МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ С НЕЙРАМИНИДАЗОЙ ГРИППА А

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

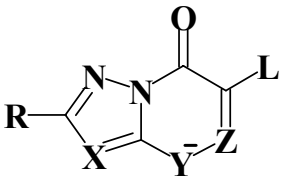
[1]Челябинский государственный университет, г.Челябинск

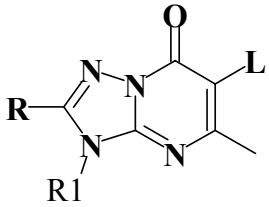
[2]Институт органического синтеза, г.Екатеринбург

Проведен комплексный анализ противовирусных средств – ингибиторов нейраминидазы вируса гриппа А, большинство из которых является солями, включающими гетероциклические фрагменты. В рамках 3D QSAR алгоритма BiS проведено моделирование комплексов «рецептор-лиганд», определены фармакофорные части соединений, найдена ориентация соединений в полости реального рецептора – нейраминидазы. Определены количественные взаимосвязи активности от параметров строения комплексов «модельный рецептор – лиганд» и «реальный рецептор (вирусная нейраминидаза) – лиганд» с коэффициентами корреляции не менее 0.91. Полученные закономерности позволили выделить активные центры в противовирусных соединениях.

Нейраминидаза играет важную роль в процессе инфицирования на начальных стадиях проникновения вирусов гриппа в клетки хозяина [1-4]. Кроме того, она является ферментом, ответственным за выход вирионов гриппа из зараженной клетки, что обеспечивает распространение вирионов к новым клеткам [1-4]. В связи с этим к числу важнейших достижений последних лет в лечении и профилактики гриппа А является создание лекарственных препаратов, блокирующих нейраминидазу [4]. Важным подходом к решению задач прогноза новых эффективных препаратов является теоретическое исследование влияния структурных факторов и возможности комплексообразования лекарственных средств с нейраминидазой на процесс их биологического действия.

Поэтому в данной работе проведен комплексный анализ противовирусных средств – ингибиторов нейраминидазы, включающих фрагменты азотсодержащих гетероциклов (азолоаннелированных производных триазина, пиримидина), подавляющее большинство которых представляет собой органические соли натрия, калия, аммониевых оснований, пиридиния.





Kat^+

Kat^+ = Na^+, K^+, аммониевые катионы, пиридиний

X, Z = N, C; Y = N^-; R = Me, H, SMe, Ph, Py; R_1=Me, $C_{12}H_{25}$, C_4H_8OAc

Проведенный предварительный анализ показал, что важное влияние на биологическую активность оказывает катион соединений. Обнаружено, что активность соединений, как правило, убывает в ряду солей адамантиламмония, пиридиния, аммония, натрия при одном и том же анионе. Рассмотрение влияния заместителей, входящих в состав аниона, а также нейтральных молекул не позволило выявить каких-либо явных закономерностей. Поэтому проведен детальный анализ с построением количественных взаимосвязей величины активности от параметров строения соединений.

Рассмотрено влияние энергетических, орбитальных, зарядовых, геометрических характеристик структур противовирусных средств, способности их к образованию комплекса с вирусной нейраминидазой на величину активности. Для этого на первом этапе определена оптимальная геометрия структур противовирусных средств, соответствующая глобальному минимуму потенциальной энергии [5]. Поскольку в выборку соединений входят соли, поэтому для моделирования их оптимальной геометрии с учетом влияния водного

окружения, составляющего основу внутренней среды организма человека, использован алгоритм MOPS. Данный алгоритм, являющийся модификацией алгоритмов, представленных в работе [5,6], осуществляет поиск наиболее выгодных структур вдоль колебательных мод гессиана с континуальным учетом влияния растворителя.

Анализ полученных структур показал следующее. Обнаружено, что соли органических оснований представляют собой ассоциат, в котором наблюдается взаимодействие между аммонийным водородом и кислородом NO2- группы аниона (Рис.1а,б). При этом отмечено, что в случае солей пиридиния наблюдается параллельное расположение плоскостей гетероароматических колец катиона и аниона, что продемонстрировано на Рис.1б. Для солей неорганических оснований характерна ориентация катионов Na^+ и K^+ над центром шестичленного цикла (Рис.1в).

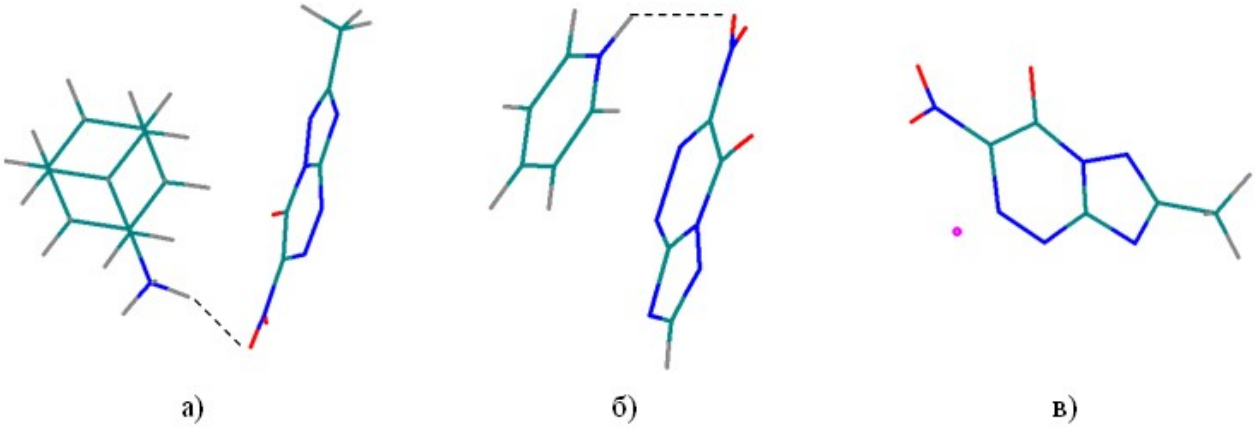


Рис. 1. Геометрия наиболее выгодных структур солей противовирусных средств.

Проведено рассмотрение характеристик полученных структур. Обнаружено, что величина биологической активности соединений увеличивается с увеличением энергий межмолекулярных взаимодействий ($E_{МежМол}$), а также с понижением энергий высшей занятой ($E_{ВЗМО}$) и нижней свободной молекулярной орбитали ($E_{НСМО}$) (коэффициент корреляции R=0.97):

$$BA = -19 + 31E_{МежМол} - 20E_{НСМО} - 16E_{ВЗМО}$$

В связи с этим можно предположить, что важную роль в проявлении активности соединениями играет их способность к ассоциации: в случае повышения энергии межмолекулярных взаимодействий, понижается способность к ассоциации с молекулами воды, а значит, повышается вероятность адсорбции на рецепторе, что ведет к повышению биологической активности. Данные результаты вполне соответствуют известным представлениям, например, правилам Липинского. Кроме того, более низкие значения энергий граничных орбиталей в случае высокоактивных соединений свидетельствуют о предпочтительности проявления соединениями более высоких электрофильных свойств при биологическом действии. Для уточнения механизма действия рассмотренных соединений проведено рассмотрение взаимодействия противовирусных средств с рецептором.

Поскольку для наиболее выгодных структур, найденных на первом этапе исследования, характерно существование двух зеркальных антиподов [7], которые обладают различной способностью к связыванию с хиральным биологическим рецептором, в рамках алгоритма BiS/MC осуществлен отбор структур, ответственных за проявление биологической активности [8].

Для каждого из соединений отобран зеркальный антипод, ответственный за проявление противовирусной активности. В рамках 3D-QSAR алгоритма BiS [7-9] проведено построение псевдоатомного рецептора и моделирование комплексов «рецептор-лиганд». Показано, что модельный рецептор имеет вид сферы, донная часть которой представлена электроотрицательными атомами азота и кислорода, входная часть – более

электроположительными атомами углерода, водорода, серы. Поэтому полученный в рамках алгоритма BiS рецептор может моделировать взаимодействие противовирусных соединений с –NH-, -COO-, -OH, -SH группами аминокислотных остатков нейраминидазы, а также молекулами воды. Найденное уравнение зависимости противовирусной активности от параметров строения комплексов «модельный рецептор - лиганд» описывает величину активности с коэффициентом корреляции R=0.999.

Рассмотрение вида комплексов «модельный рецептор – лиганд» выявило следующие закономерности. Обнаружено, что катионы наиболее активных соединений ориентируются рядом с отрицательно заряженной частью модельного рецептора, а анионы - рядом с положительно заряженной частью рецептора (Рис.2а). Для менее активных соединений характерна обратная картина: катион образовывает невыгодные электростатические взаимодействия с положительно заряженной частью модельного рецептора, представленной атомами водорода, а анион – с электроотрицательными атомами азота и кислорода (Рис.2б).

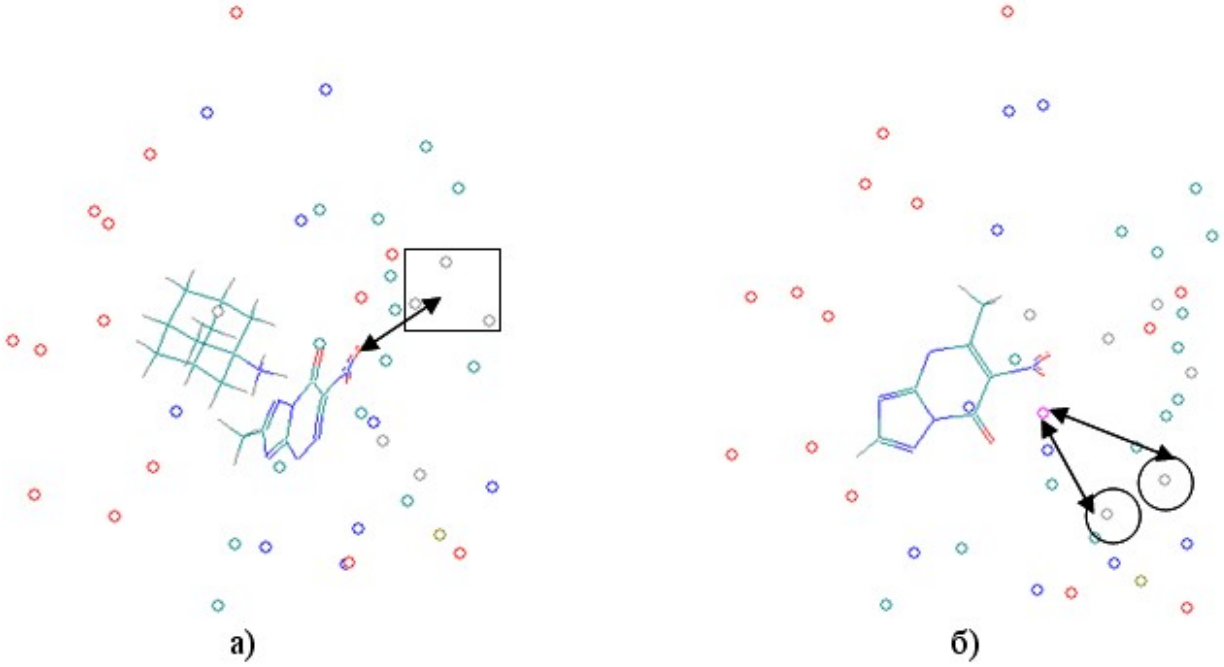


Рис. 2. Внешний вид комплексов противовирусных средств с модельным рецептором, полученным в рамках 3D QSAR алгоритма BiS: а) высокоактивное соединение (эффективность 91%), б) низкоактивное соединение (эффективность 26%)

- атомы водорода, - атомы углерода, - атомы кислорода, атомы азота, - атомы калия, - атомы серы

В рамках алгоритма BiS определены фармакофорная и антифармакофорная части соединений. Обнаружено, что повышению биологической активности способствуют метиленовые фрагменты катиона, алкильные заместители аниона, а также атомы кислорода и азота, входящие в состав гетероцикла, карбонильных и нитрогрупп. Все эти фрагменты определяют фармакофорную часть соединений (Рис.3). Снижают активность положительно заряженные атомы азота и углерода $-NO_2$, >C=O групп, заместителей L, что в ряде случаев может вести к суммарному негативному влиянию данных групп на величину биологической активности соединений (Рис. 3).

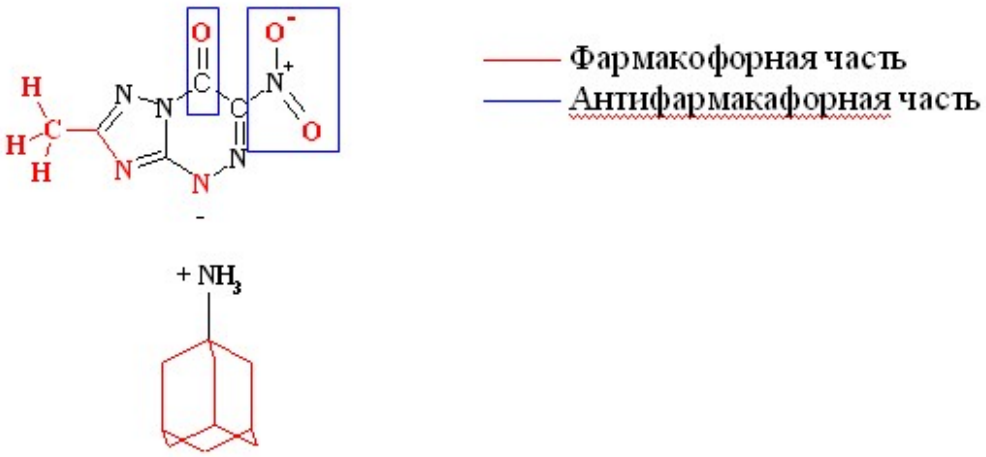


Рис. 3. Фармакофорная и антифармакофорная части противовирусного средства

Положительное влияние метиленовых групп катиона и алкильных групп аниона связано с их ориентацией около отрицательно заряженной части модельного рецептора (Рис.2а) – атомов кислорода. Кроме того, данные объемные заместители обеспечивают наиболее плотное прилегание к рецептору. Снижение активности соединений связано с ориентацией данных групп около положительно заряженных псевдоатомов углерода и водорода и невыгодному взаимодействию с ними.

Усиление активности, связанное с введением атомов азота в гетероциклические кольца, может происходить вследствие преимущественной ориентации данных фрагментов соединений около атомов углерода и водорода модельного рецептора. Кроме того, повышение количества атомов азота в кольце гетероцикла приводит к усилению электрофильных свойств соединений, что, как было показано выше, является важным при проявлении биологического действия. Все эти факторы, приводят к тому, что атомы азота определяют фармакофорную часть молекулы. Поэтому в случае близости атомов азота гетероциклических колец с атомами кислорода модельного рецептора приводит к слабому взаимодействию с рецептором в целом и, как следствие, к снижению эффективности противовирусного средства.

Атомы кислорода карбонильной группы и заместителя L обеспечивают связывание с атомами водорода модельного рецептора (атомы, заключенные в прямоугольник на Рис.2а). Такое взаимодействие, приводит к увеличению эффективности лекарственных препаратов, поэтому атомы кислорода заместителя L и >C=O группы обеспечивают фармакофорную функцию. В случае отсутствия подобных контактов, наблюдается понижение активности препаратов. При этом для низкоактивных соединений возможны два варианта ориентации. Первый вариант включает координацию атомов кислорода заместителя L и >C=O группы соединений около атомов кислорода и азота модельного рецептора. Другим вариантом является ориентация атомов кислорода перечисленных заместителей около псевдоатомов водорода, заключенных в круг (Рис.2б). В этом случае псевдоатомы водорода могут моделировать атомы водорода молекул воды, тогда сольватация фармакофорных фрагментов (атомов кислорода >C=O группы и заместителя L) может препятствовать контакту с рецептором.

Результат ориентации молекул, полученный в рамках алгоритма BiS, позволил определить расположение противовирусных средств в полости реального рецептора – нейраминидазы, для которой в Protein Data Bank [10] были найдены данные рентгеноструктурного анализа. Для этого использован подход, представленный в работах [7,11,12]. После ориентации лекарственных средств в полости нейраминидазы осуществлен поиск оптимальной геометрии полученных комплексов в силовом поле MM3.

Рассмотрение структур данных комплексов показало, что полость, в которую встраивается лекарственное средство, представлена следующими аминокислотными остатками: ARG118, GLU119, ILE149, ASP151, ARG152, GLU196, ASN221, ILE222, ARG224, GLU227, ALA246, GLU276, GLU277, LYS292, ARG371, TYR406, PRO431 (Рис. 4). Поверхность полости содержит большое количество аминных, карбоксильных, карбонильных и гидроксильных групп. Высокая гидрофильность полости приводит к координации значительного числа молекул воды, которые принимают активное участие в стабилизации комплекса «фермент - лекарственное средство».

Для наиболее активных молекул наблюдается более эффективное связывание с данными аминокислотными остатками: отрицательно заряженные атомы/группы атомов лекарственного соединения координируются около положительно заряженной части фермента (в основном это атомы водорода аминокислотных остатков); положительно заряженная часть соединений стремиться расположиться рядом с электроотрицательными атомами –NH-, -COO-, -OH групп аминокислотных остатков, что хорошо согласуется с результатами, полученными при моделировании рецептора в рамках алгоритма BiS. При этом образуется максимальное количество электростатических взаимодействий. У менее активных молекул картина взаимодействия с рецептором обратная.

Рассмотрение влияния катиона на биологическую активность показало, что важным для проявления активности соединением является способность катиона встраиваться в полость рецептора и взаимодействовать атомами водорода при аминогруппе с отрицательно заряженными атомами кислорода ASP151 фермента. Высокая способность катиона к сольватации молекулами воды не позволяет ему проникать в полость фермента, по этой причине соли натрия и калия являются менее активными. Для органических аммониевых катионов возникает дополнительное ван-дер-ваальсовое взаимодействие с нейраминидазой, что хорошо согласуется с результатами анализа фармакофорных частей, полученных в рамках алгоритма BiS. При этом реализуются взаимодействия метиленовых фрагментов адамантиламмония, либо атомов водорода и углерода кольца пиридиния с атомами водорода метильных и метиленовых групп аминокислотных остатков ILE222, ARG224, ALA246 фермента.

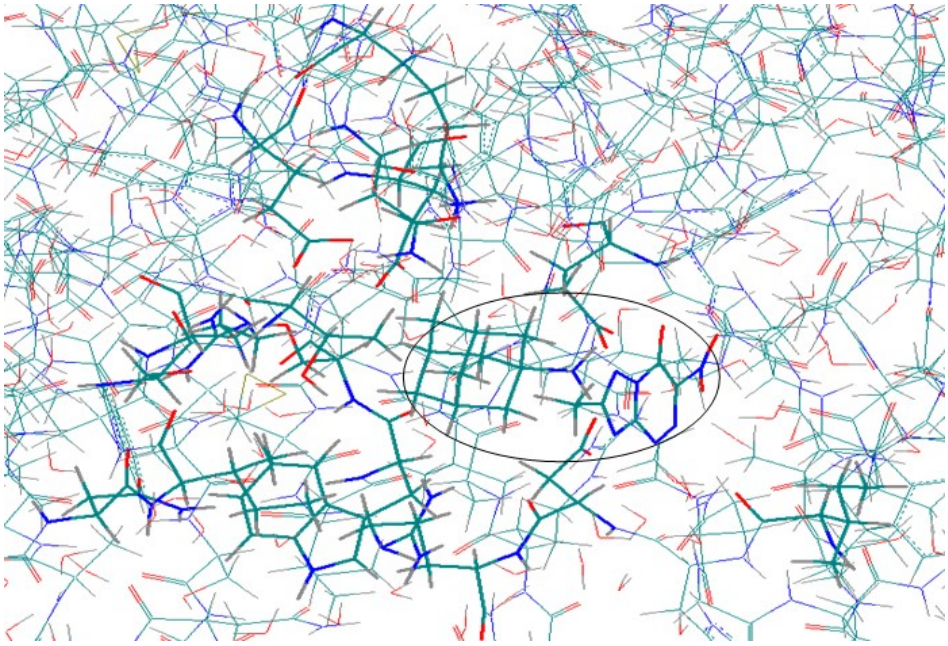


Рис.4. Противовирусное соединение в полости нейраминидазы

Для анионов наиболее активных солей характерной особенностью является ориентация атомов кислорода нитрогруппы по направлению к остатку PRO431 и гидроксильной группе TYR406 фермента. При этом образуется сокращенный контакт между атомом кислорода нитрогруппы молекулы лекарственного средства и атомом водорода гидроксильной группы

тирозина 406, что согласуется с результатами анализа модельного рецептора. В случае наиболее активных солей невыгодная близость нитрогруппы к отрицательно заряженной части ASP151 скомпенсирована положительным зарядом катиона аммония, который находиться между ними.

Выявлены взаимодействия молекул лекарственных средств с молекулами воды, расположенными в полости фермента. Значительное число молекул воды координируется около атомов азота гетероцикла (триазолотриазина, триазолопиримидина, пиразолотриазина), атомов кислорода карбонильных групп, нитрогруппы анионов. Помимо этого, гидрофильная часть органических катионов существенно гидратирована.

Для определения активных центров лекарственных средств и полости фермента использован алгоритм CoCon [13,14]. Данный алгоритм осуществляет определение параметров взаимодействия лекарственного средства с рецептором, в качестве которых использованы энергии и силы ван-дер-ваальсовых и электростатических атом-атомных взаимодействий. На основании полученных характеристик строится линейная взаимосвязь величины биологической активности соединений с использованием традиционных методов регрессионного анализа – пошагового включения и исключения факторов. Атомы лекарственного средства и молекулы рецептора, характеристики взаимодействия между которыми определяют величину биологической активности, являются активными центрами взаимодействующих молекул.

В рамках данного алгоритма осуществлено определение активных центров противовирусных средств и нейраминидазы, проведена оценка влияния водного окружения на проявление активности. Обнаружено, что у наиболее активных молекул активным центром является атом кислорода $–NO_2$ (или L) группы, который ориентируется около аминокислотных остатков GLU119, ILE149, ASP151 (Рис. 5), что хорошо согласуется с результатами поиска фармакофорных частей лекарственных соединений, полученными в рамках алгоритма BiS. Повышение величины биологической активности связано с увеличением вероятности контакта с данными аминокислотными остатками. При этом водное окружение не блокирует активные центры соединения, а лишь способствует стабилизации комплекса «рецептор-лиганд».

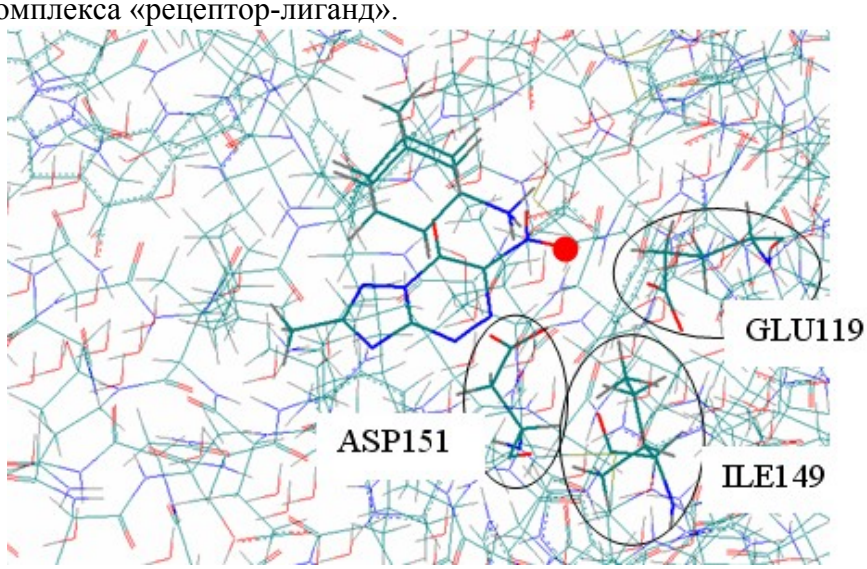


Рис. 5. Определенный в рамках алгоритма CoCon активный центр наиболее активного соединения выборки

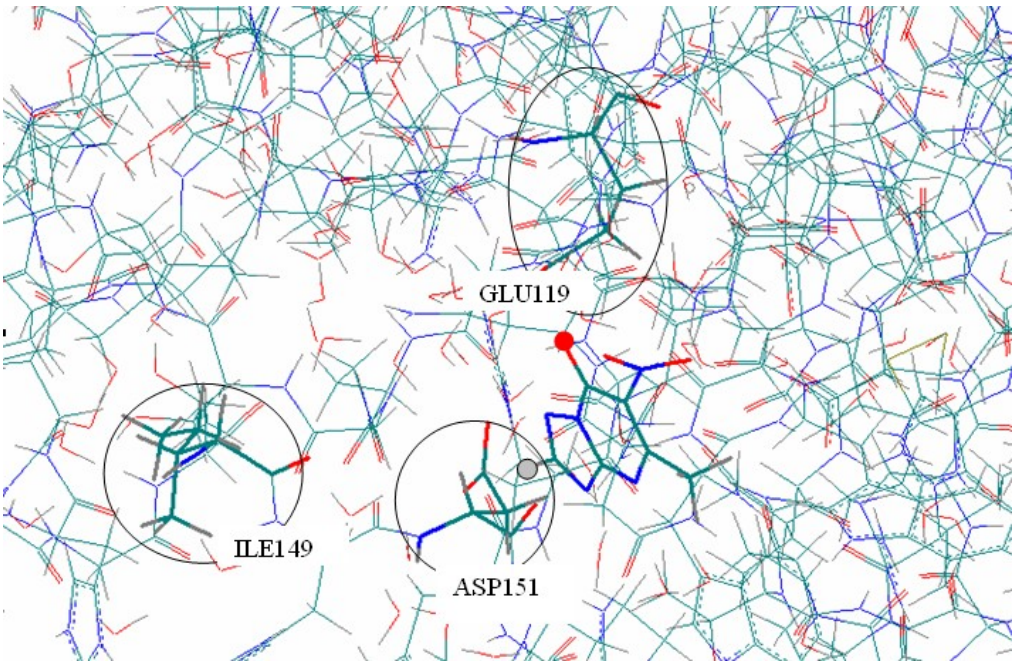


Рис. 6. Активный центр малоактивного соединения по результатам расчета с использованием алгоритма CoCon

Для менее активных молекул активный центр представлен либо атомом водорода триазолового цикла, либо атомом кислорода карбонильной группы, либо атомами азота триазинового цикла, которые ориентируются около аминокислотных остатков GLU119, ASP151. Такая ориентация соединения не позволяет образовывать контакт с ILE149 (Рис. 6), что приводит к понижению активности. Кроме того, активные центры соединения с низкой активностью хорошо гидратированы, что препятствует их взаимодействию с белком. Как было показано выше, этот эффект проявляется в уравнении зависимости величины активности от энергии межмолекулярных взаимодействий соединений.

Полученная в рамках алгоритма CoCon количественная зависимость величины биологической активности от энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий противовирусных соединений с аминокислотными остатками полости рецептора и водным окружением описывается уравнением вида (коэффициент корреляции R=0,91, стандартное отклонение S=2,6.):

$$BA = 25.4 + 9.33E_r - 7.55E_w,$$

где E_r – энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий противовирусных соединений с аминокислотными остатками полости рецептора; E_w - энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий противовирусных соединений с водным окружением. График полученной зависимости представлен на Рис.7.

Таким образом, проведен комплексный анализ противовирусных средств – ингибиторов нейраминидазы. Рассмотрено влияние энергетических, орбитальных характеристик соединений на величину активности. В рамках алгоритма BiS проведено моделирование комплексов лекарственных препаратов с рецептором. На основании полученной модели выделены фармакофорные и антифармакофорные части молекулы. Обнаружено, что ориентация молекул в модельном рецепторе хорошо согласуются с данными рентгеноструктурного анализа. Показано, что атомы модельного рецептора имитируют соответствующие атомы фермента, а также молекул воды, входящих в состав нейраминидазы. С использованием алгоритма CoCon определены активные центры противовирусных средств. Обнаружено, что таковыми являются атомы кислорода нитрогрупп, что подтверждается и результатами поиска фармакофорных частей молекул, полученных в рамках алгоритма BiS. Найдены уравнения зависимости биологической

активности от параметров строения комплексов лекарственных препаратов с рецептором с коэффициентами корреляции не менее 0,91.

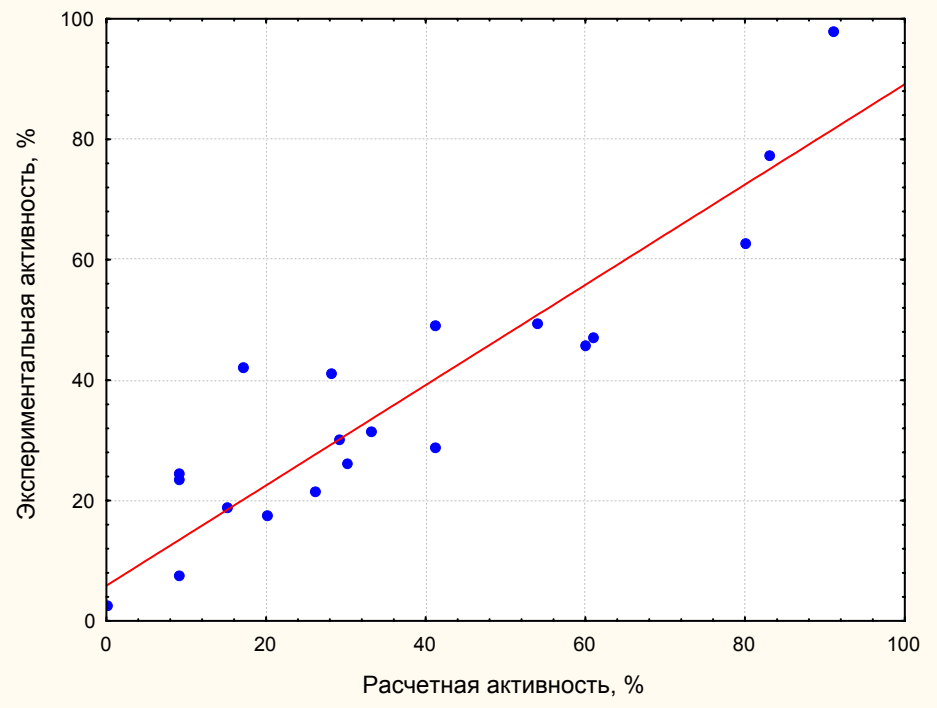


Рис. 7. Расчетные и экспериментальные величины противовирусной активности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МК-2800.2005.3).

Литература

1. *Шварцман Я.С., Иванников Ю.Г.* Вернется ли "испанка"?// В мире науки. 1991. N 12. С.88-99.
2. Fundamental Virology. Chief editors: *Bernard N.Fields, M.D,David M., Knipe Ph.D.*, New York: Raven Press, 1986.
3. *Руднева И. А., Гамбарян А. С. , Шилов А. А., Синицын Б. В., Кропоткина Е. А., Ильюшина Н. А., Каверин Н. В.* Восстановление функционального соответствия гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа после реассортации генов.// Молекулярная биология. 2001. Т.35. N 35. С.500-503.
4. *Маренникова С.С.* Патогенные для человека вирусы. М.: Медицина, 1998.
5. *Барташевич Е.В., Гришина М.А., Потемкин В.А., Белик А.В.* Метод мультиконформационного моделирования пространственной формы молекулы// Журн. структ. химии. 2002. Т. 43. № 6. С.1120 – 1127.
6. *Гришина М.А., Барташевич Е.В., Потемкин В.А., Белик А.В.* Генетический алгоритм для прогноза строения и свойств молекулярных агломератов в органических веществах// Журн. структ. химии. 2002. Т. 43. № 6. С.1128 – 1133.
7. *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.
8. *Потемкин В.А., Арсламбеков Р.М., Барташевич Е.В., Гришина М.А., Белик А.В., Перспикаче С., Гуччионе С.* Мультиконформационный метод анализа биологической активности молекулярных структур// Журн. структ. химии. 2002. Т. 43. № 6. С.1134 – 1138.
9. *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. Proceedings of the 13th European Symp. on Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR 2000. Heinrich-Heine-

Universität, Dusseldorf, Germany, 27 August-1 September, 2000.- Barcelona: Prous Science Publishers, 2001. P.349 – 353.
10. *H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne* The Protein Data Bank //Nucleic Acids Research. 2000. 28. P.235-242.
11. *Grishina M. A., Potemkin V. A., Rusinov G.L.,Bartashevich E. V., Guccione S., Perspicace S, Chupakhin O.N.* Comparing a BiS (Biological Substrate Search) alignment of anticancer DNA and DNA/RNA antimetabolites into their active sites with .pdb co-crystals// "From Genes to Drugs via Crystallography", 33rd crystallographic course at the E. Majorana Centre, Erice, Italy, 23 May – 2 June 2002. Book of Abstracts. Poster Absracts. 48 p.
12. *Погребной А.А., Рябинин В.Е., Барташевич Е.В., Гришина М.А., Потемкин В.А.* Подход к отбору веществ с заданными метаболическими свойствами// Биомедицинская химия. 2004. Т. 50. Прил. № 1. С.77 – 84.
13. *Grishina M.A., Potemkin V.A.* Theoretical investigation of interactions in the molecular systems "receptor-ligand" for DNA and DNA/RNA-antimetabolites// IXth International Seminar on Inclusion Compounds (ISIC-9), Novosibirsk, Russia, June 23 – 27, 2003, Book of Abstracts.- Novosibirsk, 2003. P. 73
14. *Потемкин В.А., Гришина М.А., Белик А.В.* Моделирование комплексов "рецептор-лиганд" и сопоставление с данными рентгеноструктурного анализа// III Национальная кристаллохимическая конференция, Черноголовка, 19 - 23 мая 2003, Тез. Докл.. Черноголовка, 2003. С. 71 - 72.