

А. И. Хлебников¹, Р. Р. Ахмеджанов², О. И. Набока¹, А. А. Бакибаев²,
М. И. Тартынова³, Т. П. Новожеева⁴, А. С. Саратиков³

КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВЫХ ЛИГАНДОВ ЦИТОХРОМА P-450 СРЕДИ СОЕДИНЕНИЙ МОЧЕВИНЫ

¹ Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова, Барнаул;

² Томский политехнический университет;

³ Сибирский государственный медицинский университет;

⁴ НИИ психического здоровья СО РАМН, Томск

На основе QSAR-моделей, построенных методом фронтальных многоугольников (ФМ), выполнено конструирование новых лигандов цитохрома P-450 СУРПВ1. Осуществлен *de novo* дизайн и синтез следующих соединений: 2-фенил-6-бензил-2,4,6,8-тетразабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион, N-ацетил-N'-(1-фенилэтил)мочевина, (1-фенил-3-метилбутил)мочевина. Спектрофотометрически исследовано взаимодействие этих веществ с фенобарбитал-индуцированными микросомами печени крыс. Измеренные константы диссоциации Ks фермент-субстратных комплексов хорошо согласуются со значениями, предсказанными с помощью QSAR-моделей. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования метода ФМ для конструирования биологически активных соединений.

Ранее [1–4] мы сообщали об исследовании взаимодействия ациклических и гетероциклических соединений мочевины с цитохромом P-450 фенобарбитал-индуцированных микросом печени крыс и построении удовлетворительных количественных моделей взаимосвязи структура — константа диссоциации (K_s) для исследованных нами субстратов I и II типа. Индукция фенобарбиталом приводит к преобладанию в микросомах изоформы СУРПВ1 цитохрома P-450 [5]. Как уже отмечалось [4], разработанный нами метод фронтальных многоугольников (ФМ) [6–8] позволяет не только строить количественные соотношения структура — активность, но и конструировать на основе уже исследованных соединений новые вещества с заданным уровнем биологической активности.

В настоящей работе нами выполнен *de novo* дизайн химических соединений I–III (схема), обладающих сходством к микросомальному цитохрому P-450, осуществлен их синтез и проведено спектроскопическое определение констант диссоциации фермент-субстратных комплексов. Это позволило проверить корректность априорной оценки величины биологической активности новых соединений с помощью метода ФМ.

Экспериментальная часть

Для конструирования ряда новых лигандов был использован подход, позволяющий проводить оптимальное построение химических структур из молекулярных фрагментов [9]. Основой для конструирования служил набор субмолекул, использованный ранее [4] при построении соотношений структура — K_s .

Подход к *de novo* дизайну молекулярных структур [9] предполагает использование набора физико-химических характеристик фрагментов, важных для процесса молекулярного распознавания. В качестве таких характеристик (дескрипторов) были выбраны молярная рефракция и гидрофобность, рассчитанные в работе [4] по атомным инкрементам [10]. Оптимальное конструирование проводилось таким образом, чтобы в целевых молекулярных структурах окружение фрагментов было близким к тако-

вому в исходном обучающем наборе биологически активных соединений [4]. Критерий оптимальности π вычисляли из следующих соотношений.

$$\pi = S(M)/D$$

$$S(M) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [w_r(R_i - r_i)^2 + w_h(H_i - h_i)^2]$$

$$D = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m [w_r(R_i - R_{cp})^2 + w_h(H_i - H_{cp})^2],$$

где n — количество атомов, смежных с другими фрагментами в молекулярной структуре M ; r_i и R_i — рефракции заместителей при i -м атоме соответственно в молекуле M и в соединении из обучающей выборки, содержащем данный фрагмент; h_i и H_i — аналогичные значения гидрофобности заместителей; m — количество атомов, смежных с другими фрагментами, во всех соединениях обучающей выборки; R_{cp} и H_{cp} — средние значения рефракции и гидрофобности заместителей во всех молекулярных фрагментах соединений обучающей выборки; $w_r = 0,00032$ и $w_h = 0,2$ — весовые коэффициенты.

Соединения I–III, найденные в результате конструирования по алгоритму [9], имеют критерии оптимальности π от 0,003 до 0,124.

Гликолурил I получали конденсацией глиоксаля с N-фенил- и N-бензилмочевинной [11]. Соединения II, III синтезировали по методикам [12].

Биологические эксперименты проводили на микросомах печени крыс-самцов линии Wistar массой 180–200 г, которым с интервалом в 24 ч трижды внутривенно вводили фенобарбитал-натрий (Merck) в дозе 80 мг/кг. Животных декапитировали через 48 ч после последней инъекции. Микросомальную фракцию печени выделяли методом дифференциального центрифугирования [13]. Содержание гемопротейда определяли методом Omura и Sato [14]; содержание микросомального белка устанавливали по Lowry [15]. Непосредственно перед проведением фотометрических измерений соединения I–III растворяли в свежеперегнанном диметилсульфоксиде (ДМСО) в

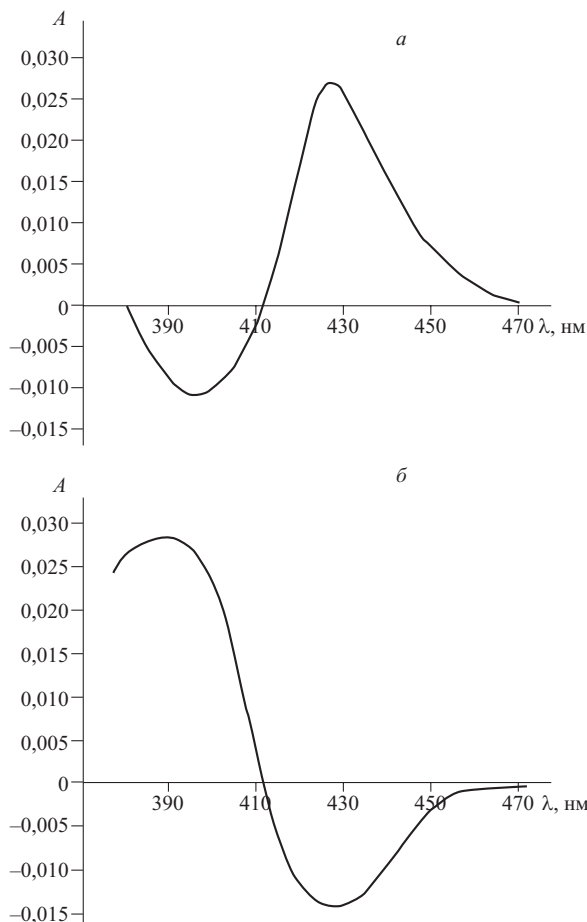


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения комплексов арилалкилмочевин II, III (а) и гликолурила I (б) с цитохромом Р-450. Толщина кюветы 1,00 см. Спектральные кривые для комплексов субстратов II и III практически совпадают.

концентрациях $1,46 \cdot 10^{-4}$; $4,25 \cdot 10^{-3}$; $1,65 \cdot 10^{-2}$ моль/л соответственно. Суспензию микросом готовили в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) и переносили в кюветы спектрофотометра Perkin Elmer 124. В рабочую кювету добавляли порциями раствор субстрата, а в кювету сравнения — равные порции ДМСО, периодически регистрируя дифференциальный спектр поглощения в области 370 – 470 нм. Концентрации субстратов в рабочей кювете находились в диапазоне от $3 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ М. Удельное содержание белка и цитохрома Р-450 в использованной суспензии микросом в кювете составляло 2,20 мг/мл и 4,55 нмоль/мл соответственно. Значения K_s определяли методом наименьших квадратов из концентрационных зависимостей оптической плотности в двойных обратных координатах Лайнуивера – Берка.

Результаты и их обсуждение

Для сконструированных нами химических структур I – III на схеме приведены значения прогноза биологической активности pK_s' , найденные по количественным соотношениям структура – активность (КССА) субстратов I типа — для гликолурила I, а для соединений II, III — по КССА субстратов II типа [4]. Эти характеристики далее сопоставлялись с экспериментально определёнными величинами pK_s фермент-субстратных комплексов (схема).

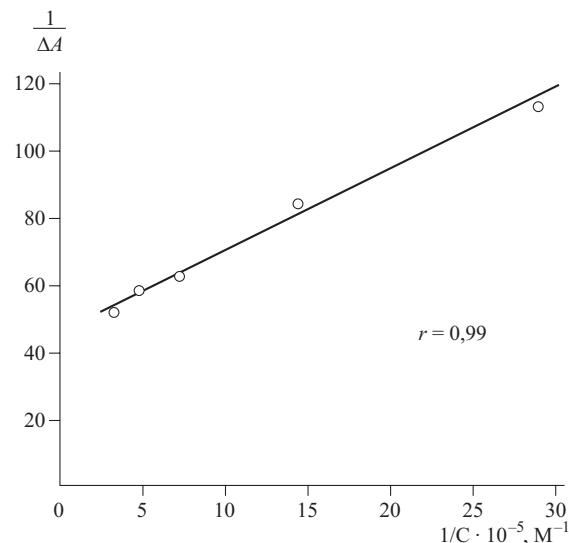
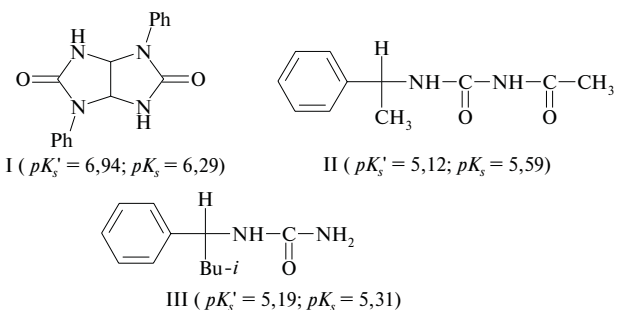


Рис. 2. Зависимости амплитуды спектральных изменений ΔA от концентрации C субстрата I в координатах Лайнуивера – Берка.

Комплексообразование цитохрома Р-450 с лигандом I сопровождается появлением спектральных изменений I типа ($\lambda_{\min} = 425$ нм, $\lambda_{\max} = 385$ нм), а с лигандами II, III — спектральных изменений II типа ($\lambda_{\min} = 393 - 395$ нм, $\lambda_{\max} = 427 - 428$ нм). Дифференциальные спектры поглощения комплексов изображены на рис. 1. Тип наблюдаемых спектральных изменений соответствует КССА-модели, использованной при конструировании и определении величин pK_s' . Линейные зависимости в координатах Лайнуивера – Берка (рис. 2 – 4) имеют коэффициенты корреляции не ниже 0,99. Прочность образуемых фермент-субстратных комплексов весьма высока. В случае субстратов II типа (II) и (III) экспериментально определённая величина pK_s составляет порядка 5,3 – 5,6, а для субстрата I типа (I) она достигает 6,29 (схема).



Интересно отметить, что дифференциальные спектры поглощения, характерные для комплексов соединений II и III, не наблюдаются в случае предварительного добавления метирапона (IV) или клотримазола (V) в обе кюветы спектрофотометра в насыщающих концентрациях. Это говорит о наличии конкуренции за связывание с активным центром гемопротейда между исследуемыми лигандами II, III и метирапоном или клотримазолом. Соединения IV и V известны как лиганды гемовой части цитохрома Р-450 [16, 17], избирательно связывающиеся с изоформой Р-450_b (СУРПВ1) в фенобарбитал-индуцированных микросомах печени крыс. Отмеченное обстоятельство, а также весьма низкие значения K_s фермент-суб-

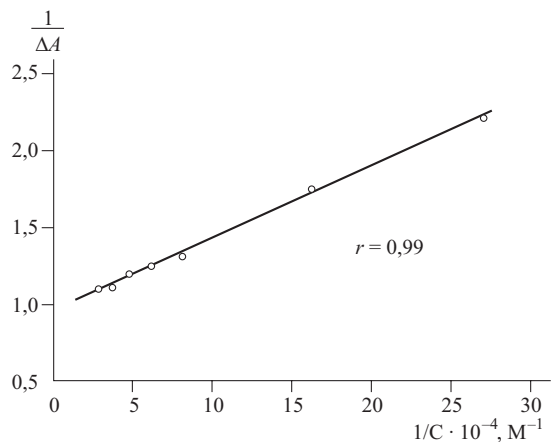


Рис. 3. Зависимости амплитуды спектральных изменений ΔA от концентрации C субстрата II в координатах Лайнуивера – Берка.

стратных комплексов соединений II и III, на наш взгляд, позволяют сделать вывод об избирательном характере их взаимодействия с основной фенобарбитал-индуцированной изоформой цитохрома P-450 и позволяет рассматривать лиганды II и III как потенциальные ингибиторы каталитической активности CYP1B1. Мы также обнаружили, что предварительное добавление соединения I в насыщающей концентрации в обе кюветы спектрофотометра приводит к исчезновению спектральных изменений I типа, характерных для гексобарбитала (VI). Последний известен как лиганд апопротеиновой части гемопротейда, ускорение метаболизма которого характерно для фенобарбиталового типа индукции [18, 19].

Отклонение экспериментально определённых rK_s от значений rK_s' для лигандов I – III равно в среднем 0,41. Это позволяет считать вполне удовлетворительным качество прогноза активности при выполненном *de novo* дизайне биологически активных веществ. Следует подчеркнуть, что применение метода ФМ и алгоритма [9] для этой цели в настоящей работе сделано впервые, и полученные результаты подтверждают перспективность используемого подхода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Р. Р. Ахмеджанов, А. И. Хлебников, О. И. Набока, А. С. Саратиков, *Хим.-фарм. журн.*, **32**(12), 43 – 45 (1998).
2. Р. Р. Ахмеджанов, А. И. Хлебников, О. И. Набока и др., *Хим.-фарм. журн.*, **33**(3), 51 – 53 (1999).
3. Р. Р. Ахмеджанов, А. И. Хлебников, О. И. Набока и др., *Хим.-фарм. журн.*, **33**(9), 38 – 40 (1999).

DESIGN OF NEW CYTOCHROME P450 LIGANDS AMONG UREA DERIVATIVES

A. I. Khlebnikov¹, R. R. Akhmedzhanov², O. I. Naboka¹, A. A. Bakibaev², M. I. Tartynova³, T. P. Novozheeva⁴, A. S. Saratikov³

¹ Altai State Technical University, Barnaul

² Tomsk Polytechnic University

³ Siberian Medical University

⁴ Research Institute of Psyche Health SB RAMS, Tomsk

Design of Cytochrome P450 CYP1B1 ligands was performed on the base of QSAR models derived by the Frontal Polygon (FP) method. The following compounds were designed: 2-phenyl-6-benzyl-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.0]octane-3,7-dione, N-acetyl-N'-(1-phenylethyl)urea, (1-phenyl-3-methylbutyl)urea. Their interaction with phenobarbital-induced hepatic microsomes from rat was investigated spectrophotometrically. The dissociation constants K_s of enzyme-substrate complexes measured are in good agreement with the values predicted by QSAR models. The results demonstrate usefulness of FP method for design of biologically active compounds.

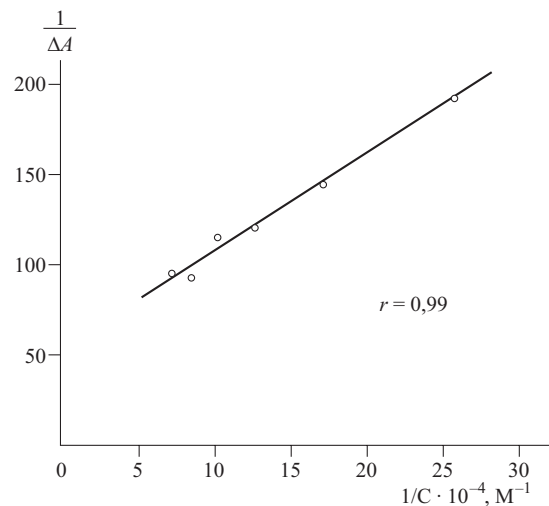


Рис. 4. Зависимости амплитуды спектральных изменений ΔA от концентрации C субстрата III в координатах Лайнуивера – Берка.

4. А. И. Хлебников, Р. Р. Ахмеджанов, О. И. Набока и др., *Хим.-фарм. журн.*, **33**(12), 17 – 23 (1999).
5. А. А. Бакибаев, Т. П. Новожеева, Р. Р. Ахмеджанов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **29**(3), 3 – 13 (1995).
6. А. И. Хлебников, *Хим.-фарм. журн.*, **28**(11), 32 – 35 (1994).
7. А. И. Хлебников, *Журн. структур. химии*, **36**(6), 1083 – 1087 (1995).
8. А. И. Хлебников, *Хим.-фарм. журн.*, **31**(3), 41 – 48 (1997).
9. А. И. Хлебников, *Журн. структур. химии*, **39**(4), 698 – 707 (1998).
10. A. K. Ghose and G. M. Crippen, *J. Med. Chem.*, **28**, 333 – 346 (1985).
11. А. И. Хлебников, О. И. Набока, Р. Р. Ахмеджанов и др., *Современные проблемы органической химии. Тез. докл. науч. конф., посвященной 70-летию со дня рождения Академика В. А. Коптюга*, СО РАН, Новосибирск (2001), с. 112.
12. *Успехи химии в создании новых биологически активных соединений*, А. А. Бакибаев (ред.), НТЛ, Томск (1998).
13. И. И. Карузина, А. И. Арчаков, *Современные методы биохимии*, Наука, Москва (1977), сс. 49 – 62.
14. T. Omura and R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 – 2378 (1964).
15. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 – 275 (1951).
16. A. D. Rodrigues, D. F. V. Levis, C. Ioannides and D. V. Parke, *Xenobiotica*, **17**, 1315 – 1327 (1987).
17. V. Luu-The, J. Cumps, and P. Dumont, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**(3), 776 – 781 (1980).
18. J. V. Schenkman, *Biochemistry*, **9**, 2081 – 2091 (1970).
19. В. М. Мишин, В. В. Ляхович, *Множественные формы цитохрома P-450*, Наука. Сиб.отд-ние, Новосибирск (1985).

Поступила 02.06.03.