаться по характеру и эффективности взаимодействия с изоформой.

Для моделирования комплексов изоформы 2C9 с субстратами в настоящей работе использован алгоритм MultiGen [22], а также 3D-QSAR алгоритм CiS [23]. Алгоритм CiS аналогично другим 3D-QSAR алгоритмам, как, например, HASL, PARM, CoMFA [24, 25], позволяет устанавливать зависимость биологической активности от параметров строения молекул и характеристик взаимодействий в комплексе “моделльный рецептор — лиганд”. Особенности алгоритма CiS являются рассмотрение молекул с учётом их конформационного многообразия, а также учёт возможности конформационной перестройки самого рецептора в процессе образования комплекса «рецептор — лиганд». При этом алгоритм CiS не требует априорного предположения относительно ориентации молекул в полости рецептора. Применение алгоритма CiS позволяет получить удовлетворительные результаты определения расположения лигандов в полости рецептора также и в случаях достаточно различающихся по структуре молекул [23].

### Экспериментальная часть

**Конформационный анализ.** Для поиска конформеров субстратов изоформы 2C9 использован алгоритм MultiGen [22], являющийся модификацией методов, представленных в [26, 27]. В данном алгоритме используется геометрия конформера, соответствующего глобальному минимуму потенциальной энергии (полная энергия, рассчитанная в ММ3). Производится отбор конформеров, энергия которых отличается от



Расположение молекул amitриптилина (а) и фенацетина (б) в полости изоформы 2C9 по результатам моделирования. Показаны только аминокислотные остатки, имеющие сокращённые контакты с молекулами исследуемой выборки. Выделены молекулы amitриптилина, фенацетина и гем.

энергии глобального минимума потенциальной энергии не более чем на 3 ккал/моль.

**Определение ориентации молекул.** Среди конформеров, найденных алгоритмом MultiGen, с использованием алгоритма CiS [23] произведён отбор активных конформеров, обладающих наибольшей аффинностью к модельной изоформе. Также с использованием алгоритма CiS для отобранных активных конформеров определена ориентация в полости изоформы.

В рамках алгоритма CiS для поиска активных конформеров и определения их ориентации проводится построение модельного комплекса, имитирующего реальную структуру комплекса “изоформа — субстрат”. Данный подход аналогичен подходу, применяемому в алгоритме ViS/МС [28, 29], ранее успешно использованному для поиска активных конформеров и определению их ориентации в полости реального рецептора при анализе биологической активности ингибиторов р38 MAP киназы [28], выявлении деталей механизма действия ДНК-антиметаболитов, ингибиторов дигидрофолатредуктазы [29], исследовании ингибиторов fXa, 5-HT<sub>1A</sub>, α<sub>1</sub>-AR [30]. Алгоритм CiS также успешно применялся для построения модельных комплексов изоформы цитохрома P450 1A2 [31]. Основным отличием алгоритма CiS является учёт жесткости рецептора путем оценки силовых постоянных взаимодействия ( $k_m$ ) молекулы с каждым  $m$  атомом модельного рецептора по формуле:

$$k_m = \frac{kT}{A_m^2}$$

где  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — температура,  $A_m$  — амплитуда смещения  $m$ -ого атома модельного рецептора относительно положения равновесия при взаимодействии с серией молекул выборки. Квадрат амплитуды  $A_m$  представляет собой дисперсию координат атома

$m$  модельного рецептора при осуществлении итеративной процедуры ориентации лекарственных средств в модельном рецепторе, описанной в [23, 30]. Данный учет позволяет с большей точностью воспроизводить структуру реального комплекса.

При определении алгоритмом CiS ориентации наиболее активных конформеров в выборку субстратов была также включена молекула (S)-флурбипрофена, расположение которой в полости изоформы 2C9 определено экспериментально по данным PCA [5].

**Молекулярный докинг.** Молекулы субстратов исследуемой выборки в наиболее активных конформационных формах, ориентированные алгоритмом CiS, были помещены в полость изоформы 2C9 с использованием подхода, описанного в [28, 29]. Под наиболее активными конформационными формами понимаются в данном случае конформеры, обладающие наибольшей аффинностью к модельной изоформе. Принципы отбора таких конформеров описаны в [23, 30]. Структура полученных комплексов была оптимизирована в силовом поле ММ3 при фиксированной конформации молекулы белка.

**Метод CoCon.** Анализ взаимодействий в полученных моделях изоформы 2C9 с субстратами проведён с использованием метода CoCon [32].

Метод CoCon предполагает построение уравнений зависимости активности лигандов от параметров взаимодействия в комплексах на основании расчёта энергии взаимодействия лиганда с активными центрами рецептора и воды. Активные центры как рецептора и воды, так и лигандов, определяются по величинам вклада энергий взаимодействия отдельных атомов в суммарную энергию взаимодействия.

Ранее метод CoCon успешно применялся для исследования ингибиторов р38 MAP киназы, ингибиторов дигидрофолатредуктазы, нейраминидазы [33].

В ориентированных алгоритмом CiS молекулах субстратов рассмотрено расположение реакционных центров относительно атома железа гема. Под реакционными центрами в данном случае понимаются атомы водорода, замещение которых на гидроксильную группу приводит к конечным продуктам реакций гидроксирования, либо к возможным промежуточным продуктам реакций деалкилирования.

Известно, что при окислении субстратов цитохромов P450 активирование молекулы кислорода происходит с участием атома железа гема [34]. Следовательно, реакционный центр молекулы субстрата находится на относительно небольшом расстоянии от железа гема.

В комплексах, полученных при моделировании, молекулы 10 субстратов (амитриптилин, индометацин, (S)-мефенитоин, (S)-напроксен, толбутамид, дапсон, целекоксиб, фенитоин, тиенильная кислота, бисфенол А) оказались ориентированными таким образом, что атомы, относящиеся к реакционным центрам, характеризуются наименьшими по сравнению с другими атомами этих молекул расстояниями до атома железа гема. Например, в молекуле амитриптилина ближайший атом водорода реакционного центра расположен на расстоянии 3,23 Å от атома железа гема (рисунок, а). Таким образом, полученные в данных случаях ориентации молекул позволяют объяснить направления метаболических превращений.

Для молекулы (S)-флурбипрофена, расположение которой в полости изоформы 2C9 известно из экспериментальных данных [5], расстояние от атома железа до атома водорода в положении 4' составляет 4,47 Å, а до атома водорода в положении 5' — 4,66 Å. Подобная ориентация молекулы так же, как и в предыдущих случаях, объясняет протекание экспериментально наблю-

даемой реакции 4'-гидроксирования. Однако соотношение расстояний позволяет допустить возможность гидроксирования (S)-флурбипрофена также и в положение 5', несмотря на то, что из экспериментальных данных известно только о реакции 4'-гидроксирования [16].

Для последней группы субстратов (торсемид, клозапин, фенацетин, CMV423, диклофенак) некоторые атомы, не относящиеся к реакционным центрам, оказались расположенными к атому железа гема ближе, чем атомы реакционных центров. Например, для молекулы фенацетина, подвергающейся с участием изоформы 2C9 O-деэтированию, расстояния от атома железа гема до атомов водорода у атомов C1 и C2 этильной группы составляют соответственно 5,32 и 4,89 Å (рисунок, б), при том, что для осуществления данной реакции необходимо взаимодействие активного кислорода с атомом водорода у атома C1.

Возможно, что в случае данных субстратов полученные ориентации не являются окончательными, поскольку при моделировании не учитывалась возможность образования комплекса гема с кислородом. Встраивание молекулы кислорода между атомом железа гема и субстратом может привести к изменению расположения или конформации молекулы субстрата. Также на процесс метаболизма могут оказывать влияние стерические факторы. В молекуле фенацетина стерическое препятствие, оказываемое концевым фрагментом этильной группы (атомом C2), может приводить к снижению эффективности метаболизма, о чём свидетельствует максимальное по сравнению с другими субстратами значение константы Михаэлиса (таблица).

Следует отметить, что в случае тех субстратов, ориентация молекул которых в полученных при моделировании комплексах не позволяет однозначно объяснить экспериментально наблюдаемые направления ме-

Субстраты изоформы цитохрома P450 2C9, использованные для моделирования комплексов

Субстрат	Реакция	K <sub>М</sub> , мкмоль/л	d(Fe...X), Å	d(Fe...Y), Å
Амитриптилин	N-деметилирование	83 [6]	3,23	5,04
Индометацин	O-деметилирование	9,9 [7]	3,61	5,31
(S)-Мефенитоин	N-деметилирование	150 [8]	4,40	6,68
(S)-Напроксен	O-деметилирование	340,5 [9]	3,70	5,13
Толбутамид	метил-гидроксирование	131,7 [10]	4,32	5,13
Дапсон	N-гидроксирование	31 [11]	3,98	6,09
Целекоксиб	метил-гидроксирование	5,9 [12]	3,40	4,38
Фенитоин	4-гидроксирование	14,6 [13]	4,08	4,70
Тиенильная кислота	5-гидроксирование	5 [14]	3,56	4,66
Бисфенол А	окисление в хинон <sup>1</sup>	3,9 [15]	3,55	7,33
(S)-Флурбипрофен	4'-гидроксирование	1,9 [16]	4,47	4,66
Торсемид	метил-гидроксирование	23 [17]	4,24	3,73
Клозапин	N-деметилирование	19 [18]	5,48	5,23
Фенацетин	O-деэтирование	566 [19]	5,32	4,89
CMV423	8-гидроксирование	55 [20]	5,73	3,93
Диклофенак	4'-гидроксирование	15 [21]	11,26	3,94

**Примечания:** <sup>1</sup> направление реакции метаболизма известно только по косвенным данным. d — расстояние от атома железа гема до ближайших атомов субстрата, относящихся (Fe...X) и не относящихся (Fe...Y) к реакционному центру. CMV423 — 2-хлор-3-пиридин-3-ил-5,6,7,8-тетрагидроиндолизин-1-карбоксамид.

таболизма, реакционные центры молекул, тем не менее, расположены достаточно близко к атому железа гема. Соответствующие расстояния составляют от 4,24 до 5,73 Å (таблица). Единственным исключением является молекула диклофенака, реакционный центр которой направлен в противоположную от атома железа гема сторону. Во многих литературных источниках говорится о предпочтительности реакции 4'-гидроксилирования диклофенака с участием изоформы 2C9 и отсутствии продуктов его 5-гидроксилирования [21, 35], однако согласно другому источнику 5-гидроксилирование с участием 2C9 всё же возможно [36]. Поскольку молекула диклофенака расположена таким образом, что наименьшее расстояние до атома железа гема (3,94 Å) имеет атом водорода в положении 5, то можно считать, что в данном случае для молекулы диклофенака воспроизводится одна из 2 альтернативных ориентаций, при которой возможно 5-гидроксилирование.

Таким образом, полученные при моделировании комплексы воспроизводят структуры реальных комплексов изоформы 2C9 с субстратами с хорошим качеством, что позволяет объяснять направления метаболических реакций.

Для показателей констант Михаэлиса с использованием метода CoCon [32] получено регрессионное уравнение, содержащее 2 независимые переменные, которые представляют собой суммы энергий взаимодействия субстрата отдельно с изоформой и молекулами воды. Полученное регрессионное уравнение имеет вид:

$$pK_M = -6,75 - 0,21\sum E_{r,i} - 0,06\sum E_{w,j}$$

где  $pK_M$  — показатель константы Михаэлиса,  $E_{r,i}$  — энергия взаимодействия  $i$ -го атома белка,  $E_{w,j}$  — энергия взаимодействия  $j$ -го атома молекул воды.

Коэффициент корреляции составляет  $R = 0,984$ , при скользящем контроле его величина  $sR2 = 0,978$ , стандартное отклонение  $S = 0,029$ .

Как следует из регрессионного уравнения, величина показателя константы Михаэлиса повышается при понижении энергии взаимодействия активных центров как субстрата и белка, так и субстрата, и воды. Однако величина коэффициента перед суммой энергий взаимодействия активных центров субстрата и воды меньше, что позволяет сделать вывод о большей роли взаимодействий между активными центрами субстрата и белка.

В представленной работе выявлены наиболее активные конформеры рассмотренных субстратов по отношению к изоформе 2C9 цитохрома P450 и проведено моделирование их расположения в полости изоформы. Предложен метод определения направления метаболических превращений, основанный на рассмотрении ориентаций молекул в полученных при моделировании комплексах. Показано, что полученная путем моделирования при помощи алгоритма CiS ориентация субстратов в полости изоформы 2C9 позволяет воспроизвести путь метаболического процесса. Для

величин  $pK_M$  получено уравнение зависимости от энергий взаимодействия субстратов с изоформой и молекулами воды.

Работа выполнена при поддержке грантов ФЦП (научные и научно-педагогические кадры инновационной России), РФФИ (07-04-96053-р урал а), суперкомпьютерной программы СКИФ-ГРИД.

## ЛИТЕРАТУРА

1. R. Arimoto, *Cur. Top. Med. Chem.*, **6**(15), 1609 – 1618 (2006).
2. L. Afzelius, I. Zamora, C. M. Masimirembwa, et al., *J. Med. Chem.*, **47**(4), 907 – 914 (2004).
3. R. P. Sheridan, K. R. Korzekwa, R. A. Torres, and M. J. Walker, *J. Med. Chem.*, **50**(14), 3173 – 3184 (2007).
4. M. J. Sykes, R. A. McKinnon, and J. O. Miners, *J. Med. Chem.*, **51**(4), 780 – 791 (2008).
5. M. R. Wester, J. K. Yano, G. A. Schoch, et al., *J. Biol. Chem.*, **279**(34), 35630 – 35637 (2004).
6. O. V. Olesen and K. Linnet, *Pharmacology*, **55**(5), 235 – 243 (1997).
7. M. Nakajima, T. Inoue, N. Shimada, et al., *Drug Metab. Dispos.*, **26**(3), 261 – 266 (1998).
8. J. W. Ko, Z. Desta, and D. A. Flockhart, *Drug Metab. Dispos.*, **26**(8), 775 – 778 (1998).
9. T. S. Tracy, C. Marra, S. A. Wrighton, et al., *Eur. J. Clin. Pharm.*, **52**(4), 293 – 298 (1997).
10. M. E. Veronese, P. I. Mackenzie, C. J. Doecke, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**(3), 1112 – 1118 (1991).
11. H. R. Winter, Y. Wang, and J. D. Unadkat, *Drug Metab. Dispos.*, **28**(8), 865 – 868 (2000).
12. C. Tang, M. Shou, Q. Mei, et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **293**(2), 453 – 459 (2000).
13. G. M. Giancarlo, K. Venkatakrishnan, B. W. Granda, et al., *Eur. J. Clin. Pharm.*, **57**(1), 31 – 36 (2001).
14. P. Jean, P. Lopez-Garcia, P. Dansette, et al., *Eur. J. Biochem.*, **241**(3), 797 – 804 (1996).
15. T. Niwa, M. Fujimoto, K. Kishimoto, et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**(9), 1064 – 1067 (2001).
16. T. S. Tracy, B. W. Rosenbluth, S. A. Wrighton, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **49**(9), 1269 – 1275 (1995).
17. J. O. Miners, D. L. Rees, L. Valente, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**(3), 1076 – 1081 (1995).
18. K. Linnet and O. V. Olesen, *Drug Metab. Dispos.*, **25**(12), 1379 – 1382 (1997).
19. K. Venkatakrishnan, L. L. von Moltke, and D. J. Greenblatt, *J. Pharm. Sci.*, **87**(12), 1502 – 1507 (1998).
20. B. Bournique, N. Lambert, R. Boukaiba, and M. Martinet, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **52**(1), 53 – 63 (2001).
21. A. Mancu, M. Antignac, C. Minoletti, et al., *Biochemistry*, **38**(43), 14264 – 14270 (1999).
22. Е. В. Барташевич, М. А. Гришина, В. А. Потемкин, А. В. Белик, *Журн. структур. химии*, **43**(6), 1120 – 1127 (2002).
23. V. Potemkin and M. Grishina, *Drug Discovery Today*, **13**(21/22), 952 – 959 (2008).
24. A. M. Doweyko, *J. Med. Chem.*, **31**, 1396 – 1406 (1988).
25. M. Santagati, H. M. Chen, A. Santagati, et al., in: *Molecular Modelling and Prediction of Bioactivity*, K. Gundertofte and F. S. Jorgensen (eds.), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York (2000), pp. 433 – 439.
26. L. Piela, J. Kostrowicki, and H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **93**, 3339 – 3346 (1989).
27. R. V. Pappu, R. K. Hart, and J. W. Ponder, *J. Phys. Chem. B.*, **102**, 9725 – 9742 (1998).
28. М. А. Гришина, В. А. Потемкин, К. М. Микушина и др., *Биомед. химия*, **50**(Прил. № 1), 68 – 76 (2004).
29. V. A. Potemkin, M. A. Grishina, and E. V. Bartashevich, *J. Struct. Chem.*, **48**(1), 155 – 160 (2007).

30. V. A. Potemkin and M. A. Grishina, *J. Comp.-Aid. Mol. Des.*, **22**, 489 – 505 (2008).
31. А. А. Погребной, М. А. Гришина, В. А. Потемкин, *Журн. структур. химии*, **50**(5), 852 – 858 (2009).
32. V. Potemkin, A. Pogrebnoy, and M. Grishina, *J. Chem. Inf. Model.*, **49**(6), 1389 – 1406 (2009).
33. М. А. Гришина and V. А. Potemkin, *IX<sup>th</sup> International Seminar on Inclusion Compounds (ISIC-9)*, Book of Abstracts, Novosibirsk (2003), p. 73.
34. F. P. Guengerich, A. D. Vaz, G. N. Raner, et al., *Mol. Pharmacol.*, **51**, 147 – 151 (1997).
35. W. Tang, R. A. Stearns, R. W. Wang, et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **12**(2), 192 – 199 (1999).
36. R. Bort, K. Macé, A. Boobis, et al., *Biochem. Pharm.*, **58**(5), 787 – 796 (1999).

Поступила 12.11.08

## MODELING COMPLEXES OF SUBSTRATES WITH CYTOCHROME P450 2C9

A. A. Pogrebnoi, M. A. Grishina, V. A. Potemkin, and D. A. Sysakov

Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, 454021, Russia

Complexes of 16 substrates with 2C9 isoform of Cytochrome P450, based on the 1R9O complex taken from the PDB database, have been modeled using 3D-QSAR algorithm CiS. The arrangement of substrate molecules and the orientation of their reaction centers in modeled complexes with respect to the heme have been analyzed. The orientation of substrate molecules in the model complexes explains the experimentally observed metabolic reactions. The obtained results show that the CiS algorithm is capable of predicting of metabolic pathways of the modeled complexes.

**Key words:** Docking, modeling, complex, substrate, P450, 2C9, 1R9O