

## TÍNH TOÁN CẤU TRÚC VÀ ĐỘNG LỰC CỦA PHỨC OSELTAMIVIR (TAMIFLU) VỚI HEMAGGLUTININ- NEURAMINIDASE TỬ HUMAN-PARAINFLUENZA VIRUS TYP III

Đến Tòa soạn 13-5-2009

NGUYỄN HÒA MI<sup>1</sup>, ĐẶNG ỨNG VÂN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Ứng dụng tin trong hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

<sup>2</sup>Trường Đại học Hòa Bình

### ABSTRACT

*We report molecular dynamics calculations of enzyme Hemagglutinin- Neuramidase from human parainfluenza virus type III in complex with inhibitors Zanamivir and Oseltamivir. Computational analysis indicates high stability of these complexes in dynamic equilibrium conditions. Whilst Oseltamivir has more averaged number of hydrogen bonds, more hydrophobic, less hydrophilic surfaces, much higher solvation free energy and more salt bridge created between ligand and protein, Oseltamivir's IC50 is much higher than Zanamivir one. Besides it there are much more atomic distances of  $< 0.35\text{nm}$  between Zanamivir and protein than between Oseltamivir and protein. It means that the inhibition activity of Zanamivir is caused by a similarity of its molecular geometry and binding pocket which could make Zanamivir enter more closely the bottom of binding site than Oseltamivir.*

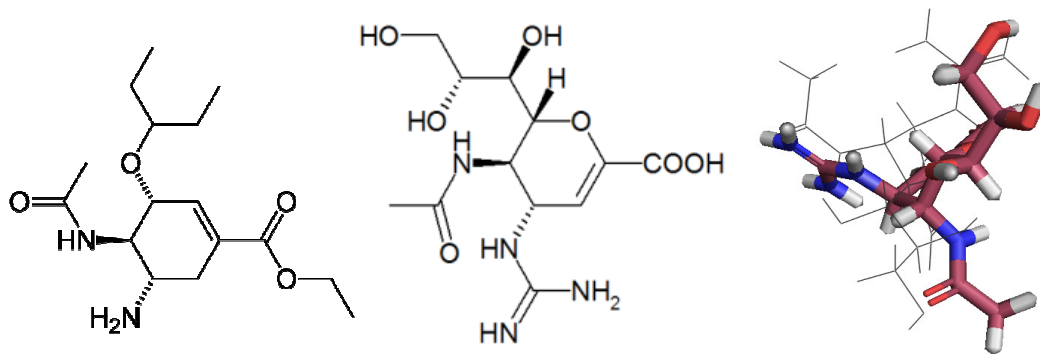
### I - MỞ ĐẦU

Hiện nay đang phổ biến hai loại thuốc chống virus H5N1 là oseltamivir (OTV-Tamiflu) và zanamivir (ZMR-Relenza). OTV đã được các nhà khoa học Việt Nam tập trung nghiên cứu [1] dựa trên nguồn cung cấp axit shikimic từ hoa hồi. Do Tamiflu có thể điều trị bằng con đường uống và không gây phản ứng co thắt phế quản như Zelenza nên chiếm đến # thị phần dược phẩm. Trong thời gian gần đây đã xuất hiện những chủng virus kháng Tamiflu [2, 3], nguy cơ về việc H5N1 chuyển thành virus cúm người đang đe dọa toàn nhân loại trong Thế kỷ 21 này. Việc tiếp tục nghiên cứu cấu trúc phức tạo nên giữa các thể đột biến của enzym Neuramidase cũng như các thể virus cúm người và thuốc chống virus giúp chúng ta tìm hiểu bản chất ức chế enzym của thuốc trên cơ sở đó để xuất các phương hướng tổng hợp thuốc mới.

Trong Protein Data Bank không thấy những dữ liệu cấu trúc phức liên quan đến phức giữa OTV và enzym Hemagglutinin - Neuramidase từ virus cúm người typ III (human parainfluenza virus type III) (viết tắt là HN3) chỉ tìm thấy một số cấu trúc phức với ZMR [4]. Công trình này trình bày các kết quả sử dụng kết hợp phương pháp gắn kết (docking) với phương pháp động lực phân tử (MD) để dự báo cấu trúc phức OTV với (HN3) từ virus cúm người typ III, so sánh với cấu trúc phức tương ứng của ZMR để tìm ra sự khác biệt cấu trúc đặc trưng ảnh hưởng đến hoạt tính thụ động enzyme của hai loại thuốc.

### Phương pháp tính

Cấu trúc của phức phối tử - protein được xác định trước tiên bằng phần mềm QUANTUM (phương pháp docking) tìm các vị trí gắn kết ưu tiên của phối tử trên enzym (vị trí các nguyên tử của protein được cố định) [5]. Sau đó, phương



Hình 1: Phân tử Oseltamivir (a), Zanamivir (b) và vị trí của Zanamivir trong vùng hoạt động của HN3 dự báo từ QUANTUM (hình que) và trong tinh thể 1v3e. (vạch)

pháp động lực phân tử được thực hiện trên phần mềm GROMACS [6] với một vài cấu trúc ban đầu khác nhau nhận được từ phương pháp docking để xác định cấu trúc trung bình tối ưu. Trước khi thực hiện tính toán gắn kết OTV trên HN3, chúng tôi đã thực hiện việc gắn kết ZMR trên HN3.

Dữ liệu đầu vào của những tính toán này là cấu trúc phức ZMR với HN3 có mã ID 1v3e trong PROTEIN DATA BANK [4]. Sau khi đã loại bỏ các phối tử, protein được xử lý trực tuyến trên phần mềm WHAT IF [7] để bổ sung các axit amin chưa hoàn chỉnh và cấp phát hydrogen cho phân tử. Cấu hình dự báo có năng lượng gắn kết cao nhất trùng khớp tốt nhất với cấu trúc tinh thể (hình 1). Tuy vậy, RMSD vẫn còn cao (6,0 Å). Sự khác biệt có thể là do việc gắn kết trên QUANTUM đã được thực hiện trong điều kiện vị trí cố định của các nguyên tử của protein. Vì thế, cấu trúc này chỉ nên sử dụng như là cấu trúc ban đầu gần đúng cho các tính toán MD kế tiếp.

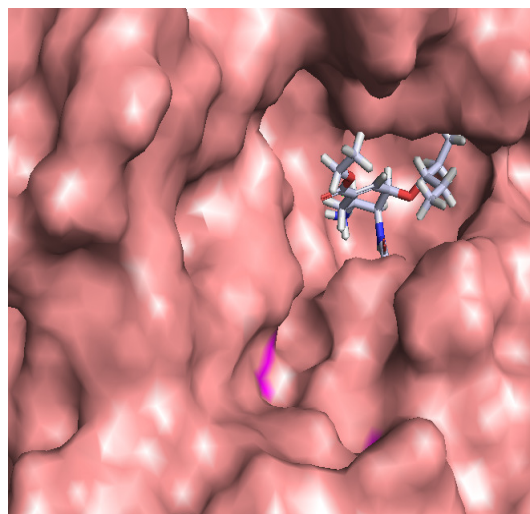
Quy trình tính động lực phân tử đã được trình bày trong [8] bao gồm: i) Tối ưu cấu hình hệ mô phỏng thoát tiên bằng 5000 bước thuật toán L-BFGS sau đó bằng 5000 bước thuật toán đường dốc nhất. ii) Đưa hệ về cân bằng nhiệt và cực tiểu hoá được thực hiện tiếp tục bằng cách tính 5000 bước động lực Langevin (ngẫu nhiên) ở thể tích không đổi. Thuật toán LINCS được sử dụng để củng cố các liên kết hydrogen theo các tham số mặc định, iii) Tính 50000 bước động lực phân tử ở áp suất không đổi để tiếp tục

đưa hệ về cân bằng nhiệt. Điều nhiệt Berendsen được sử dụng. iv) Tính động lực phân tử 250000 bước (tương ứng với 500 ps) ở thể tích không đổi theo cách tương tự với bước 2 để thu được các giá trị trung bình (production). Thừa số cắt khoảng tác dụng xa của tương tác L-J (sc\_alpha) là 0,5, tương tác L-J và Coulomb gần được cắt ở 9Å và sử dụng mẫu PME cho phần khoảng tác dụng xa, danh mục lân cận cũng được tính với cùng khoảng cách như lực Coulomb gần (rlist = rcoulomb = 1,0 nm). Việc tính toán MD cũng được thực hiện với phức ZMR-HN3 để kiểm chứng quy trình tính khi đối chiếu cấu hình MD của phức với cấu trúc tinh thể trong Protein Data Bank. Kết quả so sánh cấu trúc protein trên phần mềm WHAT IF [7] cho giá trị RMSD bằng 0,8 Å. Sự phù hợp tốt giữa cấu trúc MD và cấu trúc tinh thể của phức ZMR-HN3 là cơ sở quan trọng để thực hiện các tính toán MD tiếp theo.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Gắn kết Oseltamivir lên Hemagglutinin Neuramidase

Chúng tôi đã thực hiện gắn kết OTV trên HN3 và lựa chọn một vài cấu hình gắn kết có năng lượng gắn kết cao nhất từ kết quả tính toán trên phần mềm QUANTUM. Hình 2 biểu diễn cấu trúc của phức có năng lượng gắn kết cao nhất (cấu hình 1) dưới dạng sợi (với protein) — que (với phối tử) và sự định vị của OTV tại vị trí gắn kết trên mặt protein HN3.



Hình 2: Cấu trúc của phức *Oseltamivir-Hemagglutinin Neuramidase*. A. Dưới dạng sợi (protein) và que (phối tử). B. Dưới dạng mặt (protein) và que (phối tử)

Bảng 1: IC<sub>50</sub> và năng lượng (kJ/mol) của các cấu hình dự báo của phức

	IC <sub>50</sub> (μMol/L)	E bind	Ee+Esol	Evdw	TdS	Etor
OTV —HN3						
1	0.000124787	-22.7203	-4.5007	-30.4915	-13.5214	-1.2494
2	0.000249915	-20.9649	9.0053	-36.8407	-2.6373	4.2332
3	0.000312011	-20.4039	2.3900	-31.6037	-7.5721	1.2377
4	0.001108270	-17.2002	5.8313	-29.6826	-2.3325	4.3187
ZMR — HN3						
1	0.000018487	-27.5468	-10.4006	-35.9349	-13.7596	5.0291
2	0.000019464	-27.4166	-23.5572	-29.8180	-15.7025	10.2561
3	0.000027358	-26.5562	-14.3646	-31.2575	-18.1479	0.9181
4	0.000309043	-20.4281	-10.6280	-25.9575	-9.5480	6.6094

Phân tích so sánh 2 cấu trúc có năng lượng gắn kết cao nhất của hai phối tử OTV và ZMR trên HN3 được trình bày trên bảng 1. Từ bảng 1 có thể rút ra một số nhận xét sau đây:

1. Trong số các phần góp vào Ebind, thì phần góp entropy không khác nhau, trong khi đó năng lượng van der Waals và tổng năng lượng tĩnh điện và solvat hoá của ZMR lớn hơn so với OTV.

2. Năng lượng gắn kết ZMR với HN3 mạnh

hơn OTV và vì thế IC<sub>50</sub> của OTV cao hơn của ZMR (6,75 lần).

Kết quả này trùng hợp khá tốt với thực nghiệm. Theo dược điển liều dùng điều trị cúm của OTV (Tamilflu) là 75 mg (0,24 mM) hai lần/ngày, trong khi của ZMR (Relenza) chỉ là 10mg (0,03 mM) hai lần/ngày [9] (ít hơn 8 lần).

*Động lực phân tử (MD) của phức Hemagglutinin Neuramidase với Oseltamivir và Zanamivir*

Mô phỏng động lực phân tử của phức *Hemagglutinin Neuramidase* với *Oseltamivir* và *Zanamivir* cho chúng ta biết thêm nhiều thông tin về cấu trúc và động lực của hai hệ phức này trong đó quan trọng nhất là: các đại lượng nhiệt động trung bình và tính bền của phức trong điều kiện các nguyên tử tham gia chuyển động nhiệt (gọi tắt là tính bền động), số cặp nguyên tử có khoảng cách gần, số liên kết hydro, số cầu muối, giản đồ Ramachandran, diện tích có thể tiếp cận dung môi, RMSD và hệ số tự khuếch tán ...

1. Bảng 2 trình bày một số đại lượng nhiệt động trung bình của hệ phức OTV-HN3 và

ZMR-HN3 trong điều kiện cân bằng động. So sánh các giá trị nhiệt động giữa 2 phức cho thấy yếu tố tương tác Coulomb đóng góp tới 99% thế năng âm và đóng vai trò chủ chốt quyết định hoạt tính ức chế của phối tử. Xem xét các phần góp vào sự khác biệt thế năng (-610 kJ/mol) của 2 phức thì cũng thấy rõ vai trò của tương tác Coulomb (đóng góp tới 90% trong khi tương tác L-J và các xoắn không chính tắc (improper) lại có tác dụng theo chiều ngược lại ( $f$  mang dấu dương). Điều này có sự khác biệt với kết quả tính toán docking (bảng 1) trong đó lực van der Waals có tác dụng thuận tới sự khác biệt năng lượng gắn kết giữa phối tử và protein.

Bảng 2: Một số đại lượng nhiệt động trung bình của hệ OTV-HN3 và hệ ZMR-HN3

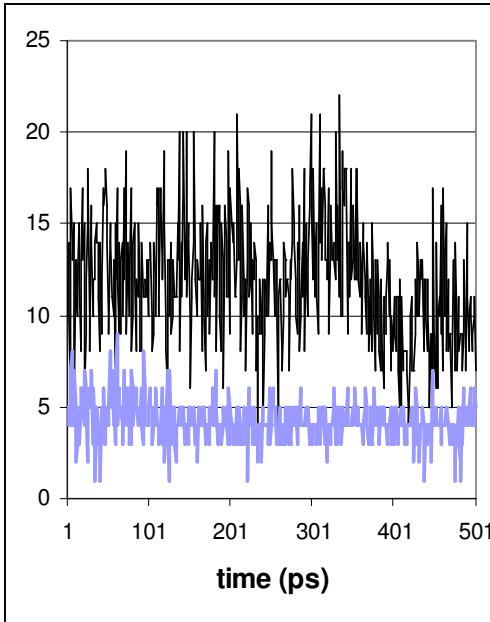
Năng lượng (J/mol)	Trung bình			Thăng giáng	
	OTV-HN3	ZMR-HN3	$f$	OTV-HN3	ZMR-HN3
LJ-14	2585.46	2567.59	17.87	77.517	74.637
Coulomb-14	44474.10	44597.40	-123.30	128.326	113.480
LJ (gần)	48869.70	48827.10	42.60	700.017	687.548
Coulomb (gần)	-445645.00	-445420.00	-225.00	1026.290	1049.390
Coulomb (xa)	-116121.00	-115767.00	-354.00	88.692	82.280
Xoắn proper	3083.87	3099.79	-15.92	77.038	76.946
Xoắn improper	2237.26	2229.50	7.76	66.640	65.634
Thế năng	-453782.00	-453172.00	-610.00	651.115	648.847
Động năng	87946.10	87985.80	-39.70	458.872	456.875
Tổng năng	-365836.00	-365186.00	650.00	801.140	796.976
Nhiệt độ (K)	301.175	301.165	0.010	1.570	1.564
áp suất (bar)	-69.907	-88.947	19.040	172.229	170.615
Cv (J/mol K)	12.4723	12.4723	0.000		

2. Tính IC50 trên phần mềm QUANTUM đối với cấu hình trung bình thu được sau 500 ps mô phỏng động lực phân tử đã được tối ưu trong chân không thu được các giá trị IC50 của phức OTV-HN3 và ZMR-HN3 lần lượt là 0.00167896 và 0.000285673 đều cao hơn hẳn so với các cấu hình gắn kết tối ưu tương ứng được trình bày trong bảng 1 (0.000124787 với OTV-HN3 và

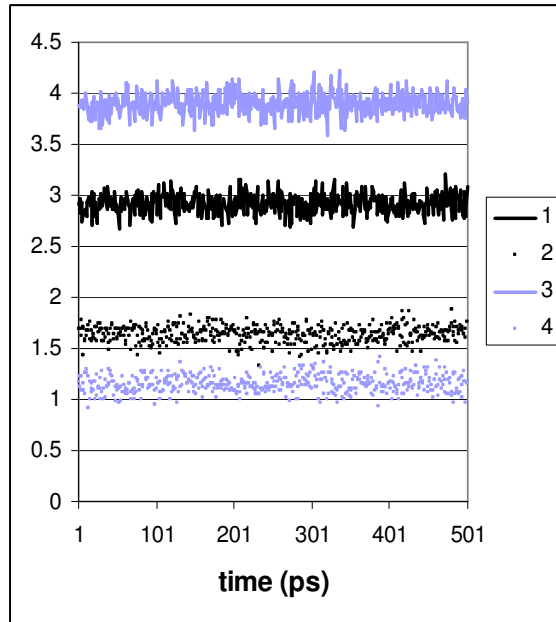
0.000018487 với ZMR-HN3). Tuy rằng giá trị IC50 cao chứng tỏ năng lượng gắn kết nhỏ (phức kém bền hơn) so với các cấu hình xác định được từ các phương pháp docking nhưng cũng chứng tỏ rằng đó là các cấu hình bền trong điều kiện mô phỏng động lực phân tử. Các phối tử vẫn định vị trong tâm hoạt động của protein HN3.

Khảo sát giản đồ Ramachandran của cấu trúc trung bình của phức HN3-OTV và HN3-ZMR cho các giá trị lần lượt là -3.530 và -3.866. Nhìn chung, cả hai cấu trúc đều có giá trị hơi thấp. Có thể là trong trạng thái cân bằng động số

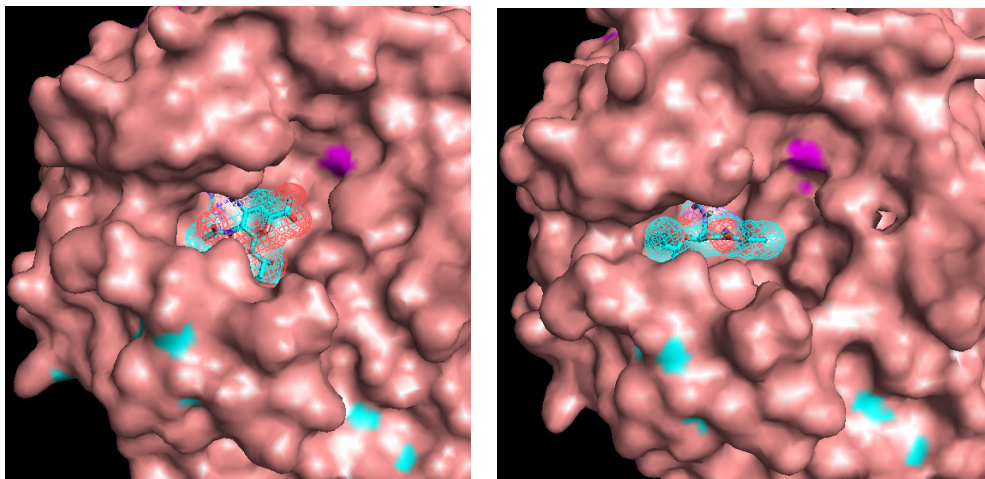
axit amin nằm trong vùng tương ứng cho phép trên giản đồ Ramachandran giảm đi khi mà các nguyên tử đều được cấp động năng để chuyển dịch khỏi vị trí cân bằng.



Hình 3: Số cặp nguyên tử có khoảng cách nhỏ hơn 0,35 nm trong tiến trình mô phỏng MD phức ZMR-HN3 (màu đen) và OTV-HN3 (màu ghi)



Hình 4: Diện tích tiếp cận dung môi của ZMR (màu đen) và OTV (màu ghi) bao gồm mặt kỵ nước (đường liền) và ái nước (đường chấm)



Hình 5: Minh họa vị trí gắn kết của các phối tử trong tâm hoạt động trong cấu trúc trung bình MD của phức ZMR-HN3 (a) và OTV (b)

4. Điểm khác biệt rõ rệt giữa hai phức có thể quan sát được ở chỗ số cặp nguyên tử giữa protein và phối tử có khoảng cách nhỏ hơn 0,35 nm trong phức ZMR-HN3 nhiều gấp hơn 2 lần so với phức OTV-HN3 trong suốt tiến trình mô phỏng (hình 3). Trong đó số liên kết hydro trung bình giữa phối tử và protein trong ZMR (1,647) cũng lại nhỏ hơn so với phức OTV-HN3 (2.253).

5. Số cầu muối tạo nên giữa phối tử và protein trong phức OTV là 3 (Arg 283, Glu 135, Glu268) trong khi không có một cầu muối nào được tạo nên giữa ZMR và protein. Bởi vì cầu muối trong protein dùng để chỉ liên kết ion tương đối yếu giữa các axit amin tích điện dương (như là arginine hoặc lysine) và các axit amin tích điện âm (như là axit asparatic hoặc axit glutamic) nên dường như là có nghịch lý: ZMR đi sâu vào hẻm trong tâm hoạt động của protein nhưng lại không hướng các tâm tích điện vào các axit amin có điện tích trái dấu. Phải chăng yếu tố hình học có vai trò quyết định đến hoạt tính ức chế enzym hơn là tương tác tĩnh điện? Phân tích điện tích tiếp cận dung môi của hai phối tử cho thấy (hình 4) ZMR có điện tích bề mặt ái nước lớn hơn OTV nhưng phân diện tích kỵ nước lại nhỏ hơn. Riêng biến thiên năng lượng tự do solvat hóa trung bình (mẫu trường liên tục)  $\langle D G_{solv} \rangle$  của ZMR (6,9 kJ/mol/nm<sup>2</sup>) nhỏ hơn hẳn so với OTV (22.76.9 kJ/mol/nm<sup>2</sup>) (không biểu diễn trên hình vẽ).

6. Khảo sát tính chất động lực của hai hệ phức cho thấy nếu trung bình thống kê được thực hiện trong khoảng từ 100ps đến 500ps hệ số tự khuếch tán của OTV xấp xỉ với của protein (0.0056 (+/- 0.0117) so với 0.0065 (+/- 0.0071) x 10<sup>-5</sup>cm<sup>2</sup>/s) trong khi đó ZMR có hệ số tự khuếch tán 5 lần cao hơn protein (0.0555 (+/-0.0520) so với 0.0125 (+/-0.0028).10<sup>-5</sup>cm<sup>2</sup>/s) và 10 lần cao hơn OTV trong phức của nó.

Tất cả những điều tưởng như là nghịch lý đối với việc ZMR có IC50 nhỏ hơn hẳn (tức là hoạt tính thụ động cao hơn hẳn) so với OTV có thể hiểu là là ZMR tiến sâu vào vùng lõm của tâm hoạt động, chủ yếu do có cấu hình tương thích với vùng này (xem hình 5). Giả thiết về bản chất tương thích cấu hình của thuyết đa vị Balandin [10] có thể gợi ý cho một sự giải thích về ưu thế hoạt tính thụ động enzym HN3 của

ZAN cao hơn hẳn so với OTV.

## KẾT LUẬN

Tính toán động lực phân tử phức giữa enzym Hemagglutinin-Neuramidase từ human parainfluenza virus typ III và các chất thụ động Zanamivir và Oseltamivir đã được thực hiện. Kết quả tính toán cho thấy tính ổn định cao của các phức trong điều kiện cân bằng động. Trong khi Oseltamivir có số liên kết hydrogen nhiều hơn, nhiều bề mặt kỵ nước, ít bề mặt ưa nước hơn, số cầu muối giữa phối tử và protein nhiều hơn, năng lượng tự do solvat hóa cao hơn nhiều so với Zanamivir thì IC50 của Zanamivir lại nhỏ hơn nhiều so với Oseltamivir. Đồng thời, số cặp nguyên tử có khoảng cách < 0,35 nm giữa Zanamivir và protein cũng cao hơn hẳn so với Oseltamivir. Điều đó có nghĩa là do có hình học phân tử tương thích với tâm hoạt động, Zanamivir có thể đi sâu xuống đáy tâm hoạt động tạo nên khả năng ức chế enzym lớn hơn hẳn so với Oseltamivir.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. <http://www.vietnamnet.vn/khoahoc/trongnuoc/2006/01/530297/>.
2. Q. Mai Le, M. Kiso, K. Someya, Y. T. Sakai, T. Hien Nguyen K. H. L. Nguyen, N. Dinh Pham, Ha H. Nguyen, S. Yamada, Y. Muramoto, T. Horimoto, A. Takada, H. Goto, T. Suzuki, Y. Suzuki, Y. Kawaoka. Nature, 437, 1108 (2005).
3. P. J. Collins, L. F. Haire, Y. P. Lin, J. Liu, R. J. Russell, P. A. Walker, J. J. Skehel, S.R. Martin, A. J. Hay & S. J. Gamblin. Nature, 453, 1258 - 1262 (2008).
4. M. C. Lawrence, N. A. Borg, V. A. Streltsov, P. A. Pilling, C. Epa, J. N. Varghese, J. L. McKimm-Breschkin, P. M. Colman. J. Mol. Biol., 335, 1343 - 1353 (2004).
5. QUANTUM 3.3 Docking/Library Screening Software QUANTUM Pharmaceuticals 2007.
6. E. Lindahl, B. Hess & D. van der Spoel GROMACS 3.0: A package for molecular

- simulation and trajectory analysis (2001) J. Mol. Mod. 7 306-317.
7. <http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>
8. <http://www.rxlist.com/relenza-drug.htm> và <http://www.rxlist.com/tamiflu-drug.htm>.
9. A. A. Balandin. Russ. Chem. Rev., **33**, 258 — 275 (1964).

*Liên hệ:* **Nguyễn Hòa My**  
Khoa Hóa học  
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên  
Đại học Quốc gia Hà Nội  
19 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội.