

## 1. はじめに

これまで定量的構造活性相関(QSAR)は、医薬品への情報・計算法的アプローチとして有用な手段であることが種々の解析例を通して実証されてきた。しかしながら同時に、traditional QSARにおいて生体はブラックボックス的存在として扱われることが少なくなかったのも事実である。近年、薬物標的分子となる受容体の同定、さらにはその3次元構造の解析が進むにつれて、薬物-受容体複合体の3次元構造特性を全体として考慮する、すなわち薬物-受容体相互作用を考慮に入れた Structure Based 3D QSAR が確立されつつある。本研究では、HIV-1 protease(HIV-1PR)と cyclic urea inhibitor(CUI)の相互作用を解析対象とし、以下の2グループの化合物セットに対して複合体の全電子分子軌道計算を適用し、traditional QSAR の Structure Based 3D QSAR による検証を試みた。

Mixed series:骨格が変化に富む diversity の大きい CUI セット 13 化合物(表 1)に対し、阻害活性<sup>1-4)</sup>との関係について、virtual screening における scoring function の評価項として用いられている相互作用エネルギー、接触表面積( $ASA, \text{\AA}^2$ )による解析を行った。

Congeneric series(同族体):共通骨格を有する mixed series とは異なるセット 12 化合物(表 2)に対し、まずは Rajni Garg らの報告<sup>6)</sup>にしたがい、traditional QSAR による解析を行なった。さらに薬物-受容体相互作用の観点から新たな解析式を設定し、より詳細な議論および両者の比較と検討を行った。

## 2. 方法

## 2-1. MM・MD による構造最適化

CUI として代表的化合物である DMP323 は、HIV-1PR との複合体での X 線結晶解析構造(図 1)が既知である(PDB code:1QBS)。そこでまず 1QBS を用いて、各 HIV-1PR/CUI の複合体モデルが DMP323 を鋳型とし作られた。構造可変部位 P2/P2'および置換基-X については、HIV-1PR 中でこの部位のみを対象とした構造最適化を行った。ただし、mixed series セット中に含まれる 6 員環化

合物(表 1. 化合物 11~13)に関しては SPARTAN04 による配座解析(AM1)、その後得られた構造の Gaussian98 による構造最適化(HF/3-21G\*)、最終的に DMP323 との重なり  $rmsd$  値および共通体積を考慮し配座を選定した。

次に各複合体に対し均質な条件で分子力学計算(MM)・分子動力学計算(MD)を行った<sup>5)</sup>。この際 HIV-1PR の主鎖部位の原子は固定した。なおメタ(3-)位に置換基を持つ化合物に関しては、置換基が取り得る全ての組み合わせについて最適化計算を行い、MM による立体エネルギーが最小の配座を以降の解析に用いた。

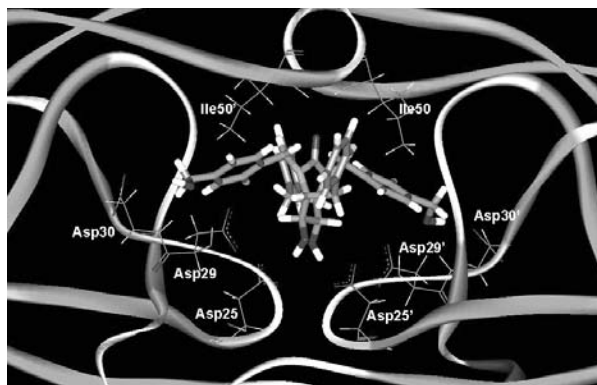


図 1. HIV-1 PR/DMP323 複合体の X 線結晶構造

## 2-2. MO による相互作用エネルギー計算

MD/MM 計算後の各複合体の最終構造を用いて、分子軌道法(MO)を適用した相互作用エネルギー  $\Delta E_{MO}$  (kcal/mol)の算出を行った。この MO 計算には LocalSCF を使用し AM1 による single point calculation を行った。

## 2-3. 説明変数および目的変数

## 2-3-1. Mixed series について

設定した解析式と用いた説明変数および目的変数の定義を以下に示す。

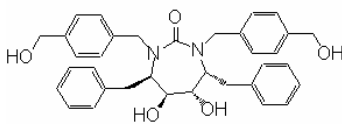
$$\Delta G^{\text{obs}} = a \Delta E_{MO} + b \Delta ASA + \text{const} \quad (1)$$

$$\Delta G^{\text{obs}} = RT \ln K_i$$

$$\Delta E_{MO} = E_{(\text{complex})} - (E_{(\text{protein})} + E_{(\text{ligand})})$$

$$\Delta ASA = ASA_{(\text{complex})} - (ASA_{(\text{protein})} + ASA_{(\text{ligand})})$$

表1. Mixed series



$K_i = 0.26 \text{ (nM)}$   
 $\Delta G^{\text{obs}} = -13.24 \text{ (kcal/mol)}$

**1 (DMP323)**

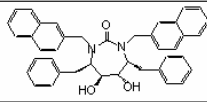
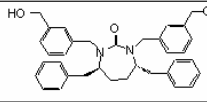
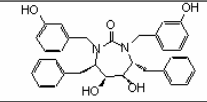
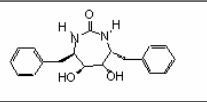
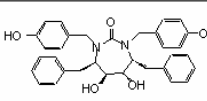
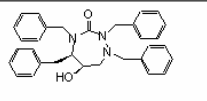
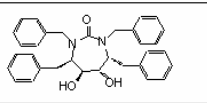
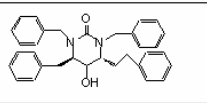
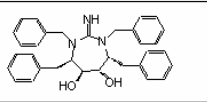
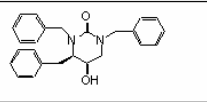
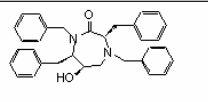
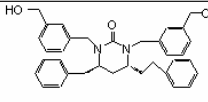
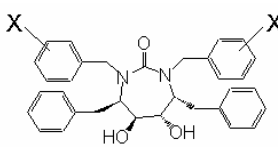
Cmpd.	Structure	$K_i$ (nM)	$\Delta G^{\text{obs}}$ (kcal/mol)	Cmpd.	Structure	$K_i$ (nM)	$\Delta G^{\text{obs}}$ (kcal/mol)
<b>2</b>		0.31	-13.14	<b>8</b>		170	-9.35
<b>3</b>		0.12	-13.71	<b>9</b>		267	-9.08
<b>4</b>		0.12	-13.71	<b>10</b>		8.7	-11.14
<b>5</b>		3.6	-11.67	<b>11</b>		151	-10.81
<b>6</b>		220	-9.20	<b>12</b>		2500	-7.74
<b>7</b>		180	-9.32	<b>13</b>		99	-9.68

表2. Congeneric series



Cmpd.	-X	$pK_i$	$\sigma$	Clog $P$	$\Delta q(O)^{\text{free2-complex}}$	$L_{\text{para}}$	$I_{\text{HB}}$
<b>1</b>	H	8.52	0.00	7.24	0.0958	0	0
<b>2</b>	3-NH <sub>2</sub> (mozenavir)	9.55	-0.16	4.78	0.0961	0.003	1
<b>3</b>	4-NH <sub>2</sub>	8.96	-0.66	4.78	0.0959	1.530	1
<b>4</b>	3-CN	8.52	0.56	6.10	0.0953	0.002	0
<b>5</b>	4-CN	7.28	0.66	6.10	0.0952	3.859	0
<b>6</b>	3-OH	9.92	0.12	5.90	0.0944	0.001	1
<b>7</b>	4-OH	9.92	-0.37	5.90	0.0958	1.399	1
<b>8</b>	4-OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	6.27	-0.24	10.61	0.0955	11.099	0
<b>9</b>	3-CH <sub>2</sub> OH	9.85	0.00	5.16	0.0954	0.792	1
<b>10</b>	4-CH <sub>2</sub> OH (DMP323)	9.47	0.00	5.16	0.0969	3.731	1
<b>11</b>	3-OCH <sub>3</sub>	8.80	0.12	7.08	0.0970	1.653	0
<b>12</b>	4-OCH <sub>3</sub>	6.80	-0.27	7.08	0.0936	4.077	0

ここで実測の阻害活性値  $K_i$  からの  $\Delta G^{\text{obs}}$  の算出には  $R = 1.987(\text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1})$ ,  $T = 300 \text{ K}$  を用いた。さらに、**8** および **13** のように P3/P3' 部位に -OH 基を 1 つも持たない化合物を明確に説明し、その作用の重要性を検討する目的で式(1)の説明変数に indicator variable として  $I_{\text{OH}}$  を加えた(図 2)。解析式を以下に示すが、 $I_{\text{OH}}$  には P3/P3' 部位に -OH 基を少なくとも 1 つも持つ場合に 1 を、全く持たない場合に 0 を与えた。

$$\Delta G^{\text{obs}} = a \Delta E_{\text{MO}} + b \Delta ASA + c I_{\text{OH}} + \text{const} \quad (2)$$

## 2-3-2. Congeneric series について

設定した解析式と用いた説明変数および目的変数の定義を以下に示す。

【Traditional QSAR による解析式】

$$\text{p}K_i = a \sigma + b \text{Clog } P + \text{const}^{(6)} \quad (3)$$

【Structure Based 3D QSAR による解析式】

$$\text{p}K_i = a q(\text{O}) + b I_{\text{HB}} + c L_{\text{para}} + \text{const} \quad (4)$$

$\text{p}K_i$  は  $1/K_i$  の常用対数値を表す。阻害活性を示すにあたり、HIV-1PR Ile50/50' の主鎖-NH と CUI 7 員環 ureido bond (-NH-CO-NH-) 中の酸素原子との間で形成される水素結合は重要な意味を果たす(図 2)。そこでこの酸素原子の電荷を  $q(\text{O})$  として表した。

free1 : CUI 単独状態(骨格配座は全て同一)

free2 : 複合体最適化計算後に複合体から取り出した CUI 単独状態

complex : 最適化計算後の複合体を形成した状態中での CUI

また、 $\Delta q(\text{O})^{\text{free1-complex}}$ ,  $\Delta q(\text{O})^{\text{free2-complex}}$  はこれらの電荷の差を表す。用いた電荷は全て LocalSCF による MO 計算(AM1)により得られた。 $L_{\text{para}}$  は P2/P2' 部位ベンゼン環の中心とパラ(4-)位の炭素原子の延長方向で、その炭素原子と最短距離にある HIV-1PR の vdW 表面までの距離を表す(図 2)。

今回の解析には導入された置換基-X の特性および周辺アミノ酸残基との相互作用を考慮するために以下の indicator variable  $I_{\text{HB}}$  を説明変数に加えた ( $I_{\text{HB}} = 1$  for hydrogen-bonding donors, = 0 for others)。

## 3. 結果と考察

### 3-1. Mixed series についての解析

式(1)による解析結果を以下に示す。

$$\begin{aligned} \Delta G^{\text{obs}} &= 0.0819(\pm 0.0540) \Delta E_{\text{MO}} \\ &\quad + 0.0710(\pm 0.0066) \Delta ASA \\ &\quad - 2.511(\pm 7.236) \end{aligned} \quad (5)$$

$n = 13$ ,  $r = 0.815$ ,  $s = 1.29$ ,  $F = 9.88$

この解析式から相互作用エネルギーがより小さく、P1/P1' および P2/P2' 部位における HIV-1 PR との疎水性相互作用が大きいものほど阻害活性が得られると考えられた。

式(2)による解析結果を以下に示す。

$$\begin{aligned} \Delta G^{\text{obs}} &= 0.0713(\pm 0.0438) \Delta E_{\text{MO}} \\ &\quad + 0.00947(\pm 0.00559) \Delta ASA \\ &\quad - 2.267(\pm 1.896) I_{\text{OH}} + 1.932(\pm 6.849) \end{aligned} \quad (6)$$

$n = 13$ ,  $r = 0.903$ ,  $s = 1.01$ ,  $F = 13.2$

$I_{\text{OH}}$  を説明変数に含めた解析式では相関係数が式(5)によるものよりも向上する結果が得られた。

このことから  $I_{\text{OH}}$  は P3/P3' 部位と Asp25/25' との相互作用を説明しており、阻害活性の向上にはこの部位の相互作用が不可欠であると考えられた。

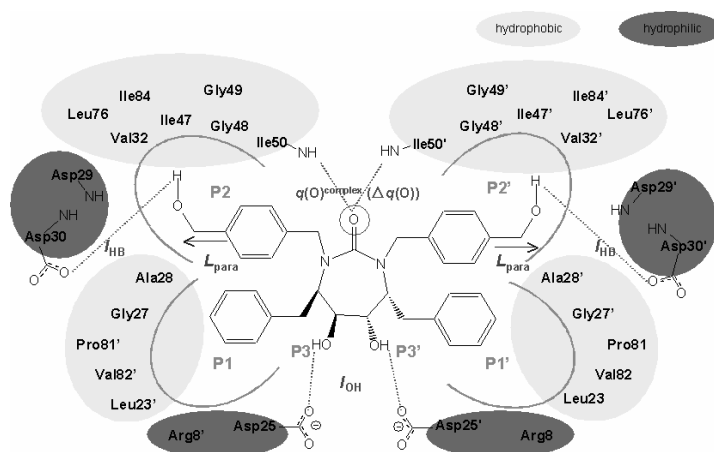


図2. HIV-1 PR/DMP323 複合体の相互作用様式図

### 3-2. Congeneric series についての解析

#### 3-2-1. 解析式の適用

Mixed series において良好な相関関係が得られた式(1)を congeneric series に対し適用した場合、 $r = 0.785$  の相関係数が得られたが  $\Delta E_{MO}$  項および  $\Delta ASA$  項ともにその係数は有意にならなかった。

#### 【Traditional QSAR による解析式】

式(3)による congeneric series についての解析結果を以下に示す。ただし、ここでは **3** および **12** を例外とした。

$$pK_i = -1.511(\pm 1.446)\sigma - 0.686(\pm 0.300)\text{Clog } P + 13.28(\pm 2.000) \quad (7)$$

$n = 10, r = 0.900, s = 0.606, F = 14.9, \text{outliers} = 2$

#### 【Structure Based 3D QSAR による解析式】

式(4)による congeneric series についての解析結果を以下に示す。

$$pK_i = 295.9(\pm 289.0)\Delta q(O)^{\text{free2-complex}} + 1.344(\pm 0.559)I_{HB} - 0.211(\pm 0.091)L_{\text{para}} - 19.80(\pm 27.57) \quad (8)$$

$(n = 12, r = 0.965, s = 0.385, F = 36.2)$

式(4)を用いた解析では、traditional QSAR による解析式では説明できなかった化合物を含め、阻害活性を表現することが可能となった。阻害活性向上のためには次のことが考察された。 $\Delta q(O)^{\text{free2-complex}}$  項の係数が正であることから ureido bond 中の酸素原子の複合体形成にともなう分極が大きな置換基 X が Ile50/50' 主鎖 NH との静電相互作用を増強させ、結合活性を上昇させる。さらに  $I_{HB}$  項の係数が正であることから、水素結合供与基の導入、 $L_{\text{para}}$  項の係数が負であることから、S2/S2' 部位との立体障害の小さい置換基の導入が結合活性を上昇させる。

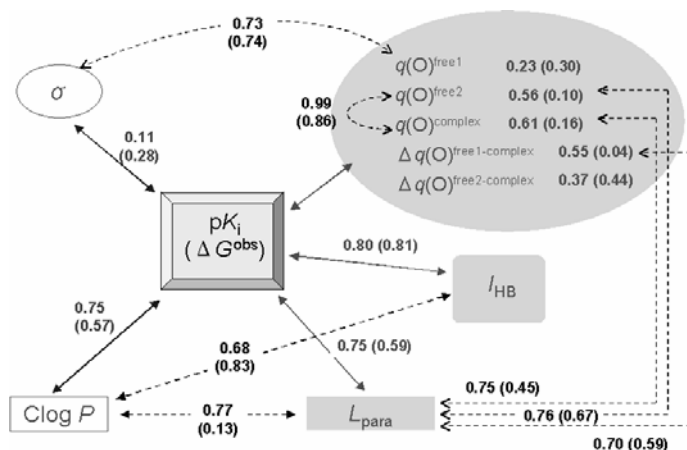


図3. 説明変数および目的変数間の相関係数

#### 3-2-2. 変数間の相関

図3に congeneric series の解析式に用いた変数間の相関係数を示す。()内の値は **8** を例外とした場合の結果を示す。Traditional QSAR 式において CUI の電子的性質を表す  $\sigma$  は  $q(O)^{\text{free1}}$  と、疎水性を表す  $\text{Clog } P$  は  $L_{\text{para}}$  および  $I_{HB}$  と良好な相関関係にあり、これらの説明変数に置き換え可能であると示唆され式(4)に反映された。また、電荷同士では  $q(O)^{\text{free2}}$  と  $q(O)^{\text{complex}}$  の間には高い相関係数が見られたが、両者を含めその他の電荷ともに  $q(O)^{\text{free1}}$  との相関係数は低いものであった。しかしながら式(4)における説明変数としては  $\Delta q(O)^{\text{free2-complex}}$  が有効であった。

### 4. まとめ

Rajni Garg ら<sup>6)</sup>による traditional QSAR の解析結果からの解釈に対して、今回の解析は、P1/P1' および P2/P2' 部位での疎水性相互作用、P3/P3' 部位での Asp25/25' との水素結合、ureido bond 中の酸素原子の分極、さらに P2/P2' 部位のベンゼン環パラ位方向の置換基の長さが CUI の阻害活性を決定づけるということを示した。

今回の解析は薬物-受容体複合体についての分子計算・シミュレーションと traditional QSAR 解析を結ぶ研究として位置づけられる。

### References

- 1) George V. De Lucca, Susan Erickson-Viitanen and Patrick Y.S. Lam, *DDT*, vol.2, No.1, 6-17 (1997)
- 2) Patrick Y.S. Lam, et al., *J. Med. Chem.*, **39**, 3514-3525 (1996)
- 3) Patul J. Ala, et al., *J. Biological. Chem.*, vol.273, No.20, 12325-12331 (1998)
- 4) Prabhakar K. Jadhav, et al., *J. Med. Chem.*, **41**, 1446-1455 (1998)
- 5) Ekachai Jenwitheesuk and Ram, *BMC Structural Biology* (2003)  
<http://www.biomedcentral.com/1472-6807/3/2>
- 6) Rajni Garg, et al., *Chem. Rev.*, **99**, 3525-3601 (1999)
- 7)  $\text{Clog } P$ ; <http://www.biobyte.com/>
- 8) LocalSCF; N.A. Anikin, V.M. Anisimov, V.L. Bugaenko, V.V. Bobrikov, A.M. Andreyev, *J. Chem. Phys.*, vol.121, No.3, 1226-1270 (2004)