

**БІЯОРГАЊІЧНАЯ ХІМІЯ**  
**BIOORGANIC CHEMISTRY**

УДК 577.112+547+004.942  
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-2-186-190>

Поступила в редакцию 23.02.2022  
Received 23.02.2022

**Я. В. Фалетров<sup>1,2</sup>, В. О. Малюгин<sup>1</sup>, Н. С. Фролова<sup>2</sup>, В. М. Шкуматов<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь

**IN SILICO ОЦЕНКА НОВЫХ АФФИННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ  
МЕТИЛКУМАРИНА С ЦИТОХРОМАМИ P450**

**Аннотация.** Синтезирован 4-метил-7-метоксикумарин (CumOMe) и *in silico* показано, что локализация метоксильного фрагмента на расстоянии не более 0,4 нм от железа гема возможны для отдельных структур CYP19A1 и CYP46 человека, а также CYP152 *S. paucimobilis*, CYP158 *St. coelicolor*, HMUO *C. diphtheriae*, XPLA *R. rhodochrous*, CYP199A4 *Rh. palustris*, CYP101A1 *Ps. Putida* и CYP51 *M. tuberculosis*.

**Ключевые слова:** 4-метил-7-метоксикумарин, *in silico*, виртуальный скрининг, докинг, цитохромы P450

**Для цитирования.** *In silico* оценка новых аффинных взаимодействий метилкумарина с цитохромами P450 / Я. В. Фалетров [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2022. – Т. 58, № 2. – С. 186–190. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-2-186-190>

**Y. V. Faletrov<sup>1,2</sup>, V. O. Maliugin<sup>1</sup>, N. S. Frolova<sup>2</sup>, V. M. Shkumatov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Belarusian State University, Minsk, Belarus

<sup>2</sup>Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

**IN SILICO EVALUATION OF NEW AFFINE INTERACTIONS  
OF METHYLCOUMARIN WITH CYTOCHROMES P450**

**Abstract.** 4-methyl-7-methoxycoumarin (CumOMe) has been synthesized and *in silico* calculations demonstrated localization of methoxy group within 0.4 nm from Fe ion of hem groups for some structures of human CYP19 & CYP46 as well as CYP152 *S. paucimobilis*, CYP158 *St. coelicolor*, HMUO *C. diphtheriae*, XPLA *R. rhodochrous*, CYP199A4 *Rh. palustris*, CYP101A1 *Ps. putida* and CYP51 *M. tuberculosis*.

**Keywords:** 4-methyl-7-methoxycoumarin, *in silico*, virtual screening, docking, cytochromes P450

**For citation.** Faletrov Y. V., Maliugin V. O., Frolova N. S., Shkumatov V. M. *In silico* evaluation of new affine interactions of methylcoumarin with cytochromes P450. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnyh navuk = Proceedings of the National Academy of Science of Belarus. Chemical series*, 2022, vol. 58, no. 2, pp. 186–190 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-2-186-190>

**Введение.** Кумарины (производные 2Н-хромен-2-она) достаточно хорошо исследованы как субстраты цитохромов P450 (СУР). При использовании кумаринов в качестве молекулярных инструментов для скрининга новых аффинных ингибиторов важным является значительное изменение флуоресцентных свойств этих субстратов в процессе превращения СУР. В таком ключе 7-метокси-, 7-этокси- и 7-бензилокси- производные кумарина зарекомендовали себя как флуорогенные субстраты ряда СУР. Среди СУР с установленной способностью катализировать 7-О-дезалкилирование 7-алкоксикумаринов есть СУР1А1, СУР1В1, СУР1А2, СУР2А6, СУР2С19, СУР2А13, СУР3А4, СУР19 и др. [1–5]. Приведенные выше данные, а также то обстоятельство, что химический синтез 4-метил-7-гидроксикумарина может быть достаточно осуществлен из доступных ацетоуксусного эфира и резорцина [6], создает интерес к дополнительной оценке его О-метилированного производного как потенциального флуорогенного (профлуоресцентного) субстрата СУР. Согласно нашим сведениям, взаимодействия именно О-метил производного 4-метил-7-гидроксикумарина, 4-метил-7-метоксикумарина (CumOMe) с СУР в научной литературе практически не освещены, даже на уровне *in silico*.

Таким образом, цель работы – синтезировать CumOMe, а также оценить возможность локализации такого соединения в активных центрах CYP, допускающих возможность реакции O-деметилирования (метоксигруппа вблизи железа гемма), методом обратного виртуального скрининга [7] с использованием множества известных трехмерных структур CYP.

**Экспериментальная часть.** Реактивы и растворители имели квалификацию «ч.» и «ч. д. а.». Оценку индивидуальности синтезируемых веществ и наблюдение за ходом проводимых реакций осуществляли методом ТСХ на пластинках Sorbfil. Синтез осуществляли по известным методикам. Масс-спектрометрическое подтверждение получения целевого продукта проводили методом масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом (EI-MS) на хромато-масс-спектрометре QP2010+ (Shimadzu, Япония) методом прямого ввода; энергия электронов – 70 эВ, температура источника – 100–250 °С.

**4-Метил-7-метоксикумарин (CumOMe):** 0,5 г (2,84 ммоль, 1 экв.) 4-метил-7-гидроксикумарина растворяли в 5 мл ацетонитрила, затем добавляли 0,35 г (6,25 ммоль, 2,2 экв.) KOH, перемешивали 5 мин, затем добавляли 1,5 мл (16,2 ммоль, 7,4 экв.) диметилсульфата (DMS, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Смесь в колбе с обратным холодильником выдерживали 3 ч при 40 °С, затем ее охлаждали, осадок промывали водой, высушивали и очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием смеси бензол : ацетон 92:8, по объему. Содержащие чистый продукт фракции объединяли, упаривали досуха (выход 60 %). Данные EI-MS: *m/z* 190, 162, 147, 91; совпадение с спектром для 4-метил-7-метоксикумарин из библиотеки NIST 70 %.

Расчеты и анализ результатов обратного виртуального скрининга, включающие значения энергии связывания ( $E_{bind}$ , ккал/моль) и расстояний от С-атома 7-метоксигруппы CumOMe, (C14 по нумерации в файле) проведены с использованием программного пакета AutoDockTools 1.5.6 и программы Autodock Vina, как описано в работе [8].

**Результаты и их обсуждение.** Чтобы оценить потенциал CumOMe как флуорогенного субстрата CYP с целью выявления на уровне *in silico* новых взаимодействий этого вещества и его дальнейших перспектив, был проведен обратный виртуальный скрининг CumOMe в отношении ~ 340 структур разных CYP человека и ~ 400 структур разных CYP микобактерий, бактерий и некоторых других организмов.

Показано, что для CYP человека с локализацией вблизи железа гемма характеризовалось только 67 из них. Ко-локализация атома углерода метоксильной группы CumOMe в пределах 0,4 нм от атома железа гемма использованных структур CYP было обнаружено всего в двух случаях, данные о которых представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Значения  $E_{bind}$  и аминокислотное окружение CumOMe в смоделированных комплексах с CYP человека

Table 1.  $E_{bind}$  values and amino acids surrounding for CumOMe in modeled complexes with CYP of *Homo sapience*

PDB код белка	Описание белка	$E_{bind}$ , ккал/моль	Некоторые остатки аминокислот рассчитанного окружения лиганда в комплексе (0,4 нм)
5jkw	CYP19A1	-7,5	Arg115; Hem600; Ile133; Leu372; Leu477; Met374; Val373
3mdm	CYP46A1	-7,4	Ala302; Ala367; Ala474; Arg226; Gly369; Hem505; Trp368

Отметим, что расстояние Fe–O в перферил катион-радикале (соединении I) составляет ~ 0,165 нм [9], а длина C–H связи в метоксильной группе ~ 0,108 нм, что сокращает прогнозируемую дистанцию между атомами лиганда и фермента, допускающую реализацию отрыва (абстракции) водорода – ключевого этапа в механизме O-деметилирования. Из полученных данных следует, что CumOMe имеет возможность располагаться в активных центрах стероидогенных CYP19A1 и CYP46A1. Для CYP46A1, но не для CYP19 [10], по нашим сведениям, не сообщалось об оценке их способности к O-деалкилированию кумаринов даже *in silico*.

Показано, что для исследованных CYP, не принадлежащих протеому человека, способность к локализации CumOMe вблизи Fe показана для 192 структур. Ко-локализация С-атома метоксильной группы CumOMe в пределах 0,4 нм от атома Fe изученных структур CYP было обнаружено в 11 случаях из всех, которые описаны в табл. 2.

Таблица 2. Значения  $E_{\text{bind}}$  и аминокислотное окружение CumOMe в смоделированных комплексах с CYP бактерийTable 2.  $E_{\text{bind}}$  values and amino acids surrounding for CumOMe in modeled complexes with CYP of bacteria

PDB код белка	Описание белка, организм	$E_{\text{bind}}$ , ккал/моль	Некоторые остатки аминокислот рассчитанного окружения лиганда в комплексе (0,4 нм)
3VOO	CYP152B1 A245E, <i>S. paucimobilis</i>	-8,5	Gln84; Hem501; Met69; Arg65; Val292; Val291
3VTJ	CYP152B1 A245H, <i>S. paucimobilis</i>	-7,9	Gln84; Hem501; Arg65; Met69; Val291; Val292
2L8M	CYP101A1, <i>Ps. putida</i>	-7,8	Tyr96; Hem416; Thr101; Val295; Thr252
2w0b	CYP51, <i>M. tuberculosis</i>	-7,6	His101; Ala256; Hem470; Lys97; Leu321; Gln72
1SE6	CYP158A2, <i>St. coelicolor</i>	-7,5	His287; Ile394; Hem430; Arg288; Ala245
3AWM	CYP152B1, <i>Sph. paucimobilis</i>	-7,3	Leu77; Phe288; Phe169; Pro399; Hem501
3AWQ	CYP152B1 L78F, <i>S. Paucimobilis</i>	-7,3	Leu77; Phe169; Phe287; Ala245; Hem501
2NZA	CYP158A1, <i>St. coelicolor</i>	-7,2	His290; Hem430; Arg291; Leu296; Gly245
3I8R	HMUO, <i>C. diphtheriae</i>	-7,1	Phe208; Phe52; Tyr161; Phe160; Hem901
4EP6	XPLA, <i>R. rhodochrous</i>	-7	Trp230; Gln325; Trp224; Val387; Hem601
4EGM	CYP199A4, <i>Rh. palustris</i>	-6,2	Hem501; Ser95; Ile97; Arg92; Phe182; Phe298

Из полученных данных следует, что CumOMe имеет возможность располагаться в активных центрах ряда форм CYP152 *S. paucimobilis*, CYP158 *St. coelicolor*, P450 гемм-оксигеназа HMUO *C. diphtheriae*, P450-флаводоксин сшитый фермент XPLA *R. rhodochrous*, CYP199A4 *Rh. palustris*, CYP101A1 *Ps. putida* и CYP51 *M. tuberculosis*. Для CYP51 дрожжей была показана способность осуществлять флуорогенное О-дезалкилирование 7-бензилоксиметил-3-цианокумарина [11], и для CYP199A4 сообщалось о способности деметилировать метоксибензойную кислоту [12], тогда как в остальном способность этих CYP катализировать О-дезалкилирование кумаринов не оценивалась. С другой стороны, следует отметить, что для множества других структур CYP ко-локализация метоксигруппы CumOMe с железом гемма не наблюдалось, что указывает на возможность альтернативных путей окисления этого вещества CYP.

**Заключение.** Синтезирован 4-метил-7-метоксикумарин (CumOMe) и *in silico* показано, что локализация метоксильного фрагмента на расстояние не более 0,4 нм от железа гемма возможны для отдельных структур CYP19A1 и CYP46 человека, а также CYP152 *S. paucimobilis*, CYP158 *St. coelicolor*, HMUO *C. diphtheriae*, XPLA *R. rhodochrous*, CYP199A4 *Rh. palustris*, CYP101A1 *Ps. putida* и CYP51 *M. tuberculosis*. Полученные *in silico* результаты могут быть использованы для разработки новых флуорогенных тестов на данные оксидоредуктазы.

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке задания Государственной программы научных исследований (№ г.р. 20210560).

**Acknowledgements.** The work was supported by SPSR (grant № 20210560).

### Список использованных источников

1. Raunio, H. Coumarin-Based Profluorescent and Fluorescent Substrates for Determining Xenobiotic-Metabolizing Enzyme Activities *in vitro* / H. Raunio, O. Pentikäinen, R. O. Juvonen // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, N 13. – P. 4708. <https://doi.org/10.3390/ijms21134708>
2. Interaction of coumarin-hydroxylating cytochrome P-450coh from liver microsomes of mice induced by pyrazole with cytochrome B5] / S. A. Usanov [et al.] // *Biokhimiya.* – 1990. – Vol. 55. – P. 995–1007.
3. Juvonen, R. O. Purification and characterization of a liver microsomal cytochrome P-450 isoenzyme with a high affinity and metabolic capacity for coumarin from pyrazole-treated D2 mice / R. O. Juvonen, V. M. Shkumatov, M. A. Lang // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – Vol. 171, N 1-2. – P. 205–211. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13777.x>
4. Development of new Coumarin-based profluorescent substrates for human cytochrome P450 enzymes / R. O. Juvonen [et al.] // *Xenobiotica.* – 2019. – Vol. 49, N 9. – P. 1015–1024. <https://doi.org/10.1080/00498254.2018.1530399>
5. Substrate Selectivity of Coumarin Derivatives by Human CYP1 Enzymes: In Vitro Enzyme Kinetics and In Silico Modeling / R. O. Juvonen [et al.] // *ACS Omega.* – 2021. – Vol. 6, N 17. – P. 11286–11296. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00123>

6. Coumarin Derivatives Solvent-Free Synthesis under Microwave Irradiation over Heterogeneous Solid Catalysts / S. Bouasla [et al.] // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, N 12. – P. 2072. <https://doi.org/10.3390/molecules22122072>
7. Xu, X. Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges / X. Xu, M. Huang, X. Zou // *Biophys. Res.* – 2018. – Vol. 4, N 1. – P. 1–16. <https://doi.org/10.1007/s41048-017-0045-8>
8. Синтез новых тиазоло[3,2-а]пиримидинов и *in silico* анализ их биоактивности / И. В. Минеева [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук.* – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 456–462. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-456-462>
9. Stone, K. L. X-ray absorption spectroscopy of chloroperoxidase compound I: Insight into the reactive intermediate of P450 chemistry / K. L. Stone, R. K. Behan, M. T. Green // *PNAS*. – 2005. – Vol. 102, N 46. – P. 16563–16565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507069102>
10. A high-throughput screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19) / D. M. Stresser [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2000. – Vol. 284, N 2. – P. 427–430. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4729>
11. Characterisation of *Candida parapsilosis* CYP51 as a drug target using *Saccharomyces cerevisiae* as host / Y. N. Ruma [et al.] // *J. Fungi* – 2022. – Vol. 8, N 1. – P. 69. <https://doi.org/10.3390/jof8010069>
12. Investigation of the Substrate Range of CYP19A4: Modification of the Partition between Hydroxylation and Desaturation Activities by Substrate and Protein Engineering / S. G. Bell [et al.] // *Chem. Eur. J.* – 2012. – Vol. 18, N 52. – P. 16677–16688. <https://doi.org/10.1002/chem.201202776>

## References

1. Raunio H., Pentikäinen O., Juvonen R. O. Coumarin-Based Profluorescent and Fluorescent Substrates for Determining Xenobiotic-Metabolizing Enzyme Activities *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, vol. 21, no. 13, pp. 4708. <https://doi.org/10.3390/ijms21134708>
2. Usanov S. A., Honkakoski P., Lang M., Hanninen O. Interaction of coumarin-hydroxylating cytochrome P-450coh from liver microsomes of mice induced by pyrazole with cytochrome B5. *Biokhimiya*, 1990, vol. 55, pp. 995–1007.
3. Juvonen R. O., Shkumatov V. M., Lang M. A. Purification and characterization of a liver microsomal cytochrome P-450 isoenzyme with a high affinity and metabolic capacity for coumarin from pyrazole-treated D2 mice. *European Journal of Biochemistry*, 1988, vol. 171, no. 1–2, pp. 205–211. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13777.x>
4. Juvonen R. O., Ahinko M., Huuskonen J., Raunio H., Pentikäinen O. T. Development of new Coumarin-based profluorescent substrates for human cytochrome P450 enzymes. *Xenobiotica*, 2019, vol. 49, no. 9, pp. 1015–1024. <https://doi.org/10.1080/00498254.2018.1530399>
5. Juvonen R. O., Ahinko M., Huuskonen J., Raunio H., Pentikäinen O. T. Substrate Selectivity of Coumarin Derivatives by Human CYP1 Enzymes: *In Vitro* Enzyme Kinetics and *In Silico* Modeling. *ACS Omega*, 2021, vol. 6, no. 17, pp. 11286–11296. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00123>
6. Bouasla S., Gahete J. A., Esquivel D., López M. I., Sanchidrián C., Teguiche M., Romero-Salguero F. J. Coumarin Derivatives Solvent-Free Synthesis under Microwave Irradiation over Heterogeneous Solid Catalysts. *Molecules*, 2017, vol. 22, no. 12, pp. 2072. <https://doi.org/10.3390/molecules22122072>
7. Xu X., Huang M., Zou X. Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges. *Biophysics Reports*, 2018, vol. 4, no. 1, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1007/s41048-017-0045-8>
8. Mineeva I. V., Faletrov Y. V., Starovoytova V. A., Shkumatov V. M. Synthesis of new thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives and *in silico* analysis of their bioactivity. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical Series*, 2021, vol. 57, no. 4, pp. 456–462 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-456-462>
9. Stone K. L., Behan R. K., Green M. T. X-ray absorption spectroscopy of chloroperoxidase compound I: Insight into the reactive intermediate of P450 chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no. 46, pp. 16563–16565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507069102>
10. Stresser D. M., Turner S. D., McNamara J., Stocker P., Miller V. P., Crespi C. L., Patten C. J. A high-throughput screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19). *Analytical Biochemistry*, 2000, vol. 284, no. 2, pp. 427–430. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4729>
11. Ruma Y. N., Keniya M. V., Tyndal J. D. A., Monk B. C. Characterisation of *Candida parapsilosis* CYP51 as a drug target using *Saccharomyces cerevisiae* as host. *Journal of Fungi*, 2022, vol. 8, no. 1, pp. 69. <https://doi.org/10.3390/jof8010069>
12. Bell S. G. [et al.] Investigation of the Substrate Range of CYP19A4: Modification of the Partition between Hydroxylation and Desaturation Activities by Substrate and Protein Engineering. *Chemistry - A European Journal*, 2012, vol. 18, no. 52, pp. 16677–16688. <https://doi.org/10.1002/chem.201202776>

## Информация об авторах

Фалетров Ярослав Вячеславович – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. НИИ физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yaroslav82@tut.by

## Information about the authors

Faletrov Yaroslav V. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yaroslav82@tut.by

*Малиугин Владислав Олегович* – студент 3-го курса хим. фак. Белорусский государственный университет. E-mail: vmaliugin@mail.ru

*Фролова Нина Степановна* – науч. сотрудник. НИИ физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: frolova\_n\_2006@bk.ru

*Шкуматов Владимир Макарович* – член-корреспондент НАН Беларуси, д-р биол. наук, профессор, зав. лаб. НИИ физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vlad.shkumatov@tut.by

*Maliugin Vladislav O.* – 3rd-year student of the Faculty of Chemistry. Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vmaliugin@mail.ru

*Frolova Nina S.* – Researcher. Research Institute for Physical-Chemical Problems of the Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: frolova\_n\_2006@bk.ru

*Shkumatov Vladimir M.* – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Research Institute for Physical-Chemical Problems of the Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vlad.shkumatov@tut.by