ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ДИГИДРОПИРИМИДИНОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

[1]Переяславская Е.С., [1]Барташевич Е.В., [1]Потемкин В.А., [1]Гришина М.А., [2]Федорова О.В., [2]Русинов Г.Л.

[1]Челябинский государственный университет, г.Челябинск

[2]Институт органического синтеза УрО РАН, г.Екатеринбург

Выполнено комплексное исследование туберкулостатической активности дигидропиримидинов с помощью 3D-QSAR алгоритма BiS/MC. Исследованы электронные и энергетические характеристики структур (ab initio, DFT B3LYP/6-311G(d,p)), установлена количественная взаимосвязь pMIC с плотностью потенциальной энергии в критической точке на связи N1—C2 дигидропиримидинового цикла и зарядами атомных бассейнов C4, C5. При анализе комплексов соединений с дигидрофолатредуктазой выявлено, что биологическая активность зависит от ориентации дигидропиримидинов по отношению к PHE31.

В настоящее время резко возрос интерес к новым комплексным методам разработки лекарственных препаратов, обладающих противотуберкулезным действием. Несмотря на то, что известно большое количество соединений, обладающих противотуберкулезной активностью, негативными свойствами ряда из них являются высокая токсичность, низкая биодоступность, а так же трудности транспорта через многослойные мембраны бактерий. Кроме того, быстрое развитие лекарственной резистентности у *Micobacterium tuberculosis* требует создания новых препаратов. На сегодняшний день в центре внимания остается интересный и перспективный класс лекарственных соединений, относящихся к ряду дигидропиримидинов. Дигидропиримидины обладают высоким фармакологическим потенциалом, и обнаруживают важные биологические свойства – являются модуляторами кальциевых каналов, антагонистами адренорецепторов, а так же противоопухолевыми и противогипертоническими агентами [1].

В данной работе проведено комплексное теоретическое исследование дигидропиримидинов, обладающих туберкулостатической активностью. Ряд исследуемых соединений содержит в своем составе подандную цепь. Экспериментальные значения биологической активности представлены в работе величинами минимальной ингибирующей концентрации (*pMIC*) [2]. Наиболее активны в рассматриваемом ряду триазолодигидропиримидины, включающие заместители в положении C4 пиримидинового кольца, такие как тиофен, фенил и о-нитрофенил. Тетразолодигидропиримидины характеризуются менее высокой активностью. В рассматриваемом ряду соединения с подандной цепью обладают высокой туберкулостатической активностью в том случае, когда число оксиэтиленовых звеньев равно пяти, при уменьшении числа звеньев наблюдается менее высокая активность. Аналоги гетероциклических подандов, не содержащие подандной цепи, обладают, как правило, низкой туберкулостатической активностью.

Комплексное исследование биологической активности соединений производилось в рамках 3D-QSAR алгоритма BiS/MC [3, 4]. Первый этап моделирования включал уточнение конформационного состояния и таутомерных форм структур. Проведен конформационный анализ исследуемой выборки дигидропиримидинов и найдены конформеры, ответственные за проявление биологической активности. При этом отмечено, что соединения с подандной цепью приобретают конформацию, при которой наблюдается сближение двух пар дигидропиримидиновых колец в параллельных плоскостях. При этом достаточно длинные подандные цепи образуют внутримолекулярную полость. Наличие внутримолекулярной полости может обеспечивать способность таких соединений к комплексообразованию с катионами металлов за счет донорно-акцепторных взаимодействий с гетероатомами колец. Об этом свидетельствуют данные, полученные при исследовании структуры комплексных

соединений подандов с катионами металлов в растворах хлороформа методами ИК и ПМР спектроскопии [5]. Следует отметить, что комплексообразование влияет на катионный обмен клеток *Micobacterium tuberculosis*, приводящий к изменению гомеостаза клетки и ее гибели. Поэтому наличие подандной цепи можно отнести к важному свойству структуры, обеспечивающему повышенную биологическую активность таких соединений. Уменьшение числа звеньев в подандной цепи снижает способность к комплексообразованию с катионами, что может влиять на величину биологической активности.

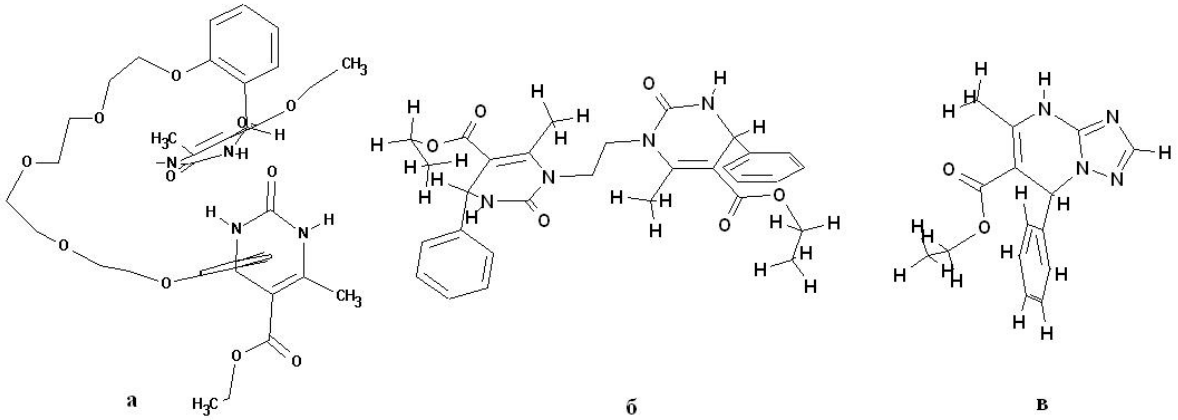


Рис.1. Характерные особенности структуры дигидропиримидинов: внутримолекулярное взаимодействие пары дигидропиримидиновых колец (а) на концах подандной цепи; ортогональное расположение ароматического заместителя и плоскости дигидропиримидинового циклов (а-в).

Один из возможных механизмов противотуберкулезного действия производных пиримидина заключается в связывании с дигидрофолатредуктазой [6]. Поэтому в настоящей работе выполнено моделирование комплексов рассматриваемых соединений с данным ферментом. Для этого на первом шаге моделирования установлена относительная ориентация структур в гипотетическом рецепторе с помощью алгоритма BiS/MC [4, 5]. Далее использование данных рентгеноструктурного анализа комплекса дигидрофолатредуктазы с известным лекарственным препаратом и результата ориентации молекул, полученного в рамках алгоритма BiS, позволило определить ориентацию рассматриваемых соединений в ферменте, которая уточняется в ходе оптимизации геометрии с использованием силового поля MM3. Достоверность ориентации молекул в рецепторе была проверена сопоставлением с известными данными рентгеноструктурного анализа [6]. Результаты сопоставления расчетных и экспериментальных координат атомов соединений 1df7, 1dg5, 1dg7 (идентификаторы в Protein Data Bank) приведены в таблице.

Сопоставление расчетных координат и данных рентгеноструктурного анализа известных ингибиторов дигидрофолатредуктазы

Структура	Стандартное отклонение, Å	Максимальное отклонение, Å
1df7	1.2	2.1
1dg5	0.3	0.7
1dg7	0.0	0.0

Показано, что расчетная ориентация хорошо согласуется с экспериментально установленной. Поэтому установленная ориентация дигидропиримидинов позволяет выявить их фармакофорные группы. По данным моделирования, фармакофорными частями являются атомы азота и кратная связь C5-C6 дигидропиримидиного цикла, а также триазольный и тетразольный фрагменты аннелированных циклов, ароматические заместители в положении C4. Эти фрагменты обеспечивают эффективное связывание с рецептором. Для гетероциклических подандов, по данным моделирования установлено, что подандная цепь не

взаимодействует с аминокислотными остатками рецептора. Действительно, увеличение объема молекул за счет подандной цепи может приводить к возникновению значительных стерических затруднений при ее встраивании в полость рецептора. Также установлено, что для триазоло- и тетразолодигидропиримидинов карбоксиэтильная группа в положении С5 не взаимодействует с аминокислотными остатками рецептора.

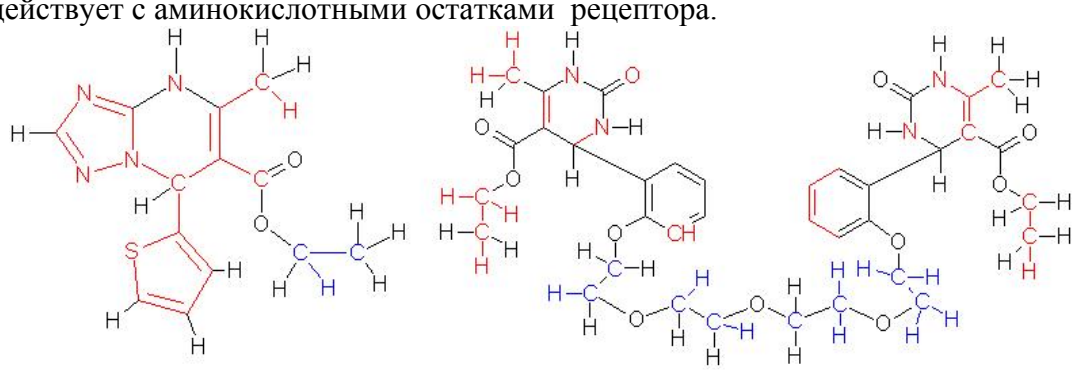


Рис. 2. Фармакофорные и антифармакофорные фрагменты в триазолодигидропиримидине и дигидропиримидинах с подандной цепью (красный цвет – фармакофорная часть, синий цвет – антифармакофорная)

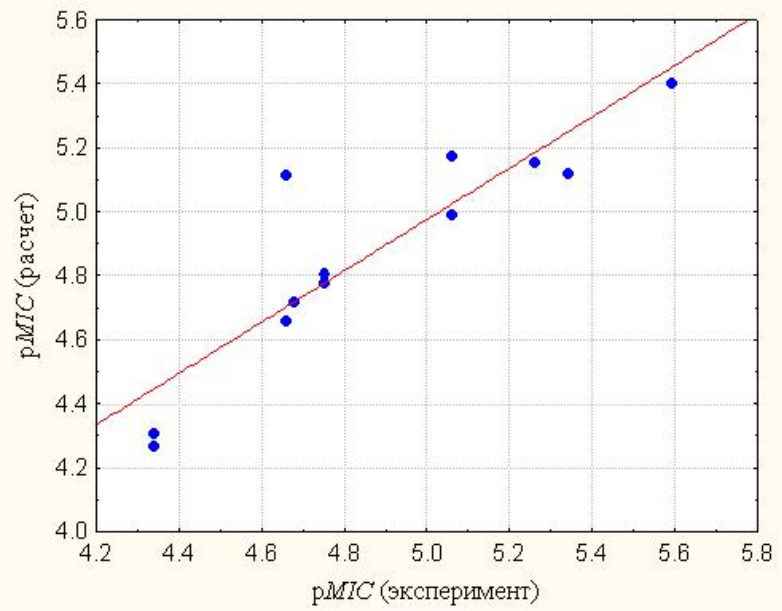
Для уточнения того, какие именно атомы и фрагменты дигидропиримидинового цикла оказывают решающее значение в проявлении биологической активности, произведены расчеты электронных и энергетических характеристик структур дигидропиримидинов с помощью квантовохимических методов *ab initio,* базис DFT B3LYP/6-311G(d,p). Выполнен топологический анализ электронной плотности, вычислены электронные характеристики в критических точках электронной плотности. Произведено интегрирование электронных и энергетических характеристик по атомным бассейнам.

Установлено, что биологическая активность соединений связана с интегральными характеристиками атомов гетероцикла. Величина *pMIC* может быть описана уравнением:

$$pMIC = 7 - 15V_2 + 11(Q_5 + Q_4) \qquad (1)$$

где V_2 – плотность потенциальной энергии в критической точке (3;-1) отвечающей ковалентному связыванию атомов N1-C2 дигидропиримидинового цикла, Q_5 – заряд бассейна С5; Q_4 – заряд бассейна С4.

Коэффициент корреляции составляет R = 0.90, критерий Фишера F = 11, стандартное отклонение S = 1.3.



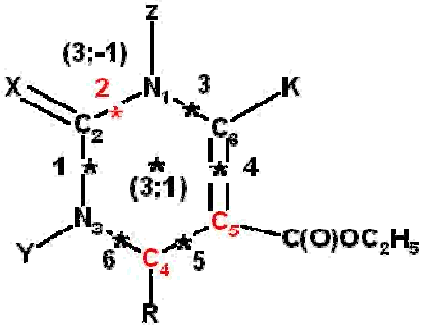


Рис. 3. Экспериментальные и расчетные (уравнение 1) величины pMIC

Таким образом, наличие значительной электронной плотности на пятом углеродном атоме дигидропиримидинового цикла положительно сказывается на проявлении туберкулостатической активности. При этом наблюдается достаточно сильное разделение зарядов на атомах двойной связи C5-C6. Предположено, что кратная связь дигидропиримидинового цикла способна проявлять акцепторные свойства по отношению к атомам водорода, участвующим в восстановительном процессе на дигидрофолатредуктазе.

Анализ пространственного строения полученных комплексов дигидропиримидинов с белком показал, что молекулы, проявляющие биологическую активность, располагаются у входа в полость рецептора, которая представлена аминокислотными остатками ARG23, ARG32, ARG60, VAL54, GLN28, PHE31, LYS53, PRO25, PRO51, MET36. Таким образом, дигидропиримидины оказываются связанными посредством межмолекулярных взаимодействий с аминокислотными остатками ARG32, ARG60, VAL54, GLN28, PHE31, LYS53. Отмечено, что для наиболее активных молекул реализуется большее количество таких взаимодействий, что отвечает более эффективному связыванию. Установлено, что для тетразолодигидропиримидинов не наблюдается взаимодействия с ARG32, связанное с отсутствием атома водорода в тетразольном цикле.

Карбоксиэтильная группа в положении C5 дигидропиримидинов в большинстве случаев гидратирована в белке и не участвует в связывании с ним. В случаях, когда молекулы воды блокируют полярные центры соединений и препятствуют межмолекулярным контактам с PHE31 и LYS53, наблюдается заметное снижение активности. Взаимодействие с LYS53 осуществляется посредством заместителя при атоме C4 дигидропиримидинового цикла.

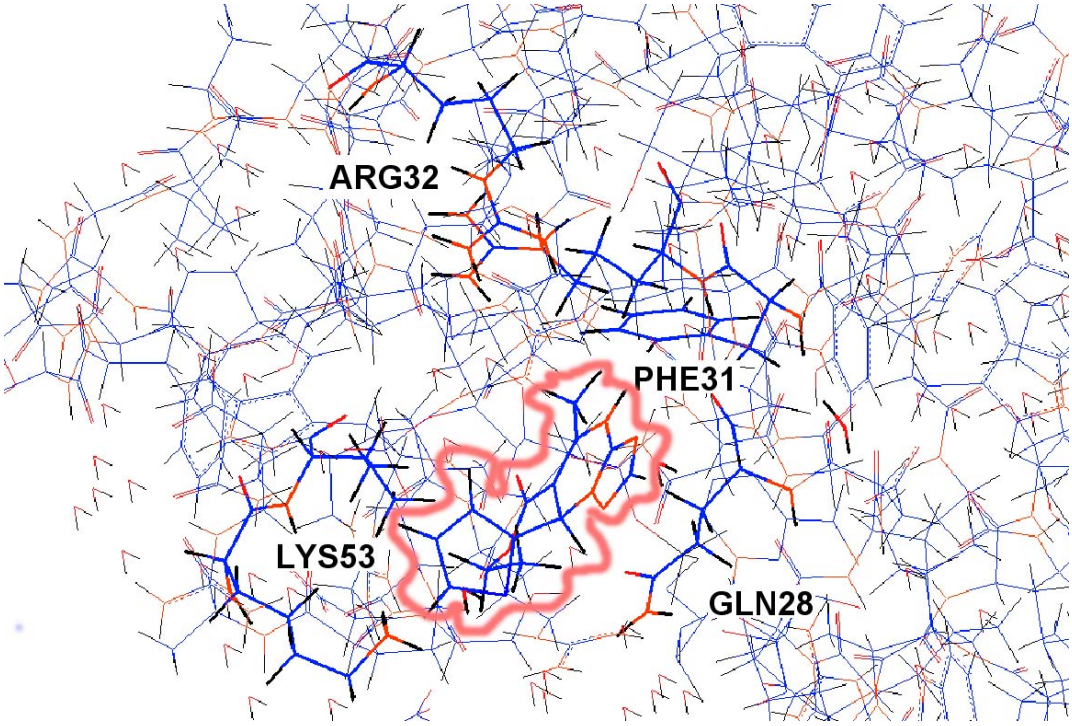


Рис. 4. Характерное размещение производного триазолодигидропиримидина в полости дигидрофолатредуктазы.

Для фенильного фрагмента аминокислотного остатка PHE31 наблюдается непосредственное участие во взаимодействии с дигидропиримидинами. Для соединений с высоким значением биологической активности наблюдается, как правило, ортогональная ориентация дигидропиримидинового цикла и фенильного фрагмента PHE31. Для менее активных соединений характерна параллельная ориентация ароматических заместителей дигидропиримидинового цикла в положении C4 и PHE31, соответственно становится возможным π-π-взаимодействие описанных фрагментов структур.

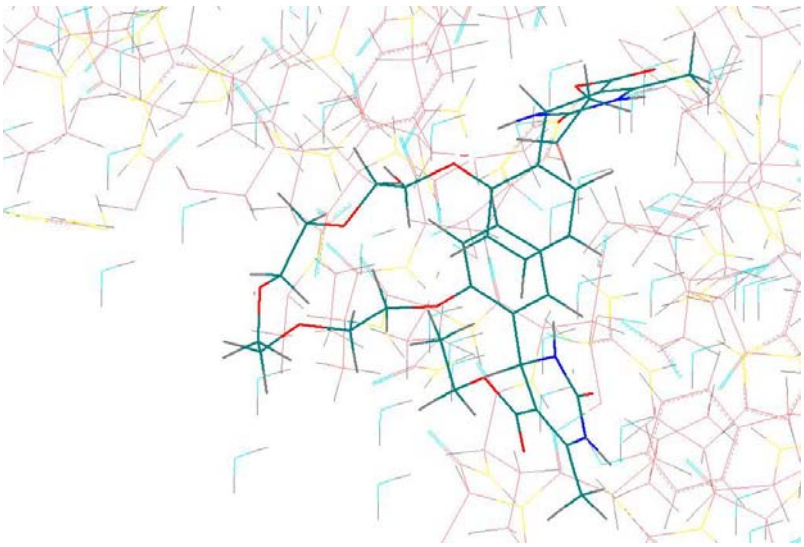


Рис. 6. Расположение гетероциклических подандов в рецепторе дегидрофолатредуктазы.

Встраивание гетероциклических подандов в рецептор происходит таким образом, что дигидропиримидиновые циклы ориентируются около ARG32, ARG3260, VAL54, GLN28, PHE31, LYS53, а подандная цепь располагается вне полости рецептора, что подтверждает предположение о том, что она может являться стерическим препятствием в процессе встраивания в полость рецептора.

Таким образом, в результате комплексного теоретического исследования дигидропиримидинов выявлены конформеры, ответственные за процесс биологического действия соединений. В рамках алгоритма BiS/MC установлено, что фармакофорной частью молекул является связка N2—C4—C5=C6—N1 дигидропиримидиного цикла, что подтверждается количественной взаимосвязью *pMIC* с плотностью потенциальной энергии в критической точке связи N1—C2 дигидропиримидинового цикла и зарядами атомных бассейнов C4, C5 (коэффициент корреляции 0.90). Кроме того, выявлено, что биологическая активность соединений зависит от ориентации дигидропиримидинов по отношению к фенильному фрагменту PHE31.

Литература

1. *Kappe C.O.* Biologically active dihydropyrimidenes of the Biginelli-type – a literature survey// Eur. J. Med. Chem. 2000. 35. P. 1043-1052.
2. *Потемкин В.А., Гришина М.А., Федорова О.В., Русинов Г.Л., Овчинникова И.Г., Ишметова Р.И.* Теоретическое исследование противотуберкулезной активности мембранотропных подандов// Хим.-фарм. журн. 2003. Т. 37. С. 17-21.
3. *Potemkin V. A., Bartashevich E. V., Grishina M. A., Guccione S.* An Alternative Method for 3D-QSAR and the Alignment of Molecular Structures: BiS (Biological Substrate Search)// Rational Approaches to Drug Design. Barcelona: Prous Science Publishers, 2001. P. 349-353.
4. *Гришина М.А., Потемкин В.А., Микушина К.М., Пожиленкова Г.В., Лауфер С.* Комбинированный подход к анализу биологической активности соединений// Биомедицинская химия. 2004. Т. 50. Прил. № 1. С. 68-76.
5. *Федорова О.В., Мордовской Г.Г.,. Русинов Г.Л и др.*, Поиск соединений с туберкулостатической активностью среди синтнтических ионофоров – подандов// Хим.-фарм. журн. 1996. Т. 30. N 10, С. 6-7.
6. *Li R.,Sirawaraporn R., Chitnumsub P., Sirawaraporn W., Wooden J., Athappilly F., Turley, S., Hol W.G.* Three-dimensional structure of M. tuberculosis dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs// J. Mol. Biol. 2000. V. 295. P.307-323.