

УДК 547:577:616-006

## **Молекулярное моделирование новых нестероидных ингибиторов ароматазы, содержащих 1,2,4-триазол**

**Андрианов А.М.<sup>\* 1</sup>, Николаев Г.И.<sup>2</sup>, Кашин И.А.<sup>2</sup>,  
Корноушенко Ю.В.<sup>1</sup>, Усанов С.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси,  
Минск, 220141, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Объединенный институт проблем информатики, Национальная академия наук  
Беларуси, Минск, 220012, Республика Беларусь*

**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 девять 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.

### **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 эстрогена 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

---

\*alexande.andriano@yandex.ru

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 гидроксильных реакциях С-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, фадрозол, 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 экзестаном и 2) обратимыми нестероидными ингибиторами ворозолом, анастрозолом и летрозолом. Стероидные препараты и, в частности, экзестан 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 СYP19A1 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 СYP19A1 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., например, работы [10–21]).

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 [22]. 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, накладывающего на лиганд, взаимодействующий с заданной молекулярной мишенью, условия подобия лекарству [23].

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 эффективным и специфическим взаимодействиям с субстрат-связывающим сайтом ароматазы, которые опосредуются образованием координационной связи с атомом железа гема СYP19A1.

## 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>) [24] 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.

Базовые шаги алгоритма, использованного для компьютерного дизайна потенциальных ингибиторов ароматазы, приведены на рисунке 1. На первом этапе с

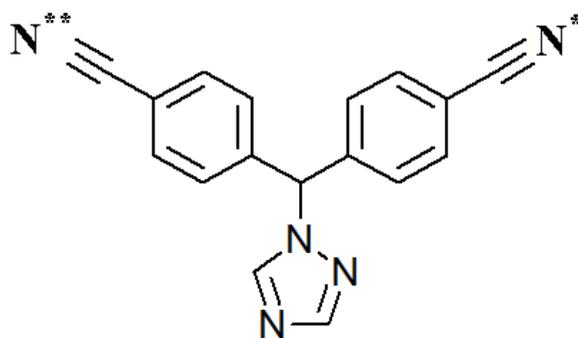
помощью программы DataWarrior (<http://www.openmolecules.org/help/basics.html>) [25] были созданы две молекулярные библиотеки (рис. 1). Первая библиотека (библиотека 1) включала отобранные из кластера “Drug-Like” базы данных Zinc [24] малые молекулы с молекулярной массой < 250 Да, содержащие 1,2,4-триазол – 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 функциональными группами, которые необходимы для моделирования реакций, реализованных в программном пакете AutoClickChem (<http://sourceforge.net/projects/autoclickchem/>) [26]. 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 (рис. 1). 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 [26]. Это позволило получить набор из 4576 гибридных молекул, в котором 784 соединения удовлетворяли “правилу пяти” Липинского [23] согласно данным программы DruLiTo ([niper.gov.in/pi\\_dev\\_tools/DruLiToWeb/DruLiTo\\_index.html](http://niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html)).



Рис. 1. Базовые шаги алгоритма, использованного для компьютерного дизайна потенциальных ингибиторов ароматазы.

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 (рис. 2), трехмерную структуру которого заимствовали из базы данных DrugBank (код DB01006, <https://www.drugbank.ca>) [27, 28]. Молекулярный докинг выполнялся программным пакетом QuickVina 2 (<http://omictools.com/quickvina-tool>) [29] с учетом конформационной подвижности лиганда. Трехмерную структуру ароматазы заимствовали из ее комплекса с андростендионом в кристалле (код 3EQM в Банке данных белков; <http://www.rcsb.org/pdb/>) [2, 9]. Перед проведением докинга с помощью программы OpenBabel ([http://openbabel.org/wiki/Main\\_Page](http://openbabel.org/wiki/Main_Page)) [30] к структурам ароматазы и лигандов добавляли атомы водорода и проводили оптимизацию их геометрических параметров в силовом поле UFF [31]. Ячейка для докинга представляла собой фрагмент CYP19A1 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.

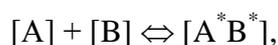


**Рис. 2.** Химическая структура летрозола. Надстрочными звездочками отмечены атомы, участвующие в образовании водородных связей с ароматазой (см. текст).

Квантово-химические расчеты выполняли полуэмпирическим методом PM7 в программном пакете MOPAC2016 [32] с неявной моделью растворителя в рамках приближения COSMO (COnductor-like Screening MOdel) при значении диэлектрической проницаемости, равном 78,4. 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 [31]. Для этих целей применяли программу Open Babel [30]. Для ускорения вычислений использовали метод локализованных орбиталей. Градиент энергии, при котором завершается процесс оптимизации, задавали равным  $50 \text{ ккал/моль/\AA}$  [32].

Межмолекулярные водородные связи, солевые мостики и  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия в оптимизированных комплексах лигандов с ароматазой определяли с помощью программы BINANA (<http://nbcrc.ucsd.edu/data/sw/hosted/binana/>) [33]. Для идентификации ван-дер-ваальсовых взаимодействий использовали программный пакет LigPlot (<http://ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>) [34].

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 А и В с учетом структурных перестроек в молекулах (А\* и В\*) [32].

Энтальпию взаимодействия вычисляли следующим образом [32]:

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

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 OpenVabel [30].

Расчеты выполняли на компьютерном кластере Института биоорганической химии НАН Беларуси.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ структурных комплексов сконструированных лигандов с ароматазой позволил выделить 9 соединений-лидеров, эффективно взаимодействующих с субстрат-связывающим сайтом фермента и характеризующихся низкими значениями энергии связывания ( $< -6$  ккал/моль). Идентифицированные соединения были разделены на два структурных кластера (кластеры 1 и 2) в зависимости от механизма связывания с активным центром СУР19А1.

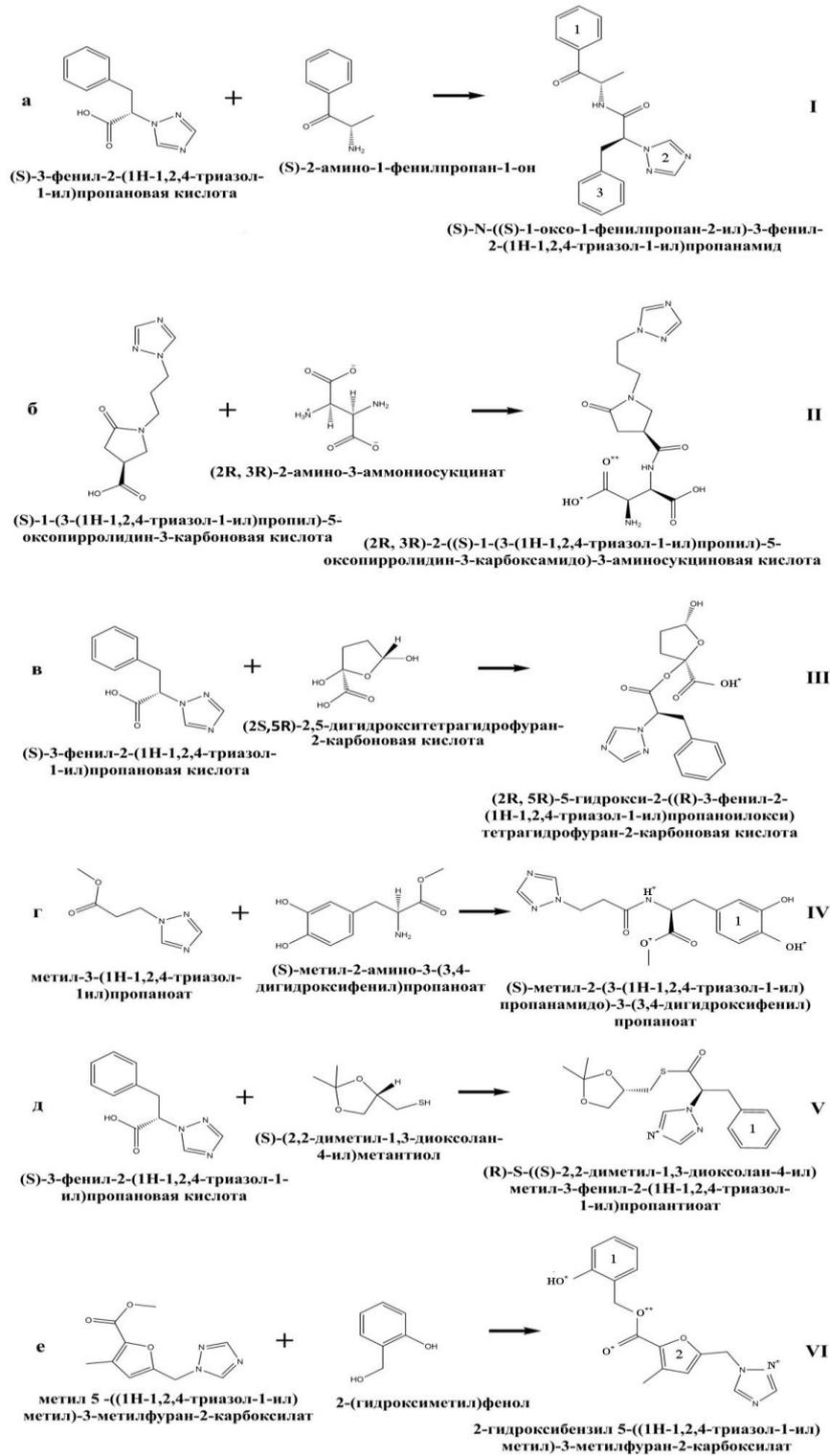
Схема компьютерного дизайна гибридных молекул кластера 1 приведена на рисунке 3. В таблице 1 представлены их физико-химические параметры, которые обеспечивают такие важные для лекарства свойства как абсорбция, распределение, метаболизм, выделение, и используются в “правиле пяти” Липинского для отбора лигандов, перспективных для разработки биофармацевтических препаратов [23]. Анализ данных таблицы 1 показывает, что все идентифицированные лиганды ароматазы из кластера 1 являются малыми молекулами и полностью удовлетворяют критериям, налагаемым на потенциальное лекарство правилом Липинского.

**Таблица 1.** Химические соединения кластера 1 – потенциальные ингибиторы ароматазы

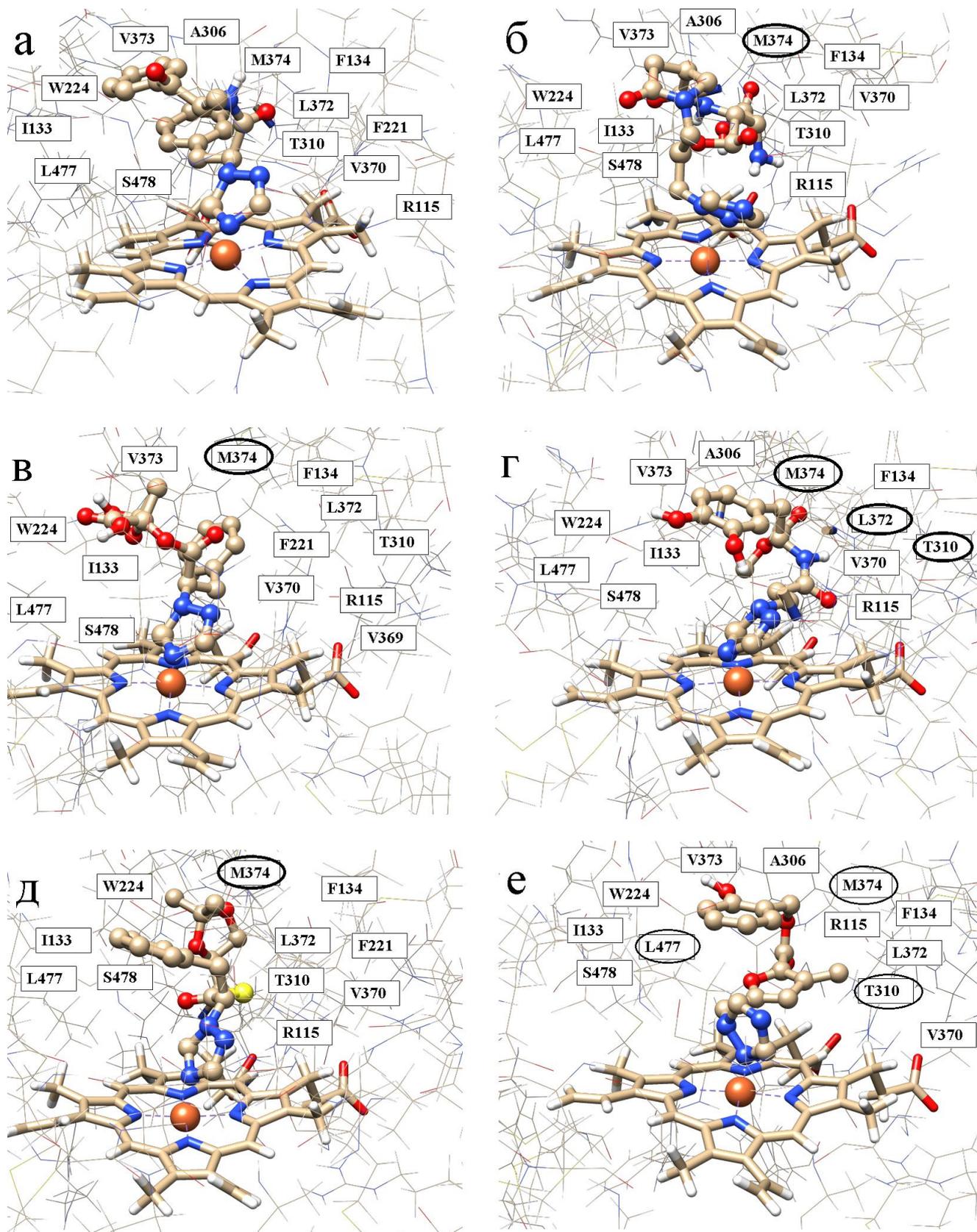
Лиганд	Химическая формула	Молекулярная масса (Да)	LogP	Число доноров водородной связи	Число акцепторов водородной связи	Объем, Å <sup>3</sup>
I	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	348.4	2.04	1	6	318.9
II	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	367.3	-4.88	3	12	286.9
III	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	347.3	0.03	2	9	297.9
IV	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	334.3	-1.03	3	9	292.1
V	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	347.4	2.07	0	6	316.0
VI	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	313.3	1.38	1	7	269.6

Примечания: LogP – липофильность соединения (коэффициент распределения вещества в двухфазной системе н-октанол/вода). Приведенные данные получены с помощью программы DruLiTo ([http://www.niper.gov.in/pi\\_dev\\_tools/DruLiToWeb/DruLiTo\\_index.html](http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html)).

Исследование структурных комплексов этих соединений с ароматазой (рис. 4) 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 таблице 2.



**Рис. 3.** Схема компьютерной сборки гибридных молекул I (а), II (б), III (в), IV (г), V (д), VI (е) кластера 1 – 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  $\pi$ -сопряженные фрагменты лигандов, участвующие в  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействиях с пиррольными кольцами гема CYP19A1 (табл. 2). Соединения I–VI сконструированы путем компьютерного моделирования реакций амидирования (а, б, г), этерификации (в), тиоэтерификации (д) и переэтерификации (е).



**Рис. 4.** Структурные комплексы соединений I (а), II (б), III (в), IV (г), V (д) и VI (е) кластера 1 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.

**Таблица 2.** Межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся в оптимизированных комплексах соединений кластера I с ароматазой

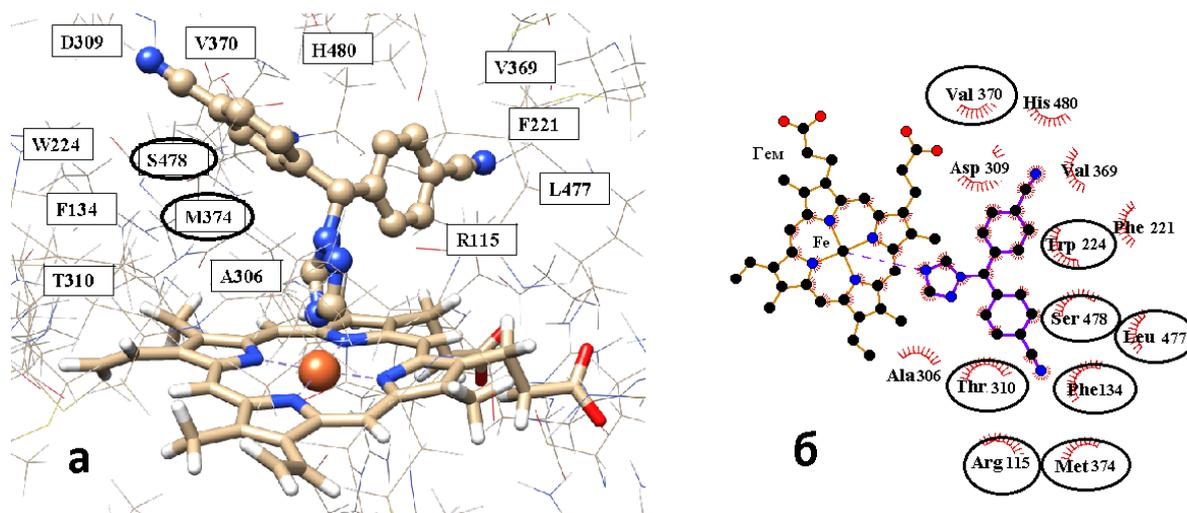
Лиганд	Ван-дер-ваальсовы контакты <sup>2</sup>	Солевые мостики и $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия <sup>3</sup>	Длина связи N-F <sup>4</sup> Å	
I	–	R115(3), I133(1), F134(1), F221(1), W224(2), A306(3), T310(2), V370(8), L372(1), V373(6), M374(1), L477(7), S478(4), ГЕМ (22)	1...ГЕМ 2...ГЕМ 3...ГЕМ ( $\pi$ - $\pi$ -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 ( $\pi$ - $\pi$ -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 ( $\pi$ - $\pi$ -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: <sup>1</sup>Первыми указаны атомы молекулы лиганда (рис. 3), а вторыми – атомы аминокислотных остатков ароматазы (приведены в квадратных скобках в однобуквенном коде). <sup>2</sup> Аминокислотные остатки ароматазы, формирующие ван-дер-ваальсовы контакты с лигандами. В скобках указано число контактов. <sup>3</sup> Для солевых мостиков первыми приведены функциональные группы лигандов, а для  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействий – номера их  $\pi$ -сопряженных систем (рис. 3). <sup>4</sup>Длина координационной связи между атомом азота 1,2,4-триазола и атомом железа гема ароматазы. В скобках указан номер атома азота триазольного цикла.

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 аминогруппой Met-374 [2, 9]. Кроме того, соединение IV формирует водородные связи с остатками Thr-310, Leu-372 ароматазы и с атомом азота ее простетической 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 лиганды ароматазы из кластера I образуют широкую сеть ван-дер-ваальсовых контактов (см. табл. 2, рис. 5), суммарное число которых варьирует от 32 (соединение II) до 62 (соединение I). 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, критическими для проявления каталитической активности CYP19A1 [5].





**Рис. 6.** Структурный комплекс летрозола с ароматазой (а) и элементы структуры CYP19A1, участвующие в межмолекулярных ван-дер-ваальсовых взаимодействиях (б). Использованы такие же обозначения, как на рисунках 4,а и 5,б.

Как видно из данных таблицы 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  $\pi$ -сопряженными системами соединений I, IV, V и VI (рис. 3) участвуют в специфических  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействиях с пиррольными кольцами простетической группы ароматазы (табл. 2).

Таким образом, данные молекулярного моделирования свидетельствуют о том, что соединения кластера 1 характеризуются близким механизмом взаимодействия с субстрат-связывающей полостью ароматазы, основу которого формируют координационная связь между атомом азота триазольного кольца и железом гема, межмолекулярные ван-дер-ваальсовы контакты, водородные связи (соединения II–VI), солевые мостики (соединение II) и  $\pi$ -стэкинг между  $\pi$ -сопряженными системами лигандов и пиррольных колец простетической группы фермента (соединения I, IV, V, VI) (табл. 2, рис. 5). При этом доминирующую роль в стабилизации структурных комплексов ароматазы с лигандами играют многочисленные ван-дер-ваальсовы контакты, в которые вовлечены как консервативные остатки гидрофобной субстрат-связывающей полости CYP19A, так и элементы структуры простетической группы фермента (табл. 2, рис. 5). Для контрольного соединения – летрозола – методы молекулярного моделирования предсказывают аналогичный механизм связывания с ароматазой (табл. 2, рис. 6). Согласно расчетным данным (табл. 2, рис. 6), этот ингибитор CYP19A1 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 CYP19A1 формируют прямые межатомные контакты и с идентифицированными соединениями I–VI (табл. 2, рис. 5, рис. 6).

Эффективность межмолекулярных взаимодействий, реализующихся в структурных комплексах лигандов кластера 1 с ароматазой, подтверждают предсказанные на основе данных квантово-химических расчетов величины энthalпии связывания, варьирующие в интервале от  $-6.3$  ккал/моль до  $-13.6$  ккал/моль (табл. 3). При анализе данных

таблицы 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 RM7 – единственного полуэмпирического метода, учитывающего поправки на межмолекулярные дисперсионные взаимодействия и водородные связи [36], позволяет предполагать, что значения энтальпии связывания, предсказанные для сконструированных соединений, сопоставимы с величиной  $-8.7$  ккал/моль, рассчитанной для летрозолола с привлечением идентичного вычислительного протокола (табл. 3).

Среди рассматриваемых лигандов ароматазы следует особо отметить соединение I (рис. 3), характеризующееся существенно более низким значением энтальпии связывания по сравнению с летрозолом (табл. 3). Предсказанное значение энергии межмолекулярных взаимодействий для этого соединения составляет  $-13,6$  ккал/моль (табл. 3), что, по приближенной оценке, соответствует величине константы диссоциации  $K_d \sim 1.2 \times 10^{-10}$  М, вычисленной по формуле  $K_d = e^{\Delta G/RT}$  (где  $\Delta G$  – 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. 5), вносящих (совместно с электростатическими взаимодействиями) основной вклад в стабилизацию комплексов белков с лигандами, и участвует в  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействиях с пиррольными кольцами гема СYP19A1. В связи с этим соединение I, лучшее по величине энергии связывания среди молекул кластера I (табл. 3), может рассматриваться в качестве первоочередного кандидата для синтеза и тестирования на биологическую активность.

**Таблица 3.** Величины энергии межмолекулярных взаимодействий соединений кластера I с ароматазой ( $H_{\text{связывания}}$ ), вычисленные по данным квантово-химических расчетов

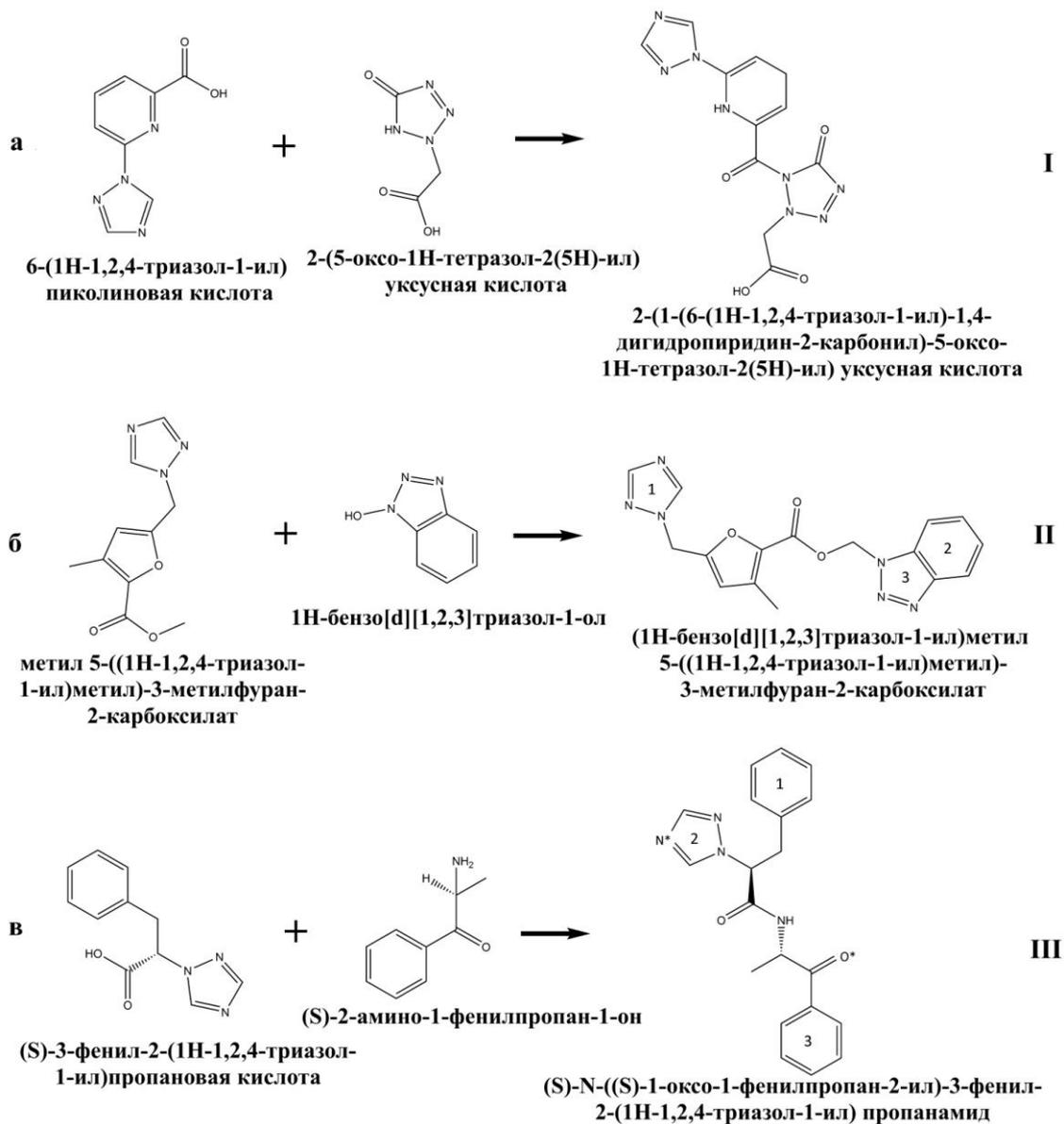
Лиганд	I	II	III	IV	V	VI	Летрозол
Энергия связывания, ккал/моль	-13.6	-7.9	-7.4	-7.0	-6.8	-6.3	-8.7

На рисунке 7 приведена схема компьютерного дизайна соединений кластера 2, а в таблице 4 представлена краткая информация об этих молекулах. Из анализа данных таблицы 4 видно, что, как и соединения группы 1, эти потенциальные лиганды ароматазы представляют собой малые молекулы, полностью удовлетворяющие “правилу пяти” Липинского [23]. Однако в отличие от лигандов группы 1, их триазольное кольцо не участвует в прямых межатомных контактах с гемом фермента (табл. 5, рис. 8 и 9). В данном случае координация железа гема СYP19A1 реализуется путем донорно-акцепторных взаимодействий с атомами кислорода (соединения I и III) или углерода (соединение II) анализируемых молекул (табл. 5, рис. 8). Согласно предсказанному механизму связывания, все соединения кластера 2 формируют ван-дер-ваальсовы контакты с такими функционально важными остатками субстрат-связывающего сайта ароматазы, как Arg-115, Pe-133, Phe-221, Trp-224, Thr-310, Val-370, Met-374, Leu-477, Ser-478 [35], а также с атомами ее простетической группы (табл. 5). При этом лиганды II и III участвуют в  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействиях с пиррольными кольцами гема СYP19A1. Кроме того, соединение III образует Т-стэкинг с  $\pi$ -

сопряженной системой Phe-134 и водородные связи остатками Met-374 и Thr-310, а соединение I – солевой мостик с гемом ароматазы (табл. 5).

**Таблица 4.** Химические соединения кластера 2 – потенциальные ингибиторы ароматазы

Лиганд	Химическая формула	Молекулярная масса, (Да)	LogP	Число доноров водородной связи	Число акцепторов водородной связи	Объем, Å <sup>3</sup>
I	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	318.2	3.80	2	12	251.7
II	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	338.3	1.60	0	9	51.9
III	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	348.4	2.04	1	6	314.0



**Рис. 7.** Схема компьютерного дизайна молекул I (а), II (б), III (в) кластера 2. Показаны реагенты и продукты реакции. Приведены систематические названия этих соединений. Надстрочными звездочками отмечены атомы, образующие межмолекулярные водородные связи (табл. 5). Цифрами обозначены π-сопряженные фрагменты лигандов, участвующие в π-π-взаимодействиях с пиррольными кольцами гема СУР19А1 (табл. 5).

**Таблица 5.** Межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся в оптимизированных комплексах соединений кластера 2 с ароматазой

Лиганд	Водородная связь <sup>1</sup>	Ван-дер-ваальсовы контакты <sup>2</sup>	Солевые мостики и $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия <sup>3</sup>	Длина связи C(O)-F <sup>4</sup> , Å
I	–	R115(3), F134(2), I133(2), F221(1), W224(2), A306(1), T310(4), V370(2), M374(4), L477(2), S478(1), ГЕМ(15)	CO <sub>2</sub> ...ГЕМ (солевой мостик)	2.15 (O)
II	–	R115(2), I133(5), F221(1), W224(1), T310(4), V370(2), L372(1), V373(1), M374(2), L477(5), S478(1), ГЕМ(5)	1... ГЕМ 2... ГЕМ 3... ГЕМ ( $\pi$ - $\pi$ -стэкинг) 3...ГЕМ (Г-стэкинг)	2.09 (C)
III	N*...NH[M374] O*...OH[T310]	R115(1), F134(1), I133(5), F221(5), W224(8), E302(1), I305(2), A306(8), T310(5), V370(4), L372(1), M374(2), L477(2), S478(2), ГЕМ(1)	1...ГЕМ ( $\pi$ - $\pi$ -стэкинг) 2...F134 3...ГЕМ (Г-стэкинг)	1.87 (O)

Примечания: <sup>1</sup>Первыми указаны атомы молекулы лиганда (рис. 7), а вторыми – атомы аминокислотных остатков ароматазы (приведены в квадратных скобках в однобуквенном коде). <sup>2</sup>Аминокислотные остатки ароматазы, формирующие ван-дер-ваальсовы контакты с лигандами. В скобках указано число контактов. <sup>3</sup>Для солевых мостиков первыми приведены функциональные группы лигандов, а для  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействий – номера их  $\pi$ -сопряженных систем (рис. 7). <sup>4</sup>Длина координационной связи между атомами кислорода (соединения I и III) или углерода (соединение II) и атомом железа гема ароматазы. В скобках указан тип атома.

Таким образом, анализ межмолекулярных взаимодействий, реализующихся в структурных комплексах лигандов кластера 2 с ароматазой, позволяет предполагать, что образование этих надмолекулярных структур может сопровождаться эффективной блокадой элементов структуры активного центра CYP19A1, критических для проявления каталитической активности фермента. В пользу этого предположения свидетельствуют низкие значения энтальпии связывания, вычисленные по данным квантово-химических расчетов (табл. 6).

**Таблица 6.** Величины энергии межмолекулярных взаимодействий соединений кластера 2 с ароматазой ( $H_{\text{связывания}}$ ), вычисленные по данным квантово-химических расчетов

Лиганд	I	II	III
Энергия связывания, ккал/моль	–7.0	–6.9	–6.6

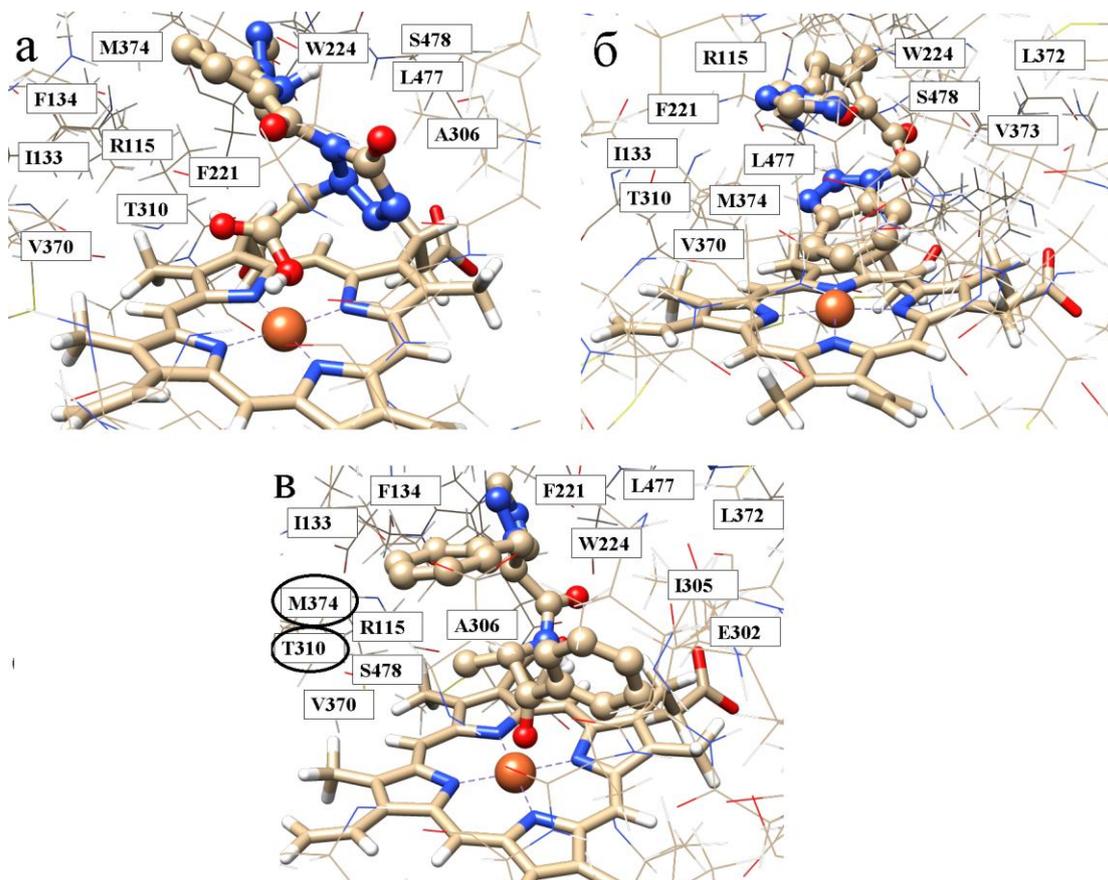


Рис. 8. Структурные комплексы соединений I (а), II (б) III (в) кластера 2 с ароматазой. Использованы такие же обозначения, как на рисунке 4.

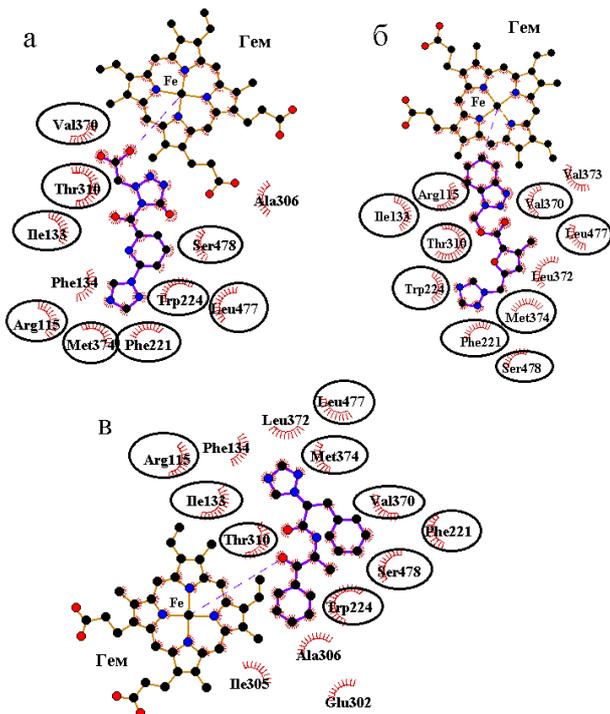


Рис. 9. Элементы структуры ароматазы, формирующие ван-дер-ваальсовы контакты с соединениями I (а), II (б), III (в) кластера 2. Использованы такие же обозначения, как на рисунке 5. Суммарное число ван-дер-ваальсовых контактов составляет: 39 (а), 30 (б), и 48 (в). Координационная связь показана пунктирной линией.

## 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 фермента. По данным квантово-химических расчетов, комплексы этих соединений с СYP19A1 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Macedo L.F., Sabnis G., Brodie A. Aromatase inhibitors and breast cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009. V. 1155. P. 162–173.
2. Ghosh D., Griswold J., Erman M., Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*. 2009. V. 457. № 7226. P. 219–223.
3. Hong Y., Chen S. Aromatase inhibitors: structural features and biochemical characterization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006. V. 1089. P. 237–251.
4. Dutta U., Pant K. Aromatase inhibitors: past, present and future in breast cancer therapy. *Med. Oncol.* 2008. V. 25. № 2. P. 113–124.
5. Ghosh D., Lo J., Egbuta C. Recent progress in the discovery of next generation inhibitors of aromatase from the structure–function perspective. *J. Med. Chem.* 2016. V. 59. P. 5131–5148.
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. *J. Chem. Inf. Model.* 2006. V. 46. № 3. P. 1301–1311.
7. Neves M.A., Dinis T.C., Colombo G., Sá e Melo M.L. Fast three dimensional pharmacophore virtual screening of new potent nonsteroid aromatase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. № 1. P. 143–150.
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. *Eur. J. Med. Chem.* 2009. V. 44. № 10. P. 4121–4127.
9. Ghosh D., Griswold J., Erman M., Pangborn W. X-ray structure of human aromatase reveals an androgen-specific active site. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 118. № 4–5. P. 197–202.
10. Roy P.P., Roy K. Molecular docking and QSAR studies of aromatase inhibitor androstenedione derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* 2010. V. 62. P. 1717–1728.
11. Ghosh D., Lo J., Morton D., Valette D., Xi J., Griswold J., Hubbell S., Egbuta C., Jiang W., An J., Davies H.M. Novel aromatase inhibitors by structure-guided design. *J. Med. Chem.* 2012. V. 55. P. 8464–8476.
12. Bonfield K., Amato E., Bankemper T., Agard H., Steller J., Keeler J.M., Roy D., McCallum A., Paula S., Ma L. Development of a new class of aromatase inhibitors: design, synthesis and inhibitory activity of 3-phenylchroman-4-one (isoflavanone) derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2012. V. 20. P. 2603–2613.
13. Xie H., Qiu K., Xie X. 3D QSAR studies, pharmacophore modeling and virtual screening on a series of steroidal aromatase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 15. P. 20927–20947.
14. Lee S., Barron M.G. Development of 3D-QSAR model for acetylcholinesterase inhibitors using a combination of fingerprint, molecular docking, and structure-based pharmacophore approaches. *Toxicol. Sci.* 2015. V. 148. P. 60–70.

15. Chen S., Hsieh J.H., Huang R., Sakamuru S., Hsin L.Y., Xia M., Shockley K.R., Auerbach S., Kanaya N., Lu H., Svoboda D., Witt K.L., Merrick B.A., Teng C.T., Tice R.R. Cell-based high-throughput screening for aromatase inhibitors in the Tox21 10K library. *Toxicol. Sci.* 2015. V. 147. P. 446–457.
16. Ghodsi R., Hemmateenejad B. QSAR study of diarylalkylimidazole and diarylalkyltriazole aromatase inhibitors. *Med. Chem. Res.* 2016. V. 25. P. 834–842.
17. Lee S., Barron M.G. A mechanism-based 3D-QSAR approach for classification and prediction of acetylcholinesterase inhibitory potency of organophosphate and carbamate analogs. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2016. V. 30. P. 347–36.
18. 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 quinine reductase 1. *Bioorganic Med. Chem. Letters.* 2017. V. 27. P. 5393–5399.
19. Mojaddami A., Sakhteman A., Fereidoonzezhad M., Faghieh Z., Najdian A., Khabnadideh 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. *Res. Pharm. Sci.* 2017. V. 12. № 1. P. 21–30.
20. Akram M., Waratchareeyakul W., Hauptenthal J., Hartmann R.W., Schuster D. Pharmacophore Modeling and *in Silico/in Vitro* Screening for Human Cytochrome P450 11B1 and Cytochrome P450 11B2 Inhibitors. *Front. Chem.* 2017. V. 5. P. 104. doi: [10.3389/fchem.2017.00104](https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00104)
21. Lee S., Barron M.G. 3D-QSAR study of steroidal and azaheterocyclic human aromatase inhibitors using quantitative profile of protein–ligand interactions. *J. Cheminform.* 2018. V. 10. P. 2.
22. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001. V. 40. № 11. P. 2004–2021.
23. 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. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. V. 46. № 1–3. P. 3–26.
24. Irwin J.J., Sterling T., Mysinger M.M., Bolstad E.S., Coleman R.G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* 2012. V. 52. № 7. P. 1757–1768.
25. Sander T., Freyss J., von Korff M., Rufener C. DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J. Chem. Inf. Model.* 2015. V. 55. № 2. P. 460–473.
26. Durrant J.D., McCammon J.A. AutoClickChem: Click chemistry in silico. *PLoS Comput. Biol.* 2012. V. 8. № 3. Article No. e1002397.
27. Wishart D.S., Knox C., Guo A.C., Shrivastava S., Hassanali M., Stothard P., Chang Z., Woolsey J. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34 (Database issue). P. D668–672.
28. Wishart D.S., Feunang Y.D., Guo A.C., Lo E.J., Marcu A., Grant J.R., Sajed T., Johnson D., Li C., Sayeeda Z., Assempour N., Iynkkaran I., Liu Y., Maciejewski A., Gale N., Wilson A., Chin L., Cummings R., Le D., Pon A., Knox C., Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2017. doi: [10.1093/nar/gkx1037](https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037)
29. Handoko S.D., Ouyang X., Su C.T.T., Kwoh C.K., Ong Y.S. QuickVina: Accelerating AutoDock Vina using gradient-based heuristics for global optimization. *TCBB.* 2012. V. 9. № 5. P. 1266–1272.
30. *Open Babel: The Open Source Chemistry Toolbox.* URL: [http://openbabel.org/wiki/Main\\_Page](http://openbabel.org/wiki/Main_Page) (дата обращения: 09.06.2018).

31. Rappe A.K., Casewit C.J., Colwell K.S., Goddard III W.A., Skiff W.M. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. № 25. P. 10024–10035.
32. *General Description of MORAC*. URL: <http://openmopac.net/manual> (дата обращения: 09.06.2018).
33. Durrant J.D., McCammon J.A. BINANA: A novel algorithm for ligand-binding characterization. *J. Mol. Graph. Model.* 2011. V. 29. P. 888–893.
34. McDonald I.K., Thornton J.M. Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J. Mol. Biol.* 1994. V. 238. P. 777–793.
35. Kao Y.C., Korzekwa K.R., Laughton C. A., Chen S. Evaluation of the mechanism of aromatase cytochrome P450. A site-directed mutagenesis study. *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. № 2. P. 243–251.
36. Christensen A.S., Kubař T., Cui Q., Elstner M. Semiempirical quantum mechanical methods for noncovalent interactions for chemical and biochemical applications. *Chem. Rev.* 2016. V. 116. № 9. P. 5301–5337.

Рукопись поступила в редакцию 22.05.2018.  
Дата опубликования 30.06.2018.