

УДК 547.9:615.281.873

Исследование сродства альдонамидов к рецепторам KASA в контексте разработки противотуберкулезных препаратов

Лахвич Ф. Ф., Борова М. И.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Для соответствующих пентозам и гексозам альдонамидов и их amino-аналогов установлена *in silico* зависимость строения — биологическая активность (влияние природы функциональной группы и относительной конфигурации). Так, длина углеродного скелета, относительная конфигурация всех стереогенных центров и природа терминальной группы влияют на сродство лиганда с рецептором. Наибольшие энергии связывания были выявлены для альтронамидов и глюконамидов (например, значения $\Delta G = -10,93$ для N-третбутил-L-альтронамида; $\Delta G = -11,48$ для N-бензил-L-альтронамида). Предполагаемый фармакофор содержит шестиуглеродный скелет с L-альтро- или D-глюко- конфигурацией скелета, с терминальной гидрофобной N-бензил- или N-бензиламидной группой, а также аминогруппой у 4 атома углерода для альтро-конфигурации.

Ключевые слова: альдонамиды, докинг, зависимость строения — активность, миколовые кислоты.

Введение. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения туберкулез в настоящее время входит в список топ-10 причин смертности во всем мире. В 2019 г. было зафиксировано около 10 млн людей, заболевших туберкулезом. В рейтинге причин смертности от одного инфекционного агента туберкулез опережает ВИЧ/СПИД [1]. Предположительно четверть населения планеты инфицированы возбудителем туберкулеза *M. tuberculosis*. Вследствие высокой естественной резистентности к данному возбудителю, риск развития туберкулеза после инфицирования составляет около 5–10 %.

До 2020 г. наблюдалась тенденция к небольшому ежегодному снижению количества заболевших туберкулезом. Однако пандемия COVID-19 может привести к тому, что количество заболевших туберкулезом может резко возрасти. Моделирование показало, что в период 2020–2025 гг. число людей, заболевших туберкулезом, может увеличиваться более чем на 1 млн в год [1]. Так как туберкулез — это социальное заболевание, то безработица и потеря дохода из-за пандемии способствуют увеличению количества людей, заболевших туберкулезом. Кроме того, из-за перераспределения ресурсов для борьбы с COVID-19 сейчас, например, аппараты GeneXpert, ранее применяемые для диагностики туберкулеза, применяются для диагностики COVID-19 [1], многие страны перераспределяют бюджет в пользу борьбы с COVID-19. Значительное число стран вообще сообщили о сокращении числа медицинских учреждений, оказывающих стационарную и амбулаторную помощь для людей больных туберкулезом.

Из-за неправильно назначенного лечения возможно возникновение мутаций в геноме *M. tuberculosis*, приводящих к возникновению резистентности к противотуберкулезным лекарственным средствам. Уже к 2019 г. почти у полумиллиона человек развился устойчивый к Рифампицину (лекарственное средство первой линии) туберкулез (РР–ТБ), из которых 78 % имели туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ–ТБ) [1]. Множественная лекарственная устойчивость представляет собой резистентность к Рифампицину и Изониазиду. Более 50 % случаев туберкулеза в странах бывшего Советского Союза представляет собой именно МЛУ–ТБ [2]. Множественная лекарственная устойчивость приводит к возникновению широкой лекарственной устойчивости, когда возбудитель заболевания устойчив к лекарственным средствам 2-й линии. Кроме того, появляются новые штаммы *M. tuberculosis*, которые имеют резистентность ко всем известным противотуберкулезным лекарственным средствам. Устойчивость микобактерий во многом обусловлена миколовыми кислотами в составе их клеточной стенки. Из-за многочисленных мутаций в геноме бактерии стали невосприимчивы к действию противотуберкулезных средств [2]. В связи с резистентностью *M. tuberculosis* к традиционным лекарственным средствам (ЛС) поиск новых противотуберкулезных



ЛС среди представителей других классов соединений с отличными от традиционных ЛС механизмами противомикробного действия может повысить выживаемость и качество жизни пациентов больных туберкулезом [3], и, следовательно, является актуальным и практическим значимым. При этом синтез и исследование биологической активности в клинике и на культурах клеток является сложным и дорогостоящим процессом. Для уменьшения временных, материальных и финансовых затрат параллельно с основными исследованиями целесообразно проводить моделирование с помощью компьютерных программ молекулярного докинга для скрининга большого массива «претендентов» для целевого синтеза и дальнейших биологических и клинических испытаний [4].

Ранее нами было показано в исследовании *in silico* [5], что производные гидроксиизонипекотиновых кислот с транс-диаксиальным расположением гидроксильных групп проявляют выраженную биологическую активность по отношению к нативным и мимическим структурам рецептора МТВ-KasA (*M. tuberculosis* β -ketoacyl-ACP synthase A) [6]; при этом зависимость влияния заместителей на активность была аналогичной исследованиям *in vitro* по отношению к *M. tuberculosis*. Выявление схожей зависимости как *in vitro*, так и *in silico*, дает перспективу использования данной модели в исследованиях только *in silico* для поиска структур-кандидатов для дальнейших стадий рационального драг-дизайна. Выбранные «претенденты» являются перспективными кандидатами для синтеза и изучения биологической активности *in vitro* и *in vivo*.

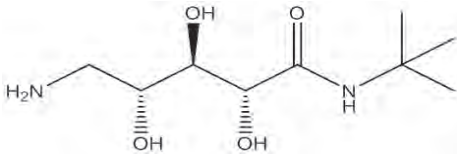
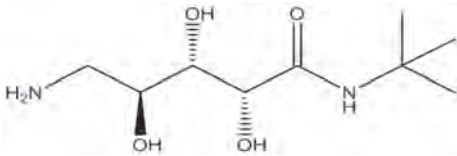
Цель работы — изучение афинности *in silico* ингибиторов синтеза миколовых кислот на основе производных моносахаридов — альдонамидов, которые имеют все возможные конфигурации стереогенных центров и функционально являются ациклическими аналогами дигидрокси- и аминогидроксиизонипекотиновых кислот.

Материалы и методы. Дизайн структур выполнен с помощью ресурса ChemOffice. В качестве рецептора был выбран фермент МТВ-KasA (*M. tuberculosis* β -ketoacyl-ACP synthase A) — код белка 2WGF в банке данных 3D-структур белков и нуклеиновых кислот Protein Data Bank. Молекулярный докинг *in silico* осуществлен с помощью программы Dockingserver [7] с использованием полуэмпирического метода расчетов квантовой химии PM6, метода геометрической оптимизации MMFF94 и метода расчета заряда Gasteiger при значении pH 7,0. Для каждого лиганда было проведено 100 пробегов.

Результаты и их обсуждение. При изучении *in silico* зависимости строения (структура и стереохимия) — биологическая активность мы установили влияние относительной конфигурации стереогенных центров, длины углеводородного скелета, положении аминогруппы, природы концевой амидной, N-трет-бутиламидной и N-бензиламидной групп на эффективность связывания с рецептором.

Была проанализирована зависимость структура-активность от относительной конфигурации стереогенных центров. В качестве лигандов выступали структуры с различной относительной конфигурации на основе пятиуглеродного скелета с терминальными первичной аминогруппой и N-третбутиламидной группой (таблица 1).

Таблица 1 — Зависимость структура-активность лигандов-лидеров среди пентоз *in silico*

№	Лиганд	Свободная энергия связывания	Константа ингибирования
I	D-Rib 	–9,26 ккал/моль	164,21 nM
II	L-Ara 	–9,02 ккал/моль	243,56 nM

Наибольшую энергию связывания с рецептором показали структуры с D-рибо (–9,26 ккал/моль) и L-арабино (–9,02 ккал/моль) конфигурацией.

Далее было исследовано влияние длины углеводородного скелета и положения аминогруппы на эффективность связывания с рецептором. Были выбраны структуры с D-рибо, L-арабино, а также

D-алло- и L-альтро-конфигурацией (как шестиуглеродные аналоги указанных пентоз), аминогруппой у C2,3,4,5,6 и концевой N-третбуламидной группой (таблицы 2, 3). Наибольшую энергию связывания показал лиганд с шестиуглеродным скелетом, L-альтро-конфигурацией и аминогруппой у 4 атома углерода.

Таблица 2 — Зависимость структура-активность лигандов пентоз *in silico*

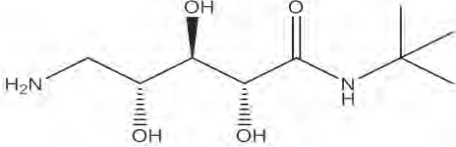
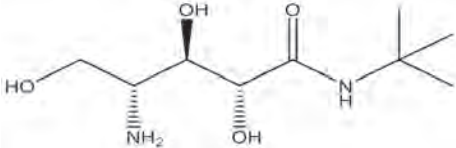
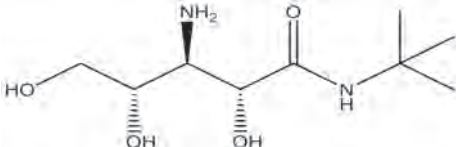
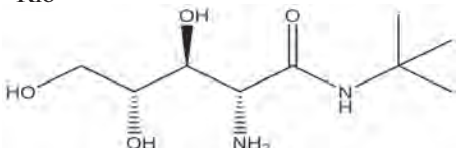
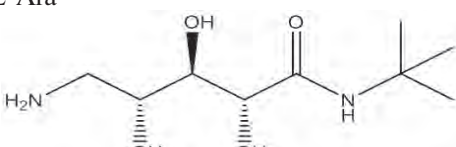
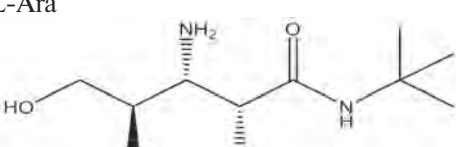
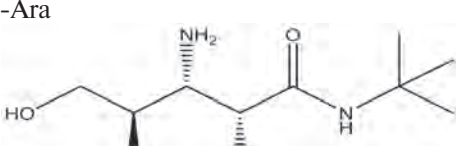
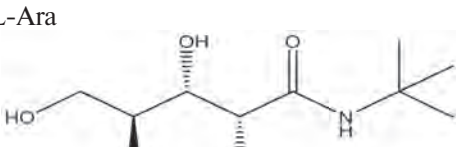
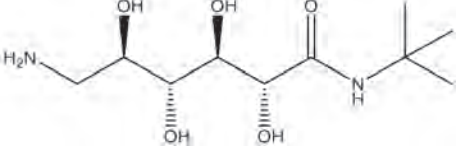
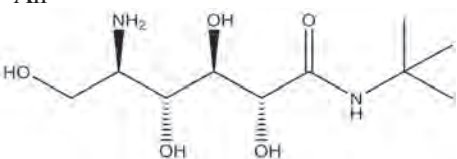
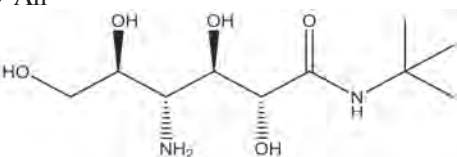
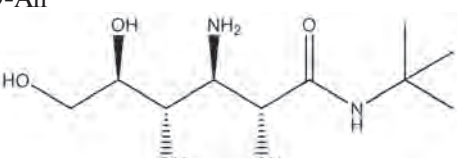
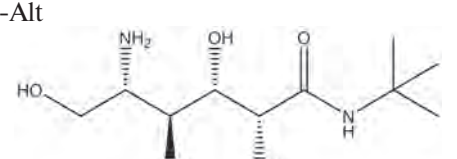
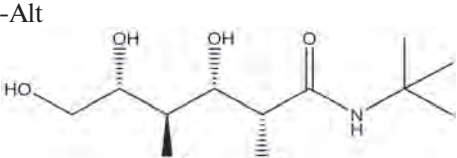
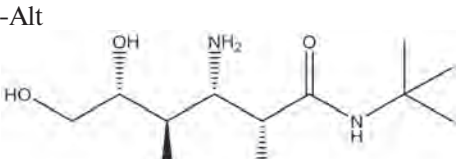
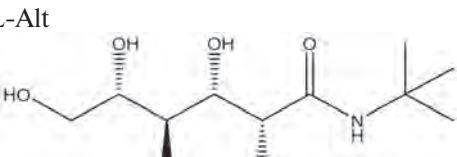
№	Лиганд	Свободная энергия связывания	Константа ингибирования
I	D-Rib 	-9,26 ккал/моль	164,21 nM
III	D-Rib 	-10,07 ккал/моль	41,29 nM
IV	D-Rib 	-10,23 ккал/моль	31,48 nM
V	D-Rib 	-9,60 ккал/моль	92,21 nM
II	L-Ara 	-9,02 ккал/моль	243,56 nM
VI	L-Ara 	-8,84 ккал/моль	332,03 nM
VII	L-Ara 	-10,06 ккал/моль	42,43 nM
VIII	L-Ara 	-8,43 ккал/моль	666,48 nM

Таблица 3 — Зависимость структура-активность лигандов гексоз *in silico*

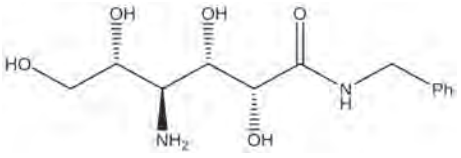
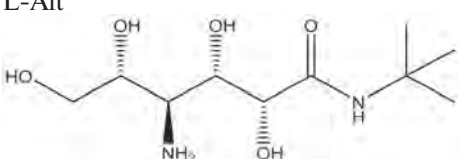
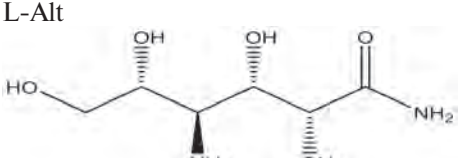
№	Лиганд	Свободная энергия связывания	Константа ингибирования
IX	D-Alt 	-7,04 ккал/моль	1,57 μ M
X	D-Alt 	-9,77 ккал/моль	69,00 nM
XI	D-Alt 	-10,14 ккал/моль	36,75 nM
XIII	D-Alt 	-10,57 ккал/моль	17,76 nM
XIV	L-Alt 	-8,98 ккал/моль	263,21 nM
XV	L-Alt 	-10,93 ккал/моль	9,75 nM
XVI	L-Alt 	-9,69 ккал/моль	78,62 nM
XVII	L-Alt 	-9,54 ккал/моль	101,23 nM

Так как было установлено, что большую энергию связывания показывают лиганды с аминогруппой у C4 и шестиглеродным скелетом, то был проведен докинг производных гексоз со всеми относительными конфигурациями стереогенных центров и аминогруппой у 4 атома углерода. Лидером

оказался лиганд XV — структура с L-альтро-конфигурацией (–10,93 ккал/моль). Таким образом была доказана данная относительная конфигурация как наиболее эффективная для связывания с белком-рецептором.

Также было изучено влияние природы терминальной амидной группы на аффинность к рецептору. В качестве лигандов выступили структуры с L-альтро-конфигурацией, аминогруппой у C4 и концевой амидной, N-трет-бутиламидной и N-бензиламидной группами (таблица 4). Лидерами оказались лиганды с концевой N-бензиламидной (–11,48 ккал/моль) и N-трет-бутиламидной группами.

Таблица 4 — Зависимость структура-активность структур концевыми N-бензиламидной, N-трет-бутиламидной и амидной группами *in silico*

№	Лиганд	Свободная энергия связывания	Константа ингибирования
XVIII	L-Alt 	–11,48 ккал/моль	3,82 nM
XV	L-Alt 	–10,93 ккал/моль	9,75 nM
XIX	L-Alt 	–9,17 ккал/моль	189,67 nM

Введение аминогруппы у C4 представляет определенную синтетическую проблему, поэтому был дополнительно проведен докинг лигандов с L-альтро-, D-алло- и D-глюко (самый доступный субстрат для синтеза) конфигурациями, не содержащих аминогрупп. Лидером среди данных структур оказался лиганд с D-глюко-конфигурацией и N-бензиламидной терминальной группой.

На основании полученных данных был предложен фармакофор (рисунок).

Как видно из рисунка, гликоновый скелет фармакофора имеет L-альтро- или D-глюко-конфигурацию, функциональность обеспечена наличием N-трет-бутил- или N-бензиламидной групп, а при C4 гидроксильная группа может быть заменена на аминогруппу.

Заключение. В результате исследования проведен молекулярный дизайн ациклических производных моносахаридов, способных образовывать конформации, изостеричные биологически активным производным изонипекотиновых кислот. Установлено, что аффинность изученных альдонамидов к энзиму MTB-KasA (*M. tuberculosis* β -ketoacyl-ACP synthase A; код белка 2WGF в банке данных 3D структур белков и нуклеиновых кислот Protein Data Bank) зависит от относительной конфигурации стереогенных центров углеводного скелета и функциональности терминальных групп.

Среди производных гексоз с аминогруппой соединениями-лидерами являются лиганды с L-альтро-конфигурацией, аминогруппой у 4 атома углерода и концевой N-трет-бутил или N-бензиламидной группой. Среди производных гексоз без ами-

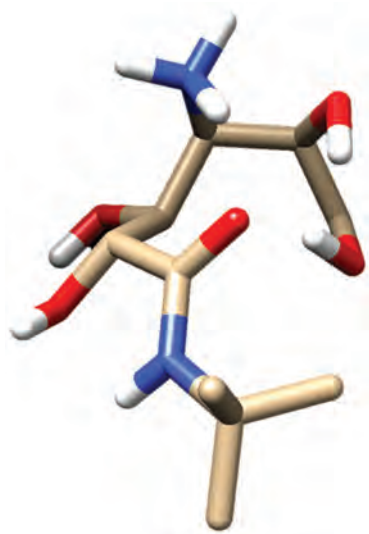


Рисунок — Модель фармакофора

ногруппы лидером является лиганд с D-глюко-конфигурацией и концевой N-бензиламидной группой. Фармакофор включает следующие структурные фрагменты:

- 1) гликановая основа: L-альтро- или D-глюко-конфигурации;
- 2) наличие N-трет-бутил- или N-бензиламидной групп;
- 3) возможна замена гидроксила при C4 на аминогруппу.

Полученные результаты подтверждают наше предположение, что альдонамиды являются перспективными кандидатами для рационального драг-дизайна потенциальных ЛС против туберкулеза.

Литература

1. Global tuberculosis report 2020 [Electronic resource] / World Health Organization. — Mode of access: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. — Date of access: 10.05.2021.
2. Степаншин, Ю. Г. Молекулярные механизмы устойчивости Mycobacterium tuberculosis к лекарственным препаратам/ Ю. Г. Степаншин, В. Н. Степаншина, И. Г. Шемякин // Антибиотики и химиотерапия. — 1999. — № 4. — С. 39–43.
3. Multitarget Drug Discovery for Tuberculosis and Other Infectious Diseases. / K. Li [et al.] // J. Med. Chem. — 2014. — Vol. 57. — P. 3126–3139.
4. Kitchen, D. B. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications / D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr, J. Bajorath // Nature. Reviews. Drug. Discovery. — 2004. — Vol. 3, №11. — P. 935–949.
5. Лахвич, Ф. Ф. Рациональный дизайн модели ациклических аналогов гидроксиизонипекотиновых кислот/ Ф. Ф. Лахвич, П. Ю. Зущик, А. Ф. Лахвич // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: рец. сб. науч. тр. — 2019. — № 9. — С. 389–399.
6. Crystal structures of Mycobacterium tuberculosis KasA show mode of action within cell wall biosynthesis and its inhibition by thiolactomycin / S. R. Luckner [et al.] // Structure. — 2009. — Vol.17, №7. — P. 1004–1013
7. Docking Server [Electronic resource] / Docking Server, 2006. — Mode of access: <https://www.dockingserver.com/web>. — Date of access: 10.05.2021.

Sar studies on KasA: aldonamide-receptor affinity in context of tb drug design

Lakhvich T. T., Borava M. I.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The series of more than 50 open-chain aldonamides in context of the influence of their relative configuration and functionality on affinity to KasA receptor have been studied. The receptor choice (2WGF Transferase: chain A) is based on the comparison of SAR obtained both *in silico* and *in vitro* experiments for free-hydroxy and acylated isonipecotamides synthesized previously. To design open-chain derivatives we have chosen monose derivatives which are structurally and functionally isosteric to isonipecotamides and possessing all possible relative configurations. Structure design includes monose skeleton modification by introduction of the substituted amide and amino groups (both transformations are available from the classical sugar chemistry). The *in silico* study was carried out by using the semi-empirical PM6 and the MMFF94 geometric optimization techniques for pH=7. To find the energetically optimal conformations for labile open-chain aldonamides we have proceeded every docking for at least 100 runs. L-altro- and D-gluco- configuration-based derivatives showed the highest affinity to receptor. After variation of substituents in amide fragment and replacement of hydroxyl with amino group we have found the highest affinity for N-tert-butyl L-4-deoxy-4-aminoaltrosamide (–10.93 kcal / mol) and N-benzyl D-gluconamide (–11.48 kcal / mol). The SAR analysis showed these structures form conformations with the maximum number and the optimal geometry of intramolecular hydrogen bonds, as well as hydrophobic interactions. The latter can be discussed in terms of multiple interactions between N-alkyl substituted amide group and protein hydrophobic side chains (Pro and Ile in protein studied). Based on the data obtained, a pharmacophore was proposed with the L-altro- or D-gluco- configuration, bulky hydrophobic N-substituted amide group and possible amino group at 4th C-Carbon.

Keywords: aldonamides, docking; SAR; mycolic acids.

Поступила 22.06.2021

