

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

ХИМИЯ
CHEMISTRY

УДК 547:577:616-006
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-3-281-292>

Поступило в редакцию 12.03.2018
Received 12.03.2018

**А. М. Андрианов¹, Г. И. Николаев², И. А. Кашин², Ю. В. Корноушенко¹,
член-корреспондент С. А. Усанов¹**

¹*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*
²*Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

**КОМПЬЮТЕРНЫЙ ДИЗАЙН ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ АРОМАТАЗЫ
НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛА**

Аннотация. Методами молекулярного моделирования осуществлен компьютерный дизайн высокоаффинных ингибиторов ароматазы на основе производных 1,2,4-триазола. С помощью молекулярного докинга и квантовой химии проведена оценка потенциальной биологической активности сконструированных соединений. В результате идентифицированы шесть соединений-лидеров, которые образуют координационную связь с атомом железа гема фермента и эффективно взаимодействуют с его субстрат-связывающим сайтом. Выполнен анализ межмолекулярных взаимодействий, реализующихся в структурных комплексах этих лигандов с ароматазой, и рассчитаны энтальпии их образования. На основе полученных данных предсказано, что идентифицированные соединения формируют перспективные базовые структуры для разработки новых эффективных лекарственных препаратов для терапии рака молочной железы.

Ключевые слова: ароматаза, компьютерное конструирование лекарств, молекулярный докинг, квантовая химия, ингибиторы ароматазы, рак молочной железы

Для цитирования: Компьютерный дизайн потенциальных ингибиторов ароматазы на основе производных 1,2,4-триазола / А. М. Андрианов [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 3. – С. 281–292. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-3-281-292>

**Alexander M. Andrianov¹, Gregory I. Nikolaev², Ivan A. Kashyn², Yuri V. Kornoushenko¹,
Corresponding Member Sergei A. Usanov¹**

¹*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*
²*United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

**COMPUTER-AIDED DESIGN OF POTENTIAL AROMATASE INHIBITORS
BASED ON 1,2,4-TRIAZOLE DERIVATIVES**

Abstract. Computer-aided design of the high-affinity inhibitors of aromatase based on 1,2,4-triazole derivatives was performed by molecular modeling tools. The potential biological activity of the designed compounds was evaluated by molecular docking and quantum chemistry calculations. As a result, six hits that form a coordinate bond with an iron atom of an enzyme hem and effectively interact with its substrate-binding site were identified. The intermolecular interactions appearing in the structural complexes of these ligands with aromatase were analyzed and the enthalpies of their formation were calculated. Based on the data obtained, the identified compounds were suggested to present good scaffolds for the development of novel effective drugs against breast cancer.

Keywords: aromatase, computer-aided drug design, molecular docking, quantum chemistry, aromatase inhibitors, breast cancer

For citation: Andrianov A. M., Nikolaev G. I., Kashyn I. A., Kornoushenko Yu. V., Usanov S. A. Computer-aided design of potential aromatase inhibitors based on 1,2,4-triazole derivatives. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 3, pp. 281–292 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-3-281-292>

Введение. У женщин в период фертильной фазы синтез эстрогенов происходит преимущественно в яичниках. Однако в постменопаузе, на долю которой приходится около трети случаев развития рака молочной железы (РМЖ), интенсивность их синтеза в яичниках снижается, и эстрогены синтезируются в периферической ткани с помощью ферментного комплекса ароматазы, состоящего из гем-содержащего белка цитохрома P450 и флавопротеина – NADPH-цитохром P450 редуктазы [1; 2]. Ароматаза (CYP19A1) катализирует реакцию превращения андрогенов в эстрогены и проявляет биологическую активность как в периферических тканях, так и в опухолевой ткани молочной железы, обеспечивая высокий уровень концентрации эстрогенов [1; 2]. В эстроген-зависимых злокачественных новообразованиях эстрогены выступают в роли факторов роста и развития опухоли. Поэтому ингибирование ароматазы приводит к снижению уровня эстрогенов в организме и предотвращению роста раковых клеток.

В большинстве случаев РМЖ является гормон-зависимым. Эндокринная терапия РМЖ направлена на устранение воздействия на опухоль эстрогенов, и ее эффективность зависит от экспрессии рецепторов эстрогенов и рецепторов прогестерона клетками опухоли. Селективные модуляторы рецепторов эстрогенов блокируют связывание эстрогенов с их рецепторами [1; 2]. Однако они могут действовать как частичные агонисты или оказывать эстрогенное действие в других тканях, что приводит к увеличению риска развития рака эндометрия, катаракты, тромбозов, инсультов и бесплодия. В качестве альтернативной стратегии лечения РМЖ применяют ингибиторы ароматазы (ИА), которые не обладают эстрогенными эффектами и вызывают меньше побочных эффектов [1; 2]. Механизм реакции, катализируемой ароматазой, заключается в трех последовательных гидроксировании C-19 метильной группы андрогенов, в результате которых происходит отщепление формиата и ароматизация А-цикла стероида [2]. Ингибиторы ароматазы препятствуют реакции ароматизации, которая превращает надпочечниковые андрогены в эстрогены. ИА, подавляя синтез и, как следствие, снижая уровень эстрогенов, препятствуют развитию РМЖ [3–5]. Среди лекарственных препаратов, применяемых для терапии гормон-зависимого РМЖ, выделяют три поколения ИА [5]. Недостатком представителей первых двух поколений (аминоглутетимид, фазозол, форместан) является недостаточная селективность действия: кроме ароматазы, они ингибируют ряд других ферментов. ИА третьего поколения, используемые в настоящее время для терапии ранних и развитых стадий РМЖ у женщин в постменопаузе, характеризуются большей специфичностью и эффективностью. Эти ингибиторы представлены лекарственными препаратами двух классов [2]: 1) стероидным ингибитором экземестаном и 2) обратимыми нестероидными ингибиторами ворозолом, анастрозолом и летрозолом. Стероидные препараты и, в частности, экземестан превращаются ароматазой в соединения, которые необратимо связываются с активным участком фермента, полностью нарушая его активность как биокатализатора [2]. После прекращения воздействия таких ингибиторов требуется значительное время для того, чтобы фермент синтезировался в тканях вновь. Обратимые нестероидные ИА ворозол, летрозол и анастрозол представляют собой триазольные соединения, которые связываются с активным каталитическим центром ароматазы путем координации атома железа гема CYP19A1 через неподеленную электронную пару атома азота 1,2,4-триазола [3–5].

Несмотря на то что нестероидные ИА третьего поколения летрозол и анастрозол широко используются в клинической практике для лечения гормон-зависимого РМЖ, эти соединения все же обладают рядом побочных эффектов, приводящих к торможению мышечного роста, артралгии, снижению прочности костей, нарушению липидного профиля крови, падению либидо и ухудшению общего состояния [5]. В связи с этим актуальным является поиск новых ингибиторов ароматазы, обладающих меньшей токсичностью и снижающих риск возможного возникновения резистентности к используемым препаратам, связанной с их длительным применением.

В последнее десятилетие постоянно возрастающую роль в процессе создания новых лекарственных препаратов играют методы компьютерного молекулярного моделирования, которые позволяют значительно сократить сроки разработки лекарств и существенно уменьшить финансовые расходы. До недавнего времени в связи с отсутствием информации о трехмерной структуре ароматазы новые ингибиторы CYP19A1 разрабатывались с привлечением непрямых методов компьютерного конструирования лекарств, базирующихся на анализе известных лигандов

к ферменту и последующем выявлении их общих структурных свойств, которые обуславливают биологическую активность [6–8]. Определение методом рентгеноструктурного анализа пространственной структуры ароматазы высокого разрешения [2; 9] создало предпосылки не только для понимания функции и механизма действия фермента, но и для разработки новых эффективных ингибиторов СYP19A1 на основе прямых методов компьютерного конструирования лекарств, использующих данные о структуре молекулярной мишени (см., напр., [10–12]).

Компьютерный дизайн новых структур биологически активных молекул может быть осуществлен с помощью виртуального скрининга баз данных химических соединений, позволяющего найти молекулы с требуемой биологической активностью, величина которой, однако, как правило, оказывается низкой. Тем не менее, идентифицированные в результате виртуального скрининга соединения могут быть использованы в качестве базовых структур для их дальнейшей оптимизации, направленной на получение молекул с большей биологической активностью и улучшенными фармакокинетическими свойствами. Кроме того, эти соединения формируют исходные структурные блоки для реализации молекулярного *de novo* дизайна в рамках концепции клик-химии, представляющей набор модульных реакций, которые протекают с высоким выходом в физиологических условиях, стереоспецифичны и дают безопасные побочные продукты [13]. Преимущества такого подхода заключаются в том, что его использование позволяет значительно упростить массовый параллельный синтез кандидатов и ускорить процесс создания новых, эффективных и безопасных лекарственных препаратов.

Цель исследования – осуществить компьютерный дизайн высокоаффинных и селективных ингибиторов ароматазы и идентифицировать соединения, перспективные для разработки новых эффективных лекарственных препаратов для терапии РМЖ.

Для достижения поставленной цели в работе решены следующие задачи:

1. Формирование библиотек низкомолекулярных соединений, содержащих структурные блоки для сборки гибридных молекул.
2. Компьютерный дизайн структур-кандидатов потенциальных ингибиторов ароматазы.
3. Отбор молекул, удовлетворяющих «правилу пяти» Липинского, накладывающему на лиганд, взаимодействующий с заданной молекулярной мишенью, условия подобия лекарству [14].
4. Построение структурных комплексов сконструированных гибридных молекул с молекулярной мишенью.
5. Энергетическая оптимизация структурных комплексов и идентификация соединений с низкой энергией межмолекулярных взаимодействий.

В результате проведенных исследований идентифицированы соединения, способные к эффективному и специфическому взаимодействию с субстрат-связывающим сайтом ароматазы, которые опосредуются образованием координационной связи с атомом железа гема СYP19A1.

Материалы и методы исследования. Решение поставленных задач выполнено в рамках комплексного подхода, предусматривающего реализацию следующих этапов:

- 1) идентификация в базе данных химических соединений ZINC (<http://zinc.docking.org>) исходных структурных блоков для получения гибридных молекул, содержащих элементы структуры, способные обеспечить селективность и эффективность их связывания с активным каталитическим центром СYP19A1;
- 2) конструирование потенциальных лигандов ароматазы;
- 3) молекулярный докинг сконструированных соединений с молекулой-мишенью;
- 4) оптимизация построенных структурных комплексов методами квантовой химии с последующим расчетом энергии межмолекулярных взаимодействий и отбором лигандов, перспективных для синтеза и тестирования на биологическую активность.

На первом этапе с помощью программы DataWarrior (<http://www.openmolecules.org/help/basics.html>) были созданы две молекулярные библиотеки. Первая библиотека (библиотека 1) включала отобранные из кластера «Drug-Like» базы данных ZINC малые молекулы с молекулярной массой <250 Да, содержащие 1,2,4-триазол – элемент структуры, способный обеспечить образование координационной связи с атомом железа гема ароматазы. Во вторую библиотеку (библиотека 2) были отобраны низкомолекулярные соединения (молекулярная масса <250 Да) с функциональ-

ными группами, которые необходимы для моделирования реакций, реализованных в программном пакете AutoClickChem (<http://sourceforge.net/projects/autoclickchem/>). В результате работы программы DataWarrior библиотека 1 включала 1519 соединений, а библиотека 2 – 170. На следующем этапе соединения из сформированных библиотек были использованы в качестве реагентов для сборки конъюгатов 1,2,4-триазола с помощью программы AutoClickChem. При этом для моделирования реакций между соединениями из библиотек 1 и 2 программа AutoClickChem использовала все пары их функциональных групп, быстро и специфически реагирующих между собой. Это позволило получить набор из 4576 гибридных молекул, в котором 784 соединения удовлетворяли «правилу пяти» Липинского [14] согласно данным программы DruLiTo (niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html).

Структурные комплексы этих 784 соединений с ароматазой моделировали методом молекулярного докинга, который позволяет предсказать наиболее вероятные ориентации лиганда в активном центре белка. В качестве контрольного соединения использовали ИА летрозол, трехмерную структуру которого заимствовали из базы данных DrugBank (код DB01006, <https://www.drugbank.ca>). Молекулярный докинг выполняли в программном пакете QuickVina 2 (<http://omictools.com/quickvina-tool>) с учетом конформационной подвижности лиганда. Трехмерную структуру ароматазы заимствовали из ее комплекса с андростендионом в кристалле (код 3EQM в Международном банке белков; <http://www.rcsb.org/pdb/>) [2; 9]. Перед проведением докинга с помощью программы OpenBabel (http://openbabel.org/wiki/Main_Page) к структурам ароматазы и лигандов добавляли атомы водорода и проводили оптимизацию их геометрических параметров в силовом поле UFF. Ячейка для докинга представляла собой фрагмент СУР19А1 с координатами $x \in (75 \text{ \AA}; 95 \text{ \AA})$, $y \in (42 \text{ \AA}; 62 \text{ \AA})$, $z \in (34 \text{ \AA}; 54 \text{ \AA})$, включающий субстрат-связывающую полость ароматазы; т. е. объем ячейки составлял $20 \times 20 \times 20 = 8000 \text{ \AA}^3$. Для каждого лиганда генерировали 9 моделей комплекса, лучших по значению оценочной функции; при этом параметр, характеризующий полноту поиска (охват конформационного пространства), был задан равным 50. В результате анализа данных молекулярного докинга были отобраны 100 лучших по значению оценочной функции комплексов сконструированных лигандов с ароматазой, а также ее комплекс с летрозолом. Геометрические параметры этих комплексов оптимизировали методами квантовой химии.

Квантово-химические расчеты выполняли полуэмпирическим методом PM7 в программном пакете MOPAC2016 (<http://openmopac.net/MOPAC2016.html>) с неявной моделью растворителя в рамках приближения COSMO (COnductor-like Screening MOdel) при значении диэлектрической проницаемости, равном 78,4 (<http://openmopac.net/MOPAC2016.html>). При подготовке к оптимизации в структурах комплексов лиганд/белок, построенных с помощью молекулярного докинга, восстанавливали атомы водорода и оптимизировали их геометрию в силовом поле UFF. Для этих целей применяли программу Open Babel (http://openbabel.org/wiki/Main_Page). Для ускорения вычислений использовали метод локализованных орбиталей. Градиент энергии, при котором завершается процесс оптимизации, задавали равным 50 ккал/моль/\AA (<http://openmopac.net/MOPAC2016.html>).

Межмолекулярные водородные связи, солевые мостики и π - π -взаимодействия в оптимизированных комплексах лигандов с ароматазой определяли с помощью программы BINANA (<http://nbcg.ucsd.edu/data/sw/hosted/binana/>). Для идентификации ван-дер-ваальсовых взаимодействий использовали программный пакет LigPlot (<http://ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>).

Оценку энергии межмолекулярных взаимодействий для комплексов, полученных в результате квантово-химической оптимизации, проводили на основе анализа энергий молекул в свободном состоянии и комплекса, образующегося в ходе реакции



где $[A]$ и $[B]$ – молекулы A и B в свободном состоянии; $[A*B*]$ – комплекс, образующийся в результате взаимодействия молекул A и B с учетом структурных перестроек в молекулах (A^* и B^*).

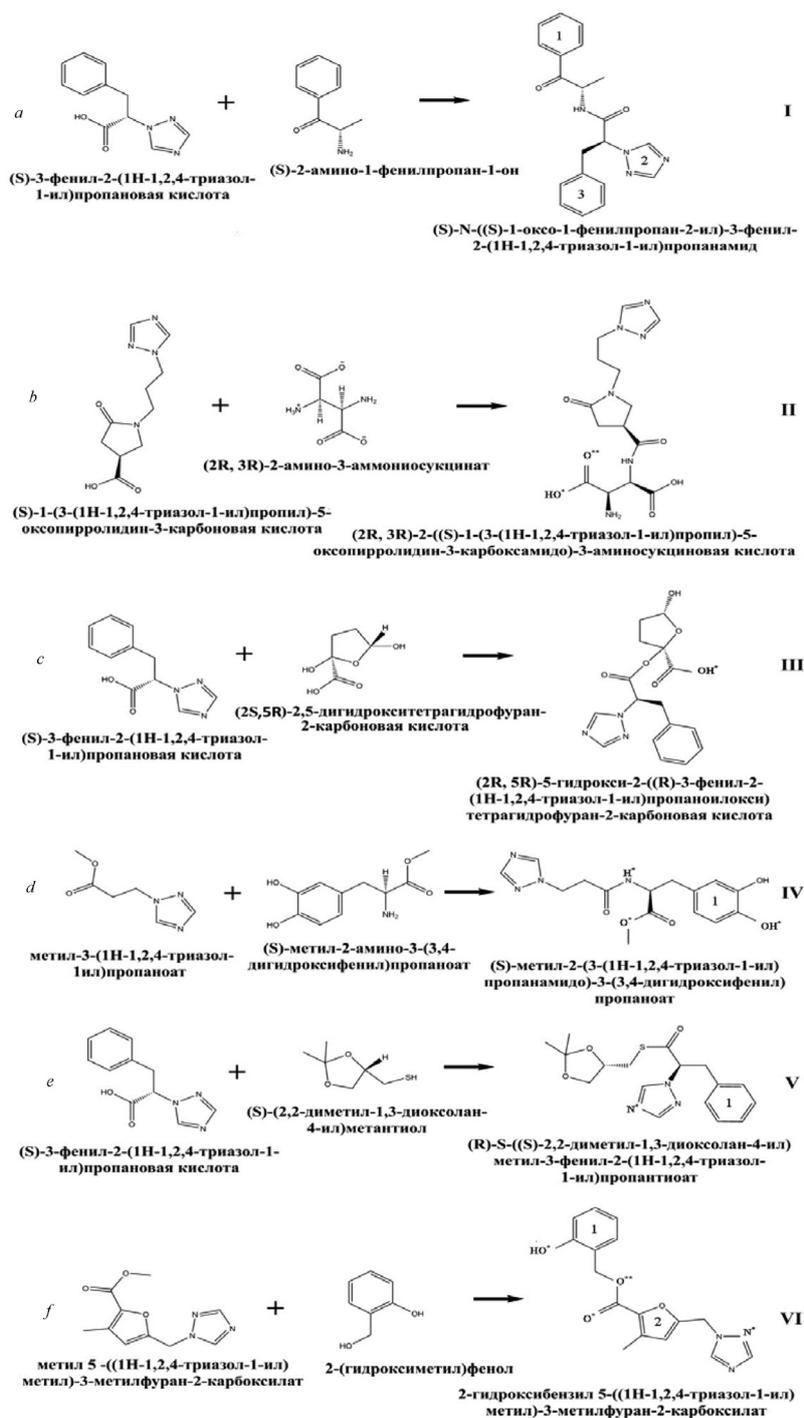


Рис. 1. Схема компьютерной сборки гибридных молекул I (a), II (b), III (c), IV (d), V (e), VI (f) – потенциальных ингибиторов ароматазы, идентифицированных на основе данных молекулярного моделирования. Показаны реагенты и продукты реакции. Приведены систематические названия этих соединений. Надстрочными звездочками отмечены атомы и функциональные группы молекул, образующие межмолекулярные водородные связи и солевые мостики (табл. 2). Цифрами обозначены π -сопряженные фрагменты лигандов, участвующие в π - π -взаимодействиях с пиррольными кольцами гема CYP19A1 (табл. 2). Соединения I–VI сконструированы путем компьютерного моделирования реакций амидирования (a, b, d), эстерификации (c), тиоэстерификации (e) и переэстерификации (f)

Fig. 1. The scheme of computer assembly of hybrid molecules I (a), II (b), III (c), IV (d), V (e), VI (f) presenting potential aromatase inhibitors identified based on the molecular modeling data. Reagents and reaction products are shown. Systematic names of these compounds are given. The superscripts indicate the functional groups of molecules forming intermolecular hydrogen bonds and salt bridges (Table 2). Numerals indicate π -conjugate fragments of the ligands involved in π - π interactions with the pyrrole rings of the CYP19A1 hem (Table 2). Compounds I–VI were designed by computer modeling of the following reactions: amidification (a, b, d), esterification (c), thioesterification (e), and transesterification (f)

Энтальпию взаимодействия вычисляли следующим образом:

$$H_{\text{связывания}} = H_{\text{комплекс}} - H_{\text{белок}} - H_{\text{лиганд}}$$

где $H_{\text{комплекс}}$ – энтальпия образования, полученная при оптимизации структуры комплекса в МОРАС; $H_{\text{белок}}$ – энтальпия образования, полученная при оптимизации рентгеновской структуры ароматазы в МОРАС; $H_{\text{лиганд}}$ – энтальпия образования, полученная при оптимизации лиганда в МОРАС из положения, найденного в программе OpenBabel.

Расчеты выполняли на компьютерном кластере Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Результаты и их обсуждение. Анализ структурных комплексов сконструированных лигандов с ароматазой позволил выделить 6 соединений-лидеров, эффективно взаимодействующих с субстрат-связывающим сайтом фермента и характеризующихся низкими значениями энергии связывания (<-6 ккал/моль). Схема компьютерного дизайна этих гибридных молекул – конъюгатов 1,2,4-триазола, приведена на рис. 1. В табл. 1 представлены их физико-химические параметры, которые обеспечивают такие важные для лекарства свойства, как абсорбция, распределение, метаболизм, выделение и используются в «правиле пяти» Липинского для отбора лигандов, перспективных для разработки биофармацевтических препаратов [14]. Анализ данных табл. 1 показывает, что все идентифицированные лиганды ароматазы являются малыми молекулами и полностью удовлетворяют критериям, налагаемым на потенциальное лекарство правилом Липинского.

Исследование структурных комплексов этих соединений с ароматазой (рис. 2) показывает, что один из атомов азота их триазольного кольца образует координационную связь с атомом железа гема фермента, о чем свидетельствуют соответствующие межатомные расстояния, приведенные в табл. 2. Соединения II–VI образуют водородные связи с остатком Met-374, имитируя взаимодействие кольца D природного субстрата ароматазы андростендиона, один из кислородов которого участвует в водородном связывании с аминок группой Met-374 [2; 9]. Кроме того, соединение IV формирует водородные связи с остатками Thr-310, Leu-372 ароматазы и с атомом азота ее протестической группы – гема, а соединение VI – с остатками Leu-477 и Thr-310 (табл. 2). В связи с этим следует отметить, что Thr-310 представляет собой высококонсервативный остаток цитохромов P450 и совместно с Ala-306 играет важную роль в процессе гидроксирования ароматазой [2; 9]. Наряду с водородными связями, лиганд II образует солевой мостик с остатком Arg-115.

Из анализа предсказанных методами молекулярного моделирования комплексов следует, что все идентифицированные лиганды ароматазы образуют широкую сеть ван-дер-ваальсовых контактов (табл. 2, рис. 3), суммарное число которых варьирует от 32 (соединение II) до 62 (соединение I).

Т а б л и ц а 1. Химические соединения – потенциальные ингибиторы ароматазы

Table 1. Chemical compounds presenting potential aromatase inhibitors

Лиганд Ligand	Химическая формула Chemical formula	Молекулярная масса (Да) Molecular mass (Da)	LogP	Число доноров водородной связи Number of H-bond donors	Число акцепторов водородной связи Number of H-bond acceptors	Объем, Å ³ Volume, Å ³
I	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₂	348,4	2,04	1	6	318,9
II	C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O ₆	367,3	-4,88	3	12	286,9
III	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₆	347,3	0,03	2	9	297,9
IV	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₅	334,3	-1,03	3	9	292,1
V	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	347,4	2,07	0	6	316,0
VI	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₄	313,3	1,38	1	7	269,6

Примечания: LogP – липофильность соединения (коэффициент распределения вещества в двухфазной системе n-октанол/вода). Приведенные данные получены с помощью программы DruLiTo (http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html).

Notes: LogP – the compound lipophilicity (the coefficient of substance partition in a biphasic system n-octanol/water). The data given are obtained by the DruLiTo program (http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html).

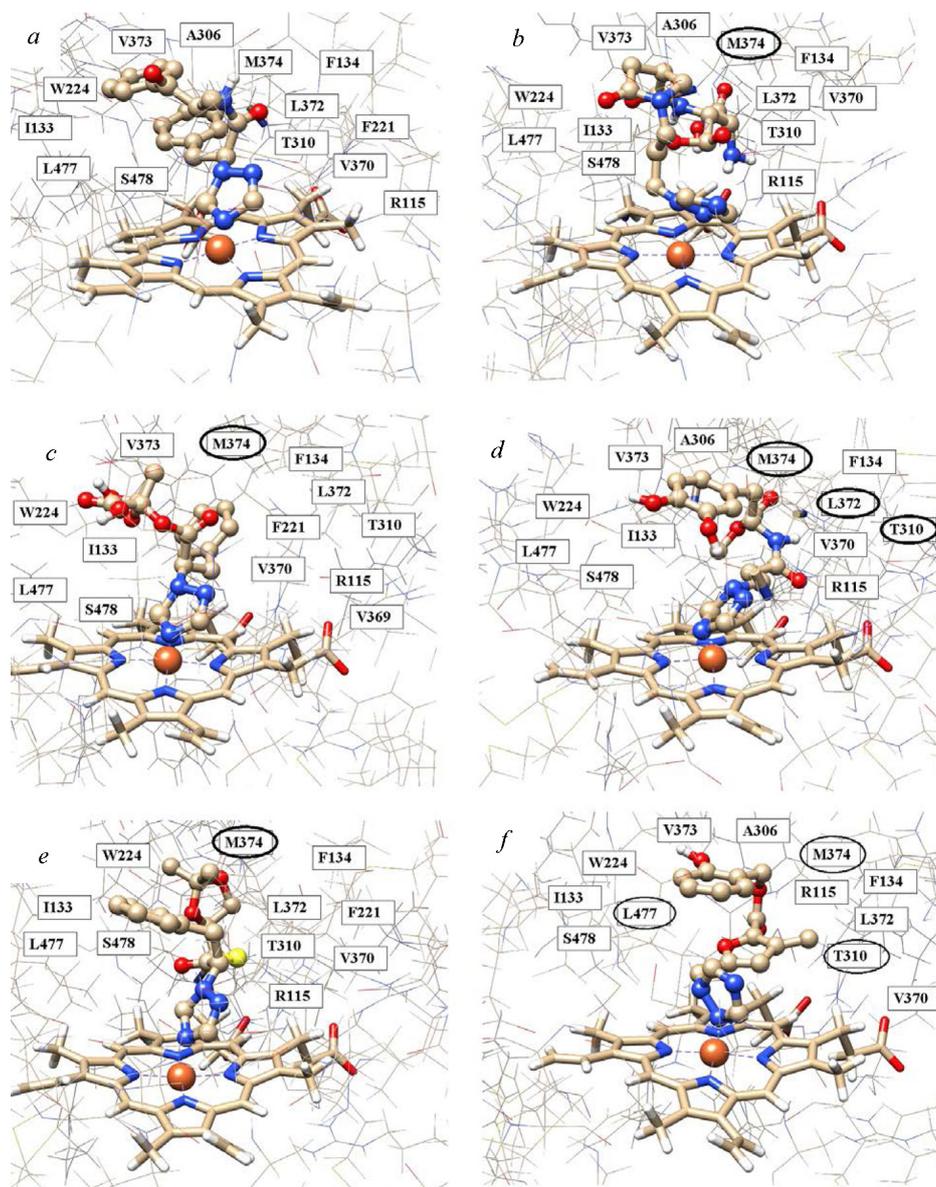


Рис. 2. Структурные комплексы соединений I (a), II (b), III (c), IV (d), V (e) и VI (f) с ароматазой. Соединения изображены с помощью модели «шарик–палочка–шарик». Остатки ароматазы, образующие ван-дер-ваальсовы контакты с лигандами, отмечены с помощью прямоугольников (табл. 2). Остатки, участвующие в водородном связывании, выделены с помощью эллипса

Fig. 2. The docked structures of compounds I (a), II (b), III (c), IV (d), V (e), and VI (f) with aromatase. The compounds are shown using “ball–stick–ball” model. The residues of aromatase forming van der Waals contacts with ligands are located in rectangles (Table 2). The residues involved in the hydrogen bonding are marked by an ellipse

Полученные данные показывают, что все эти соединения участвуют в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях с консервативными остатками Arg-115, Ile-133, Phe-134, Trp-224, Thr-310, Val-370, Met-374, Leu-477 и Ser-478. Соединения I, III, IV, V и VI формируют ван-дер-ваальсовы контакты с остатком Leu-372, а I, II, III, IV и VI – с Val-373. Кроме того, отдельные лиганды вступают в прямые межмолекулярные контакты с остатками Phe-221 (соединения I, II, III, V), Ala-306 (соединения I, II, IV, VI) и Val-369 (соединение III). Наряду с остатками Ala-306 и Thr-310, важная роль которых в функционировании ароматазы отмечена выше, выделим остаток Ser-478: по данным [15], аминокислотные замены этой консервативной аминокислоты субстрат-связывающего сайта CYP19A1 на аланин или треонин оказывают существенное влияние на ингибиторную активность летрозола и анастрозола.

Таблица 2. Межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся в оптимизированных комплексах сконструированных соединений с ароматазой

Table 2. Intermolecular interactions appearing in the optimized complexes of the designed compounds with aromatase

Лиганд Ligand	Водородная связь ¹ Hydrogen bond ¹	Ван-дер-ваальсовы контакты ² Van der Waals contacts ²	Солевые мостики и π - π -взаимодействия ³ Salt bridges and π - π interactions ³	Длина связи N-F ⁴ , Å Length of N-F bond ⁴ , Å
I	–	R115(3), I133(1), F134(1), F221(1), W224(2), A306(3), T310(2), V370(8), L372(1), V373(6), M374(1), L477(7), S478(4), ГЕМ (22)	1...ГЕМ 2...ГЕМ 3...ГЕМ (π - π -стэкинг)	2,01 (4)
II	O*...NH[M374] O**...NH[M374]	R115(4), I133(2), F134(2), F221(1), W224(2), A306(3), T310(5), V370(1), V373(1), M374(1), L477(7), S478(3)	OSO...R115 (солевой мостик)	2,38 (2)
III	OH*...N[M374]	R115(3), I133(4), F134(3), F221(3), W224(3), T310(4), V369(6), V370(2), L372(3), V373(1), M374(1), L477(3), S478(1), ГЕМ (8)	–	1,99 (4)
IV	O*...NH[M374] O**...OH[T310] OH**...N[ГЕМ] NH*...O[L372]	R115(3), I133(4), F134(1), W224(2), A306(2), T310(1), V370(2), L372(4), V373(1), M374(1), L477(5), S478(2), ГЕМ (14)	1...ГЕМ (π - π -стэкинг)	2,01 (4)
V	N*...NH[M374]	R115(6), I133(2), F134(4), F221(3), W224(4), T310(2), V370(5), L372(1), M374(6), L477(5), S478(2), ГЕМ (18)	1...ГЕМ	2,01 (4)
VI	O*...NH[M374] O**...NH[M374] OH*...O[L477] N*...OH[T310]	R115(2), I133(4), F134(2), W224(1), A306(1), T310(4), V370(4), L372(2), V373(5), M374(1), L477(4), S478(6), ГЕМ (17)	1...ГЕМ 2...ГЕМ (π - π -стэкинг)	1,81 (2)
Летрозол	N*...HO[S478] N**...HN[M374]	R115(2), F134(2), F221(7), W224(6), A306(1), D309(8), T310(6), V369(2), V370(1), M374(2), L477(3), S478(3), H480(1), ГЕМ(6)	–	1,95 (4)

Примечания: ¹ – первыми указаны атомы молекулы лиганда (рис. 1), а вторыми – атомы аминокислотных остатков ароматазы (приведены в квадратных скобках в однобуквенном коде); ² – аминокислотные остатки ароматазы, формирующие ван-дер-ваальсовы контакты с лигандами. В скобках указано число контактов; ³ – для солевых мостиков первыми приведены функциональные группы лигандов, а для π - π -взаимодействий – номера их π -сопряженных систем (рис. 1); ⁴ – длина координационной связи между атомом азота 1,2,4-триазола и атомом железа гема ароматазы. В скобках указан номер атома азота триазольного цикла.

Notes: ¹ – atoms of the ligands are shown first (Figure 1), followed by the corresponding atoms of aromatase (the residues of aromatase are in brackets in one-letter code); ² – amino acids of aromatase forming van der Waals contacts with the ligands. The number of contacts is given in brackets; ³ – the functional groups of ligands and numbers of their aromatic rings (Figure 1) are shown first for salt bridges and π - π interactions, respectively; ⁴ – the length of the coordination bond between the nitrogen atom of 1,2,4-triazole and the iron atom of the aromatase gem. The number of the nitrogen atom of the triazole ring is indicated in brackets.

Как видно из данных табл. 2, полученные производные 1,2,4-триазола взаимодействуют не только с аминокислотными остатками субстрат-связывающего сайта ароматазы, но и с ее небелковой частью. За исключением лиганда II, эти соединения формируют ван-дер-ваальсовы контакты с гемом CYP19A1, а фрагменты с π -сопряженными системами соединений I, IV, V и VI (рис. 1) участвуют в специфических π - π -взаимодействиях с пиррольными кольцами протетической группы ароматазы (табл. 2).

Таким образом, данные молекулярного моделирования свидетельствуют о том, что сконструированные гибридные молекулы характеризуются близким механизмом взаимодействия с субстрат-связывающей полостью ароматазы, основу которого формируют координационная связь с атомом железа гема, межмолекулярные ван-дер-ваальсовы контакты, водородные связи (соединения II–VI), солевые мостики (соединение II) и π -стэкинг между π -сопряженными системами лигандов и пиррольных колец протетической группы фермента (соединения I, IV, V, VI) (табл. 2, рис. 3). При этом доминирующую роль в стабилизации структурных комплексов ароматазы с лигандами играют многочисленные ван-дер-ваальсовы контакты, в которые вовлечены

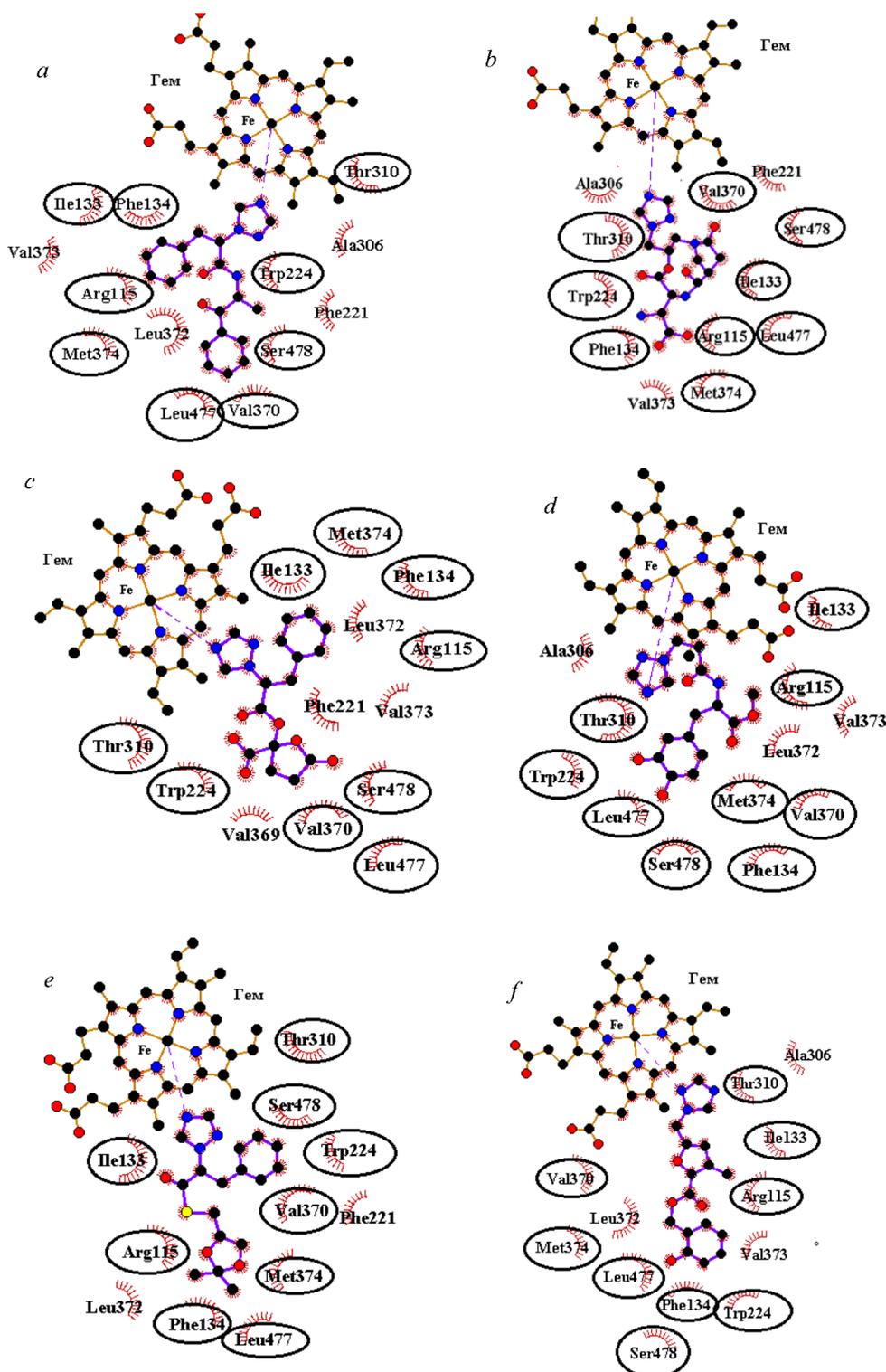


Рис. 3. Элементы структуры ароматазы, формирующие ван-дер-ваальсовы контакты с соединениями I (a), II (b), III (c), IV (d), V (e) и VI (f). Эллипсом выделены остатки, вовлеченные в ван-дер-ваальсовы взаимодействия во всех рассматриваемых случаях. Суммарное число ван-дер-ваальсовых контактов составляет: 62 (a), 32 (b), 45 (c), 42 (d), 58 (e) и 53 (f). Координационная связь показана пунктирной линией

Fig. 3. Elements of the aromarase structure making van der Waals contacts with compounds I (a), II (b), III (c), IV (d), V (e), and VI (f). Residues participating in van der Waals interactions in all of the cases of interest are marked by an ellipse. The total number of van der Waals contacts is: 62 (a), 32 (b), 45 (c), 42 (d), 58 (e), and 53 (f). A coordinate bond is shown by dotted line

как консервативные остатки гидрофобной субстрат-связывающей полости СУР19А, так и элементы структуры простетической группы фермента. Для контрольного соединения – летрозолa методы молекулярного моделирования предсказывают аналогичный механизм связывания с ароматазой (табл. 2, рис. 4). Согласно расчетным данным, этот ингибитор СУР19А1 координирует атом железа простетической группы фермента, образует водородные связи с Met-374, Ser-478 и большое число ван-дер-ваальсовых контактов с участием таких аминокислотных остатков ароматазы, как Arg-115, Phe-134, Trp-224, Thr-310, Val-370, Met-374, Leu-477 и Ser-478. Как было отмечено выше, эти остатки СУР19А1 формируют прямые межатомные контакты и с идентифицированными соединениями I–VI (табл. 2, рис. 3, 4).

Эффективность межмолекулярных взаимодействий, реализующихся в структурных комплексах потенциальных лигандов с ароматазой, подтверждают предсказанные на основе данных квантово-химических расчетов величины энтальпии связывания, варьирующие в интервале от $-6,3$ до $-13,6$ ккал/моль (табл. 3). При анализе данных табл. 3 необходимо иметь в виду, что все вычислительные подходы к оценке энергии межмолекулярных взаимодействий связаны с различными приближениями, которые варьируют от упрощенных форм уравнений до приближений, ограничивающих размер системы и фундаментальных приближений в уравнениях, необходимых для решения задачи. Тем не менее, точность квантово-химического метода РМ7 – единственного полуэмпирического метода, учитывающего поправки на межмолекулярные дисперсионные взаимодействия и водородные связи (<http://openmopac.net/MOPAC2016.html>), позволяет предполагать, что значения энтальпии связывания, предсказанные для сконструированных соединений, сопоставимы с величиной $-8,7$ ккал/моль, рассчитанной для летрозолa с привлечением идентичного вычислительного протокола (табл. 3).

Среди идентифицированных лигандов ароматазы следует особо отметить соединение I (рис. 1), характеризующееся существенно более низким значением энтальпии связывания по сравнению с летрозолom (табл. 3). Предсказанное значение энергии межмолекулярных взаимодействий для

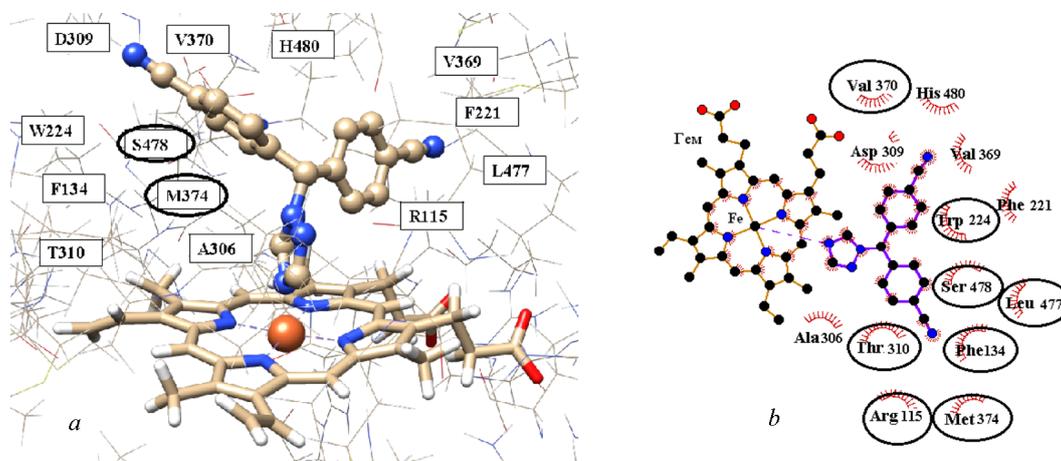


Рис. 4. Структурный комплекс летрозолa с ароматазой (а) и элементы структуры СУР19А1, участвующие в межмолекулярных ван-дер-ваальсовых взаимодействиях (б). Используются обозначения, такие же, как на рис. 2 и 3

Fig. 4. The docked structure of letrozole with aromatase (a) and the structural elements of CYP19A1 participating in the intermolecular van der Waals interactions (b). The notations used are the same as in Figures 2 and 3

Т а б л и ц а 3. Величины энергии межмолекулярных взаимодействий сконструированных соединений и летрозолa с ароматазой ($H_{\text{связывания}}$), вычисленные по данным квантово-химических расчетов

T a b l e 3. The values of energy for intermolecular interactions of the designed compounds and letrozole with aromatase (H_{binding}) obtained by the data of quantum chemical calculations

Лиганд Ligand	I	II	III	IV	V	VI	Летрозол Letrozole
$H_{\text{связывания}}$, ккал/моль H_{binding} , kcal/mol	-13,6	-7,9	-7,4	-7,0	-6,8	-6,3	-8,7

этого соединения составляет $-13,6$ ккал/моль (табл. 3), что, по приближенной оценке, соответствует величине константы диссоциации $K_d \sim 1,2 \cdot 10^{-10}$ М, вычисленной по формуле $K_d = e^{\Delta G / RT}$ (где ΔG – энергия связывания; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура, равная 300 К). Соединение I формирует наибольшее число ван-дер-ваальсовых контактов с ароматазой (табл. 2, рис. 3), вносящих (совместно с электростатическими взаимодействиями) основной вклад в стабилизацию комплексов белков с лигандами, и участвует в π - π -взаимодействиях с пиррольными кольцами гема CYP19A1. В связи с этим соединение I, лучшее среди сконструированных молекул по величине энергии связывания (табл. 3), может рассматриваться в качестве первоочередного кандидата для синтеза и тестирования на биологическую активность.

Заключение. Анализ предсказанных методами молекулярного моделирования структурных комплексов сконструированных соединений с ароматазой свидетельствует о наличии специфических и эффективных взаимодействий между ними, приводящих к блокаде функционально важных элементов структуры субстрат-связывающего сайта CYP19A1. По данным квантово-химических расчетов, комплексы этих соединений с ароматазой энергетически стабильны и характеризуются низкими значениями энтальпии связывания. Полученные соединения полностью удовлетворяют «правилу пяти» Липинского и формируют перспективные базовые структуры для разработки новых эффективных лекарственных препаратов для терапии рака молочной железы.

Список использованных источников

1. Macedo, L. F. Aromatase inhibitors and breast cancer / L. F. Macedo, G. Sabnis, A. Brodie // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 1155, N 1. – P. 162–173. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03689.x>
2. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase / D. Ghosh [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 457, N 7226. – P. 219–223. <https://doi.org/10.1038/nature07614>
3. Hong, Y. Aromatase inhibitors: structural features and biochemical characterization / Y. Hong, S. Chen // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 1089, N 1. – P. 237–251. <https://doi.org/10.1196/annals.1386.022>
4. Dutta, U. Aromatase inhibitors: past, present and future in breast cancer therapy / U. Dutta, K. Pant // *Med. Oncol.* – 2008. – Vol. 25, N 2. – P. 113–124. <https://doi.org/10.1007/s12032-007-9019-x>
5. Ghosh, D. Recent Progress in the Discovery of Next Generation Inhibitors of Aromatase from the Structure–Function Perspective / D. Ghosh, J. Lo, C. Egbuta // *J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 59, N 11. – P. 5131–5148. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01281>
6. Pharmacophore modeling and in silico screening for new P450 19 (aromatase) inhibitors / D. Schuster [et al.] // *J. Chem. Inf. Model.* – 2006. – Vol. 46, N 3. – P. 1301–1311. <https://doi.org/10.1021/ci050237k>
7. Fast three dimensional pharmacophore virtual screening of new potent non-steroid aromatase inhibitors / M. A. Neves [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 52, N 1. – P. 143–150. <https://doi.org/10.1021/jm800945c>
8. An efficient steroid pharmacophore-based strategy to identify new aromatase inhibitors / M. A. Neves [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 44, N 10. – P. 4121–4127. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.003>
9. X-ray structure of human aromatase reveals an androgen-specific active site / D. Ghosh [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 118, N 4–5. – P. 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.09.012>
10. Structure-activity relationships and docking studies of synthetic 2-arylindole derivatives determined with aromatase and quinone reductase 1 / A. M. Prior [et al.] // *Bioorganic Med. Chem. Letters.* – 2017. – Vol. 27, N 24. – P. 5393–5399. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.11.010>
11. Binding mode of triazole derivatives as aromatase inhibitors based on docking, protein ligand interaction fingerprinting, and molecular dynamics simulation studies / A. Mojaddami [et al.] // *Res. Pharm. Sci.* – 2017. – Vol. 12, N 1. – P. 21–30. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.199043>
12. Pharmacophore Modeling and in Silico/in Vitro Screening for Human Cytochrome P450 11B1 and Cytochrome P450 11B2 Inhibitors / M. Akram [et al.] // *Front. Chem.* – 2017. – Vol. 5. – P. 104. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00104>
13. Kolb, H. C. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions / H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2001. – Vol. 40, N 11. – P. 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11%3C2004::aid-anie2004%3E3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11%3C2004::aid-anie2004%3E3.0.co;2-5)
14. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – Vol. 46, N 1–3. – P. 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
15. Evaluation of the mechanism of aromatase cytochrome P450 / Y. C. Kao [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268, N 2. – P. 243–251. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.01886.x>

References

1. Macedo L. F., Sabnis G., Brodie A. Aromatase inhibitors and breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, vol. 1155, no. 1, pp. 162–173. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03689.x>

2. Ghosh D., Griswold J., Erman M., Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*, 2009, vol. 457, no. 7226, pp. 219–223. <https://doi.org/10.1038/nature07614>
3. Hong Y., Chen S. Aromatase inhibitors: structural features and biochemical characterization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, vol. 1089, no. 1, pp. 237–251. <https://doi.org/10.1196/annals.1386.022>
4. Dutta U., Pant K. Aromatase inhibitors: past, present and future in breast cancer therapy. *Medical Oncology*, 2008, vol. 25, no. 2, pp. 113–124. <https://doi.org/10.1007/s12032-007-9019-x>
5. Ghosh D., Lo J., Egbuta C. Recent progress in the discovery of next generation inhibitors of aromatase from the structure–function perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, vol. 59, no. 11, pp. 5131–5148. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01281>
6. Schuster D., Laggner C., Steindl T. M., Paluszczak A., Hartmann R. W., Langer T. Pharmacophore modeling and in silico screening for new P450 19 (aromatase) inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2006, vol. 46, no. 3, pp. 1301–1311. <https://doi.org/10.1021/ci050237k>
7. Neves M. A., Dinis T. C., Colombo G., Sá e Melo M. L. Fast three dimensional pharmacophore virtual screening of new potent non-steroid aromatase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, vol. 52, no. 1, pp. 143–150. <https://doi.org/10.1021/jm800945c>
8. Neves M. A., Dinis T. C., Colombo G., Sá e Melo M. L. An efficient steroid pharmacophore-based strategy to identify new aromatase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, vol. 44, no. 10, pp. 4121–4127. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.003>
9. Ghosh D., Griswold J., Erman M., Pangborn W. X-ray structure of human aromatase reveals an androgen-specific active site. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, vol. 118, no. 4–5, pp. 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2009.09.012>
10. Prior A. M., Yu X., Park E.-J., Kondratyuk T. P., Lin Y., Pezzuto J. M., Sun D. Structure-activity relationships and docking studies of synthetic 2-arylindole derivatives determined with aromatase and quinone reductase 1. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2017, vol. 27, no. 24, pp. 5393–5399. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.11.010>
11. Mojaddami A., Sakhteman A., Fereidoonzhad M., Faghieh Z., Najdian A., Khahnadideh S., Sadeghpour H., Rezaei Z. Binding mode of triazole derivatives as aromatase inhibitors based on docking, protein ligand interaction fingerprinting, and molecular dynamics simulation studies. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2017, vol. 12, no. 1, pp. 21–30. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.199043>
12. Akram M., Waratchareeyakul W., Haupenthal J., Hartmann R. W., Schuster D. Pharmacophore Modeling and in Silico/in Vitro Screening for Human Cytochrome P450 11B1 and Cytochrome P450 11B2 Inhibitors. *Frontiers in Chemistry*, 2017, vol. 5, pp. 104. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00104>
13. Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, vol. 40, no. 11, pp. 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11%3C2004::aid-anie2004%3E3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11%3C2004::aid-anie2004%3E3.0.co;2-5)
14. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, vol. 46, no. 1–3, pp. 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
15. Kao Y. C., Korzekwa K. R., Laughton C. A., Chen S. Evaluation of the mechanism of aromatase cytochrome P450. *European Journal of Biochemistry*, 2001, vol. 268, no. 2, pp. 243–251. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.01886.x>

Информация об авторах

Андреанов Александр Михайлович – д-р хим. наук, гл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrianov@iboch.bas-net.by.

Николаев Григорий Игоревич – аспирант. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 6, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: reshaemvsem@gmail.com.

Кашин Иван Александрович – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 6, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lighkia@gmail.com.

Корноушенко Юрий Валерьевич – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kornoushenko@iboch.bas-net.by.

Усанов Сергей Александрович – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

Information about the authors

Andrianov Alexander Mikhailovich – D. Sc. (Chemistry), Chief researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrianov@iboch.bas-net.by.

Nikolaev Gregory Igorevich – Postgraduate student. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: reshaemvsem@gmail.com.

Kashyn Ivan Aleksandrovich – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lighkia@gmail.com.

Kornoushenko Yury Valerievich – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kornoushenko@iboch.bas-net.by.

Usanov Sergey Aleksandrovich – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Professor. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.