

**Я. В. ФАЛЕТРОВ, К. А. ФРОЛЕНКОВ, В. В. РЯБИКОВА,  
Н. С. ФРОЛОВА, Е. В. РУДАЯ, В. М. ШКУМАТОВ**

**ИССЛЕДОВАНИЕ 1-ФЕНИЛТЕТРАЗОЛОВ  
КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ  
ЦИТОХРОМОВ P450**

**ВВЕДЕНИЕ**

Цитохромы P450 являются ферментами класса монооксигеназ, содержащими нековалентно связанный гем, пятым лигандом Fe которого является тиолат-анион цистеина. В организме человека цитохромы P450 осуществляют ключевые реакции окислительного метаболизма ряда классов эндогенных (стероиды, ретиноиды, эйкозаноиды) и экзогенных (ксенобиотики, лекарства) веществ посредством реакций С-гидроксилирования, N-, S-, O-дезалкилирования, эпоксидирования и т. п. [1, 2]. Ингибирование определенных форм P450 лекарствами является основой их терапевтического или побочного действия. Селективные ингибиторы P450 используются и активно разрабатываются как противогрибковые, противораковые и другие лекарства [3–5]. Большинство лекарственных ингибиторов P450 содержат в своей структуре N-гетероциклические (имидазолильные, триазолильные, пиридинильные и т. д.) фрагменты, которые способны образовывать координационную связь N-атом цикла – Fe гема, что вносит значительный вклад в сродство таких соединений к активным центрам этих гемопротеидов. Важно отметить, что свойства N-гетероцикла как шестого лиганда Fe гема P450 значительно зависят от числа, расположения и характера заместителей и гетероатомов в нем вследствие влияния стерических факторов и перераспределения электронной плотности.

В данной работе проведена оценка взаимодействия некоторых 1Н-фенилтетразолов с цитохромами P450<sub>scs</sub> (CYP11A1) и P450<sub>c17</sub> (CYP17A1), катализирующими ключевые реакции биосинтеза стероидных гормонов. Полученные данные сравнены с параметрами для таких известных противогрибковых лекарственных веществ – ингибиторов P450, как кетоконазол и флуконазол.

**МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА**

В работе использовали: кетоконазол (1-(4-(4-((2R,4R)-2-((1H-имидазол-1-ил)метил)-2-(2,4-дихлорфенил)-1,3-диоксалан-4-илокси)фенил)-пиперазин-1-ил)этанон) и флуконазол (2-(2,4-дифторфенил)-1,3-ди(1H-

1,2,4-триазол-1-ил)пропан-2-ол), стероиды (прогестерон, 17 $\alpha$ -гидроксипрогестерон, прегненолон), бензотриазол (Sigma); компоненты питательной среды (Difco). Тетразолы V1 (1-фенил-1H-тетразол-5-амин) и V3 (1-(4-этоксифенил)-1H-тетразол) любезно предоставлены канд. хим. наук А. Н. Воробьевым, А1 (3-(1H-тетразол-1-ил)фенол) и А2 (1-(3-(бензилокси)фенил)-1H-тетразол) синтезированы по описанным методикам [6, 7].

Для сравнения распределения зарядов на гетероциклических фрагментах известных ингибиторов P450 и данных производных тетразола их структуры были построены и минимизированы методом MM2 силового поля с использованием пакета программ ChemOffice (CambridgeSoft). Заряды на атомах соединений получены с использованием программы HyperChem (Hypercube, Inc.) посредством ряда полуэмпирических методов (CNDO, INDO, MNDO и AM1 [8, 9]), адекватных для расчета электронной структуры производных N-гетероциклов. В процессе расчета структуры повторно минимизировались с использованием MM+ силового поля до значений градиента меньше 0,10.

Для компьютерного моделирования (докинга) построение, форматирование, минимизация энергии конформации и расстановка зарядов для докируемых структур исследуемых веществ были осуществлены с помощью программ AutodockTools (Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute), пакета программ ChemOffice (CambridgeSoft) и HyperChem (Hypercube, Inc.). В качестве мишеней использовали собственную модель P450c17, построенную на основе трехмерной структуры P450 1A2 (pdb id 2HI4) [7] и доступную он-лайн модель P450scs (pdb id 2asa) на основе структуры P450 2B4 [10]. Ригидный докинг был осуществлен посредством Autodock 4.0 в составе пакета AutoDockTools, как описано в [7], за исключением того, что заряды на структурах докируемых молекул были рассчитаны методом CNDO.

Для спектрофотометрического титрования цитохрома P450scs использовали растворы противогрибковых азолов, бензотриазола, тетразолов и прегненолона с начальной концентрацией 20 мМ. Все спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре UV1202 (Shimadzu). Препарат цитохрома P450scs выделяли из надпочечников крупного рогатого скота согласно [11]. Титрование проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см, начальный объем пробы 2 см<sup>3</sup>, концентрация P450scs 0,5–0,7 мкМ, температура 25 °С. Аликвоты титранта добавляли к пробе микропипеткой до достижения конечных концентраций 20–160 мкМ, перемешивали, инкубировали в течение 2 мин., затем регистрировали спектральные изменения в диапазоне 360–

450 нм. Значения спектрофотометрических констант диссоциации ( $K_d$ ) рассчитывали согласно [12] при помощи Origin 7.0 (Origin Corp.).

В работе использовали трансгенный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/YEp5117 $\alpha$ , экспрессирующий зрелую форму P450c17 из коры надпочечников быка под контролем промотора GAL10 (индукция галактозой). Клетки *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 $\alpha$ , наработанные как описано в [13], ресуспендировали в среде YPD до достижения  $A_{600}$  8–10 (0,1 оптической единицы соответствует  $10^6$  клеток). Далее добавляли растворы одного из исследуемых азолов до концентрации 25–100 мкМ и инкубировали в термостатируемом шейкере УВТМ 12-250 (Элион, Россия) в течение 0,5 ч. После этого добавляли этанольный раствор прогестерона до концентрации 50 мкМ. Пробы анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии согласно [7, 13].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе [14] показано, что рассчитанная величина заряда N-атома может являться критерием оценки энергии координационной связи гетероцикла с Fe гема P450. Рассчитанные рядом полуэмпирических методов величины зарядов на соответствующих N-атомах однотипных производных различных N-гетероциклов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Рассчитанные заряды на атомах азота N-гетероциклов

Гетероциклический фрагмент	Метод расчета			
	CNDO	INDO	MNDO	AM1
1,2,4-триазол-1-ил (флуконазол)	-0,200	-0,249	-0,250	-0,154
5-амино-тетразол-1-ил (V1)	-0,195	-0,237	-0,191	-0,153
1-имидазолил (кетокконазол)	-0,192	-0,236	-0,230	-0,135
Пиридин-4-ил	-0,155	-0,197	-0,225	-0,136
Тетразол-1-ил (A1, A2, V3)	-0,137	-0,164	-0,165	-0,108
Пиридин-3-ил	-0,136	-0,184	-0,234	-0,138
1,2,4-триазол-4-ил	-0,123	-0,148	-0,130	-0,082

Рассчитанные величины зарядов и данные литературы [5, 14] указывают на наличие способности у тетразол-1-ильной группы выступать в качестве лиганда Fe гема P450, хотя и характеризуют ее как относительно слабую по сравнению с таковой для большинства N-гетероциклов, являющихся фармакофорами большинства достоверных ингибиторов P450. Следует отметить, что введение дополнительной 5-NH<sub>2</sub>-группы приводит к увеличению заряда на соответствующем N-атоме тетразола до величин

ны, характерной для гетероциклов – фармакофоров сильных ингибиторов P450. Однако при сравнении этих тетразольных циклов как лигандов Fe гема P450 следует учитывать стерические препятствия со стороны 5-NH<sub>2</sub>-группы.

Полученные в результате компьютерного докинга модели фермент-лигандных комплексов показали, что исследованные тетразолы способны локализоваться в активных центрах цитохромов P450c17 и P450scс. При этом их тетразольные циклы располагаются в непосредственной близости к гемовым группам (среднее расстояние < 4 Å) и 5-NH<sub>2</sub>-группа тетразола V1 не создает значительных препятствий для этого (рис. 1, а).

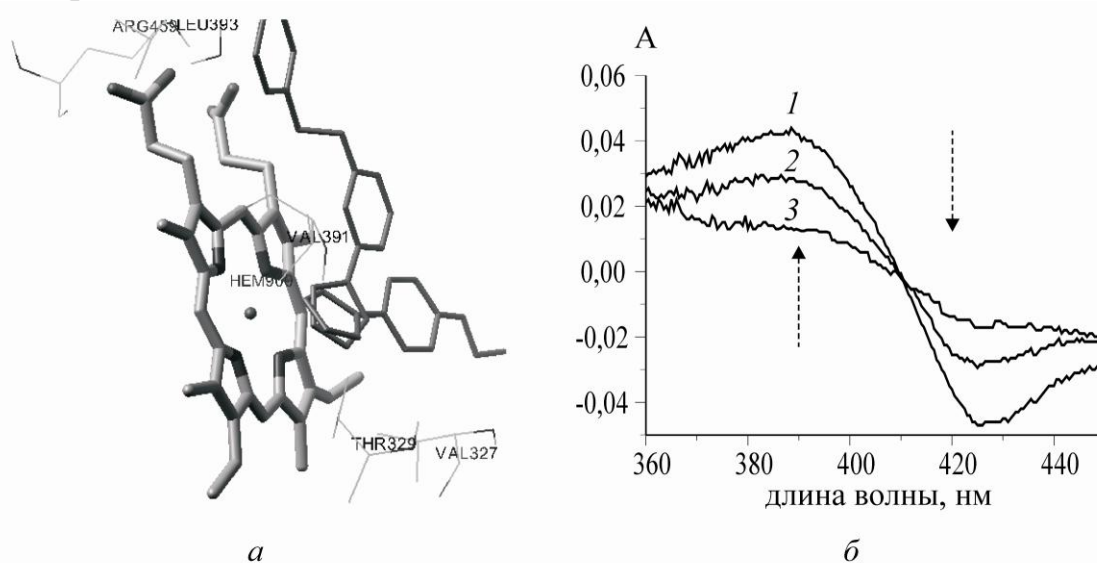


Рис. 1. Взаимодействие исследованных азолов с цитохромом P450scс:  
 а - модели локализации тетразолов А2 и V1 в активном центре P450scс;  
 б - спектральный отклик при взаимодействии препарата P450scс с тремя исследуемыми азолами (С = 160 мкМ);  
 1 – кетоконазол; 2 – флуконазол; 3 – тетразол А2

Более низкие значения расчетных констант диссоциации ( $K_d$ ) модельных комплексов А2 по сравнению с А1 указывают на дополнительное сильное взаимодействие его бензильного заместителя с остатками липофильных аминокислот в активных центрах P450c17 и P450scс (табл. 2). Эти результаты согласуются с данными о кооперативном участии гетероцикла и остального остова молекулы в указанных выше взаимодействиях [3–5, 12]. Также важно отметить, что значения рассчитанной константы диссоциации для А2 и для прегненолона в случае модели P450c17 были одинаковыми (2 мкМ), а в случае P450scс – только в 2,3 раза меньше (14 и 6 мкМ соответственно). Эти данные служат предпосылкой хорошего взаимодействия тетразола А2 с P450c17 и P450scс, наряду со способностью этого тетразола принимать конформацию, при ко-

торой расположение его бензольных циклов близко конфигурации циклов D и A стероидного ядра [7].

Таблица 2

**Значения  $K_d$  и величины спектральных ответов ( $\Delta A$ ), полученные при титровании P450scs**

Вещество	$\Delta A$ (160 мкМ), о.е. $\times 10^3$	$\Delta A$ (20 мкМ), о.е. $\times 10^3$	$K_d$ , мкМ
Кетоконазол	78	20	6
Прегненолон	60	42	9
Флуконазол	53	30	18
Бензотриазол	26	13	35
A2	25	11	40
V3	25	10	46
V1	8	4	> 160

При титровании препарата цитохрома P450scs растворами противогрибковых азолов (кетоконазол, флуконазол) и прегненолона наблюдался II тип спектральных изменений ( $\Delta A_{420} - A_{390 \text{ нм}}$ ), что согласуется с их ролями как ингибиторов и продукта реакции P450scs [11]. Тетразолы A1, A2 и V3 также вызывали II тип спектральных изменений, что свидетельствует об их способности связываться в активном центре P450scs и возможном образовании координационной связи «Fe гема – N-атом тетразола» (табл. 2, рис. 1, б). Важно отметить, что 5-амино-1-фенилтеразол V1 практически не вызывал характеристических спектральных изменений при взаимодействии с препаратом P450scs в условиях эксперимента. Этот факт не согласуется с большей расчетной величиной заряда на соответствующих N-атомах 5-амино-тетразол-1-ильного и тетразол-1-ильного гетероциклов. Вероятной причиной такого несоответствия являются стереохимия активного центра P450scs и/или уменьшение общей липофильности соединения за счет дополнительной аминогруппы. Последнее подтверждается результатами докинга для A1 и его более липофильного производного A2 [7]. Согласно величинам  $K_d$  и спектральных ответов сродство тетразолов A2 и V3 примерно в 5 раз меньше, чем в случае противогрибковых азолов и прегненолона, что характеризует их как относительно слабые лиганды P450scs.

Перспективным направлением для исследования потенциальных ингибиторов P450 млекопитающих является использование трансгенных микроорганизмов, экспрессирующих данные P450 [15, 16]. Дрожжи *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 $\alpha$  были охарактеризованы как модельная тест-система для исследования влияния соединений на активность P450c17 по отношению к прогестерону [12]. Согласно полученным

результатам степени превращения прогестерона *S. cerevisiae* GRF18/Уер5117 $\alpha$  за 1,5 ч биотрансформации в контрольном образце и при добавлении в культивационную среду тетразолов А2, V1 и кетоконазола составили 72, 53, 57 и 49 % соответственно. Это свидетельствует о способности указанных соединений ингибировать активность Р450с17 в составе данных трансгенных клеток, хотя не исключает подавления данной активности по другому механизму.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты квантово-химических расчетов свидетельствуют о потенциальной способности N-атома в положении 3 1H-тетразол-1-ильной группы образовывать координационные связи с Fe гема Р450 и об увеличении таковой в случае наличия дополнительной NH<sub>2</sub>-группы в положении 5. Результаты докинга указывают на принципиальную возможность локализации молекул исследованных тетразолов в активных центрах цитохромов Р450с17 и Р450ссс. Это подтверждается данными, полученными в опытах по спектрофотометрическому титрованию цитохрома Р450ссс и ингибированию 17 $\alpha$ -гидроксилирования прогестерона цитохромом Р450с17 в составе трансгенного штамма дрожжей исследуемыми соединениями. Однако, сопоставление полученных результатов для известных лекарств класса ингибиторов Р450 (кетоконазол, флуконазол) и исследованных тетразолов свидетельствует об относительно низкой эффективности последних и необходимости дальнейшего разработки и оптимизации структур потенциальных ингибиторов Р450 на основе 1H-тетразолов и их 5-амино-производных.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Guengerich F. P.* // Chem. Res. Toxicol. 2001. Vol. 14, № 6. P. 611–650.
2. *Hlavica P.* // Eur. J. Biochem. 2004. Vol. 271, № 22. P. 4335–4360.
3. *Brunoa R. D., Njar V. C. O.* // Bioorg. Med. Chem. 2007. Vol. 15, № 15. P. 5047–5060.
4. *Hakki T., Bernhardt R.* // Pharmacol. Therapeut. 2006. Vol. 111, № 1. P. 27–52.
5. *Baston E., Leroux F. R.* // Recent Pat. on Anti-Cancer Drug Discov. 2007. Vol. 2, № 1. P. 31–58.
6. *Войтехович С. В., Воробьев А. Н., Гапоник П. Н.* и др. // Хим. гетероцикл. соедин. 2005. № 8. С. 1174–1179.
7. *Фроленков К. А., Фролова Н. С., Рудая Е. В.* и др. // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. 2008. Т. 7. С. 41–44.
8. *Зацепина Н. Н.* // Хим. гетероцикл. соедин. 1997. № 9. С. 1192–1195.
9. *Ivashkevich O. A., Gaponik P. N., Koren A.* et al. // Int. J. Quantum Chem. 2004. Vol. 43, № 6. P. 813–826.
10. *Sivozhelezov V., Nicolini C.* // J. Theor. Biol. 2005. Vol. 234, № 4. P. 479–85.

11. *Shkumatov V. M., Usanov S. A., Chashchin V. L.* // *Pharmazie*. 1985. Vol. 10, № 11. P. 757–773.
12. *Locuson C. W., Hutzler J. M., Tracy T. S.* // *Drug Metab. Dispos.* 2007. Vol. 35, № 4. P. 614–622.
13. *Шкуматов В. М., Усова Е. В., Фролова Н. С. и др.* // *Биомед. хим.* 2006. Т. 3, № 52. С. 298–308.
14. *Zhuang Y., Wachall, B. G., Hartmann R. W.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2000. Vol. 8, № 6. P. 1245–1252.
15. *Ehmer P. B, Bureik M., Bernhardt R. et al.* // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2002. Vol. 81. P. 173–179.
16. *Drăgan C. A., Hartmann R. W., Bureik M.* // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2006. Vol. 21, № 5. P. 547–556.