

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 615.011.5

3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств

DOI: 10.37903/vsgma.2024.4.22 EDN: RFUSOH

3D ФАРМАКОФОРЫ ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ-2, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ЗАКРИСТАЛЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТ-ЛИГАНДНЫХ КОМПЛЕКСОВ© Сауц А.В.^{1,2}¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Россия, 197022,

Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. проф. Попова, 14а

²Санкт-Петербургский университет технологий управления и экономики, 190020, Россия,

Санкт-Петербург, Лермонтовский пр-т, 44а

Резюме

Цель. Получение 3D (пространственных) фармакофоров ингибиторов циклооксигеназы-2 на основе закристиллизованных лиганд-ферментных комплексов.

Методика. Для получения 3D фармакофоров были загружены с Protein Data Bank структуры, полученных с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов циклооксигеназы-2 с ибупрофеном, индометацином, мелоксикамом, напроксеном, флурбипрофеном и их производными, диклофенаком, лумиракоксибом, меклофенамовой, мефенамовой, толфенамовой, флуфенаминовой кислотой, рофекоксибом, цецекоксибом и соединениями N-{(Сукцинил-подофиллотоксинил) 4-бутил}-2-{1-(4-хлорбензоил)-5-метокси-2-метил-1H-индол-3-ил} ацетамидом, SC-558, S-ARN-2508, 5с-S, 23d-(R), 4,9-дигидро-3H-пиридо[3,4-b]индолом. Для валидации фармакофоров использовался набор из структур ингибиторов и тестовых «лигандов-приманок», загруженных из химической базы данных DUD-E. Кластеризация выполнена методом МакКуитти. Валидация фармакофоров выполнена с помощью ROC анализа. Извлечение, кластеризация, выравнивание, объединение и валидация фармакофоров выполнялась в компьютерной программе Schrodinger Suite.

Результаты. Были получены и одобрены два перспективных 3D фармакофора, один из которых содержит два ароматических кольца, второй ароматическое кольцо и акцепторную связь. В наибольшей полученным фармакофорам структурно соответствует рофекоксиб, напроксен и его производные.

Заключение. Результаты работы имеют практическую значимость на этапе виртуального скрининга при разработке новых селективных нестероидных противовоспалительных препаратов, а также оценки потенциальной противовоспалительной активности уже существующих соединений.

Ключевые слова: фармакофор, циклооксигеназа-2, нестероидные противовоспалительные препараты

3D PHARMACOPHORES OF CYCLOOXYGENASE-2 INHIBITORS OBTAINED FROM CRYSTALLIZED ENZYME-LIGAND COMPLEXESSauts A.V.^{1,2}¹St. Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy, 14a, Prof. Popov St., ext.ter.g. municipal district Aptekarsky Island, 197022, St. Petersburg, Russia²St. Petersburg University of Management and Economics Technologies, 44a, Lermontovsky Ave., 190020, St. Petersburg, Russia*Abstract*

Objective. Preparation of 3D (spatial) pharmacophores of cyclooxygenase-2 inhibitors based on crystallized ligand-enzyme complexes.

Methods. To obtain 3D pharmacophores, Protein Data Bank structures were loaded, obtained using X-ray diffraction analysis of cyclooxygenase-2 complexes with ibuprofen, indomethacin, meloxicam, naproxen, flurbiprofen and their derivatives, diclofenac, lumiracoxib, meclofenamic, mefenamic, tolfenamic, flufenamic acid, rofecoxib, coxib and compounds N-((Succinyl-podophyllotoxynyl) 4-butyl)-2-{1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl} acetamide, SC-558, S-ARN-2508, 5c-S, 23d-(R), 4,9-dihydro-3H-pyrido[3,4-b]indole. To validate the pharmacophores, a set of inhibitor structures and test “bait ligands” downloaded from the DUD-E chemical databases was used. Clustering was performed using the McQuitty method. Validation of pharmacophores was performed using ROC analysis. Pharmacophore extraction, clustering, competition, pooling, and validation were performed in software Schrodinger Suite.

Results. Two promising 3D pharmacophores were obtained and approved, one of which contains two aromatic rings, the second an aromatic ring and an acceptor bond. The largest pharmacophores obtained are structurally similar to rofecoxib, naproxen and its derivatives.

Conclusion. The results of the work are of practical significance at the stage of virtual screening in the development of new selective non-steroidal anti-inflammatory drugs, as well as assessing the potential anti-inflammatory activity of existing compounds.

Keywords: pharmacophore, cyclooxygenase-2, nonsteroidal anti-inflammatory drugs

Введение

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) в настоящее время являются одними из самых востребованных лекарственных средств. Механизм действия современных НПВП главным образом направлен на ингибирование фермента циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2). Разработка новых ингибиторов ЦОГ-2, в том числе на этапе виртуального скрининга, в связи с наличием серьёзных противопоказаний и побочных реакций, уже существующих является весьма актуальной задачей. Фармакофорное моделирование, как одна из разновидностей виртуального скрининга, позволяет выявить пространственные и электронные особенности молекулы, наличие которых объясняет её соответствующую биологическую активность и даёт объяснение, почему взаимодействие структурно разнородных молекул-лигандов с одним и тем же рецептором или ферментом будет приводить к одному и тому же биологическому эффекту [1]. Пространственные (3D) фармакофоры, извлечённые из экспериментальных структур лиганд-ферментных комплексов, несмотря на свою высокую специфичность, обладают неоспоримым преимуществом по сравнению с другими видами фармакофоров, т.к. наличие таких структур позволяет более достоверно выявить механизм межмолекулярного взаимодействия фермента и лиганда, а тем самым и определить соответствующие фармакофорные центры.

Цель работы – получение 3D фармакофоров ингибиторов ЦОГ-2 на основе лиганд-ферментных комплексов.

Методика

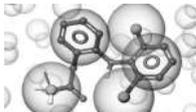
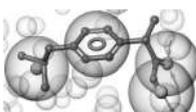
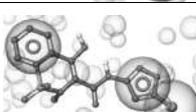
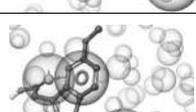
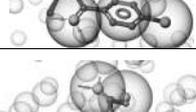
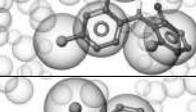
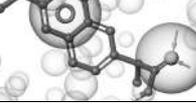
Для получения 3D фармакофоров были загружены с интернет-сайта Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) закристилизованные структуры фермент-лигандных комплексов ЦОГ-2 с соответствующими ингибиторами, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа. Для валидации фармакофоров использовался набор из структур 953 ингибиторов и 23135 тестовых «лигандов-приманок» ЦОГ-2, загруженных из химической базы данных DUD-E (<https://dude.docking.org/>). Лиганды-приманки представляют собой соединения, схожие по физическим свойствам с ингибиторами, но отличающиеся от них по химической структуре. Данные структуры были получены в работе [5] с целью оценки возможных ложноположительных результатов виртуального скрининга.

Для систематизации полученных результатов была выполнена их кластеризация и выравнивание. Кластеризация полученных фармакофоров выполнена сеточным методом МакКуитти с шагом сетки 10^{-10} м. Кластеризация и выравнивание выполнялись периодически друг за другом с последовательным уменьшением количества кластеров по мере увеличения количества выравненных фармакофоров. Валидация объединённых фармакофоров выполнена с помощью ROC анализа. Извлечение, кластеризация, выравнивание, объединение и валидация фармакофоров выполнялась в компьютерной программе Schrodinger Suite (модули Phase и Ligand alignment).

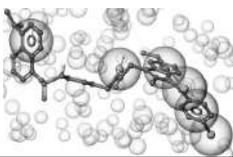
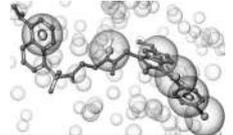
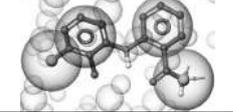
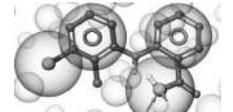
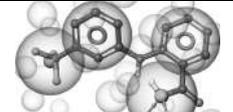
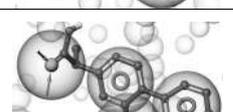
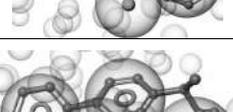
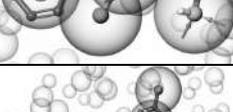
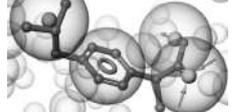
Результаты исследования и их обсуждение

Лиганды и фармакофоры, извлечённые из лиганд-ферментных комплексов приведены в табл. 1, на изображениях в которой фармакофорные центры (далее центры) обозначены следующим образом: гидрофобные связи – в виде тёмно-серых шаров, донорные связи – в виде тёмно-серых шаров со стрелками, указывающими в направлениях к ним, акцепторные связи – в виде тёмно-серых шаров со стрелками, указывающими в направлениях от них, ароматические кольца – в виде тёмно-серых шаров, исключённые объёмы – полупрозрачными светло-серыми сферами на заднем фоне за молекулами.

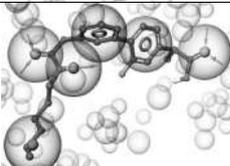
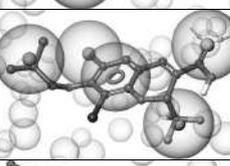
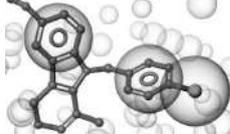
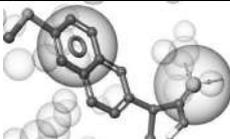
Таблица 1. Структурная формула лигандов и 3D фармакофоры, извлечённые из лиганд-ферментных комплексов

Лиганд, ингибирующий ЦОГ-2	Структурная формула и 3D фармакофор лиганда	Разрешение, 10^{-10} м	PDB код, литературный источник
1	2	3	4
Дезметилфлурбипрофен		2,81	4FM5 [12]
Диклофенак		2,90	1PXX [7]
Ибупрофен		1,81	4PH9 [11]
Изоксикам		2,01	4M10 [12]
Индометацин		2,90	4COX [4]
Лумиракоксиб		2,35	4OTY [16]
Меклофенамовая кислота		2,41	5IKQ [7]
Напроксен		1,73	3NT1 [2]
(R)-напроксен		2,40	3Q7D [2]

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Индометацин- бутилдиаминдансил		2,22	6BL3 [15]
<i>Индометацин- этилендиаминдансил</i>		2,22	<i>6BL4 [15]</i>
Мелоксикам		2,45	4M11 [12]
Мефенамовая кислота		2,34	5IKR [7]
Рофекоксиб		2,70	5KIR [8]
<i>Толфенамовая кислота</i>		2,45	<i>5IKT [7]</i>
Флуфенаминовая кислота		2,51	5IKV [7]
Флурбипрофен		2,50	3PGH [7]
(R)-Флурбипрофен		2,84	3RR3 [2]
Целекоксиб		2,40	3LNI [16]
S-ибупрофен		2,81	4RS0 [1]
N-{(Сукцинил- подофиллотокси-нил) 4- бутил}-2-{1-(4-хлорбензоил)- 5-метокси-2-метил-1H- индол-3-ил} ацетамид		2,11	4OTJ [12]

Окончание таблицы 1

1	2	3	4
SC-558		3,00	1CX2 [4]
S-ARN-2508		2,27	5W58 [18]
5c-S		2,20	3LN0 [16]
23d-(R)		2,19	3NTG [16]
4,9-дигидро-3H-пиридо[3,4-b]индол		2,66	6V3R [17]
6-метилтио-напроксен		2,27	3NTB [2]

Приведённые в табл. 1 фармакофоры могут включать в том числе неважные центры, описывающие взаимодействия лиганда с аминокислотными остатками фермента, не связанные с механизмом его ингибирования. В связи с этим в объединённые фармакофоры включаются только центры, встречающиеся сразу во всех выравненных фармакофорах в пределах каждого кластера и совпадающие друг с другом при наложении с точностью $3,10^{-10}$ м. Заданная точность равна наихудшему разрешению результатов рентгеноструктурного анализа. Результаты кластеризации, выравнивания и объединения фармакофоров приведены в табл. 2.

В качестве результатов валидации в табл. 3 приведены значения процентов выявленных лиганд и площадей AUC, образуемых ROC-кривыми, а на рис. 1 а-г соответствующие ROC-кривые.

Результаты валидации фармакофоров можно считать положительными при $0,6 \leq AUC \leq 1$ [5]. Данному требованию удовлетворяют фармакофоры №1 и №3 и их можно считать прошедшими валидацию. Фармакофору №1 в наибольшей степени соответствует рофекоксиб, а фармакофору №3 напроксен и его производные. В связи с данным фактом следует отметить, что рофекоксиб, более известный как Виокс™, несмотря на то, что был отозван с фармацевтического рынка во всём мире из-за серьёзных побочных действий, является весьма перспективным соединением и целесообразен детальный токсофорный анализ его химической структуры с последующей её молекулярной модификацией.

Высокий процент истинно положительных и отрицательных результатов валидации фармакофоров №1 и №2 делает их использование целесообразным при поиске новых ингибиторов ЦОГ-2. Фармакофор №2 не прошёл валидацию, но заслуживает отдельного внимания. Фактически он объединяет в себе центры фармакофоров №1 и №2 и тоже может быть использован при

поиске новых ингибиторов, если при проведении виртуального скрининга снизить требования совпадения в нём только для двух, а не для трёх центров.

Таблица 2. Результаты кластеризации, выравнивания и объединения полученных фармакофоров

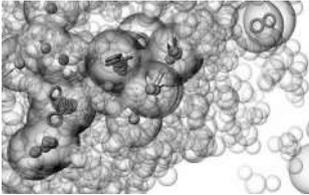
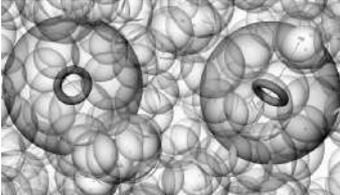
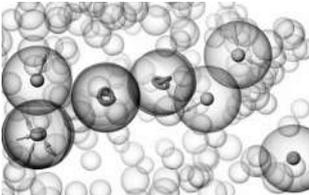
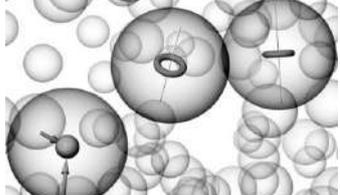
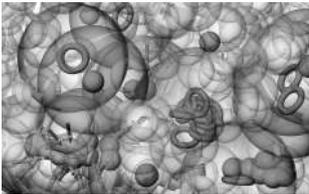
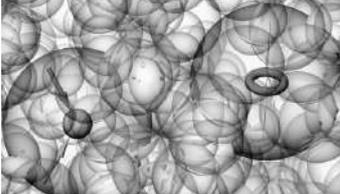
№ кластера	Выравнивание	Объединённый фармакофор	Лиганды, соответствующие объединённому фармакофору
1			Изоксикам; индометацин-бутилдиаминдансил; индометацин-этилендиаминдансил; лумиракоксиб; меклофенамовая, мефенамовая кислота; мелоксикам; рофекоксиб; целекоксиб; N-{(сукцинил-подофиллотоксинил) 4-бутил}-2-{1-(4-хлорбензоил)-5-метокси-2-метил-1H-индол-3-ил} ацетамид; SC-558; 4,9-дигидро-3H-пиридо [3,4-b] индол
2			Дезметилфлурбипрофен; S-ARN-2508
3			Диклофенак; ибупрофен; индометацин; напроксен; толфенамовая, флуфенаминовая кислота; флурбипрофен; S-ибупрофен; 5C-S; 6-метилтио-напроксен; 23d-(R); (R)-напроксен; (R)-флурбипрофен

Таблица 3. Результаты валидации полученных фармакофоров

№ кластера и объединённого фармакофора	Выявленный% лигандов				AUC
	Истинно положительных	Истинно отрицательных	Ложноположительных	Ложноотрицательных	
1	92,44	88,64	11,36	7,56	0,83
2	21,83	97,87	2,13	78,17	0,22
3	77,33	86,93	13,07	22,67	0,72
Совокупное значение по всем фармакофорам	93,49	63,26	36,74	6,51	0,84

Заключение

В результате выполненного в настоящей работе исследования на основании структур лиганд-ферментных комплексов были получены и валидированы 3D фармакофоры ингибиторов ЦОГ-2. Результаты работы имеют практическую значимость на этапе виртуального скрининга при разработке новых НПВП, а также оценки потенциальной противовоспалительной активности уже существующих соединений.

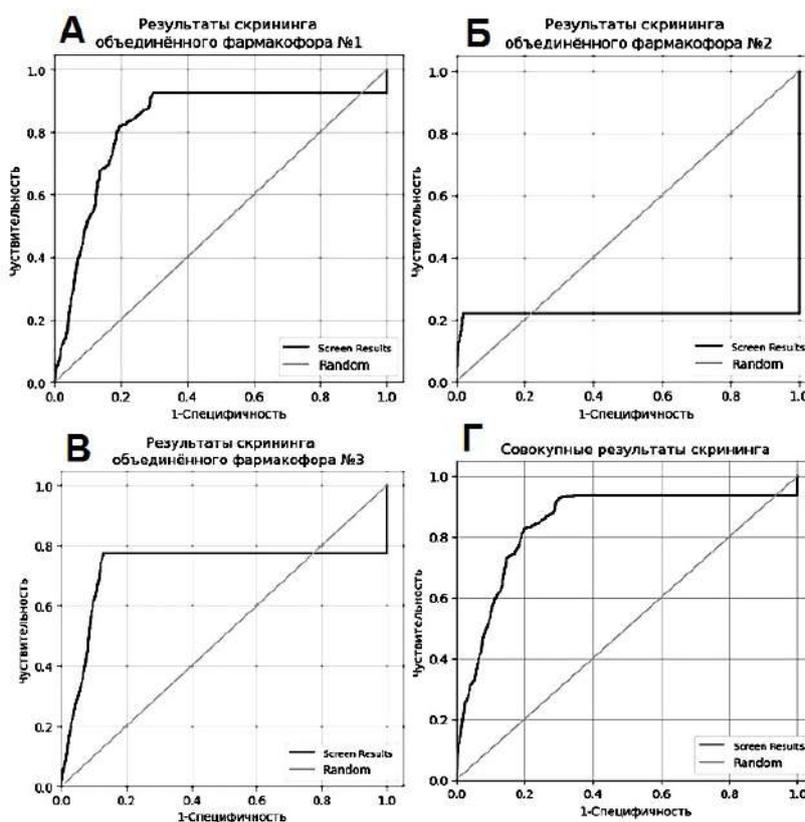


Рис.1. ROC-кривые, полученные по результатам объединенных фармакофоров: а) №1; б) №2; в) №3; г) совокупные результаты (по всем фармакофорам)

Литература (references)

1. Blobaum A.L., Shu Xu, Scott W.R. et al. Action at a Distance: mutations of peripheral residues transform rapid reversible inhibitors to slow, tight binders of cyclooxygenase-2 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V.20, N 23. – P. 7159-7163.
2. Duggan K.C., Walters M.J., Musee J. et al. Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V.285, N45. – P. 34950-34959.
3. Duggan K.C., Hermanson D.J., Musee J. et al. (R)-Profens are substrate-selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by COX-2 // *Nature Chemical Biology*. – 2011. – V.7, N11. – P. 803-809.
4. Kurumbail, R.G. Stevens A.M., Gierse J.K. et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents // *Journal Nature*. – 1996. – V.384, N6610. – P. 644-648.
5. Metz C.E. Basic principles of ROC analysis / *Seminars in nuclear medicine*. – 1978. – V.8, N4. – P. 283-298.
6. Mysinger M.M., Carchia M., Irwin J.J. et al. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking // *Journal Medicinal Chemistry*. – 2012. V.55, N14. – P. 6582-6594.
7. Orlando B.J., Malkowski M.G. Substrate-selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives Is Dependent on Peroxide Tone // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – V.291, N29. – P. 15069-15081.
8. Orlando B.J., Malkowski M.G. Crystal structure of rofecoxib bound to human cyclooxygenase-2 // *Acta Crystallographica Section F*. – 2016. – V.72, N10. – P. 772-776.
9. Rowlinson S.W., Kiefer J.R., Jeffery J.P. et al. A Novel Mechanism of Cyclooxygenase-2 Inhibition Involving Interactions with Ser-530 and Tyr-385* // *Enzyme Catalysis And Regulation*. – 2003. – V.278, N46. – P. 45763-45769.
10. Sy Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances // *Drug Discovery Today*. – 2010. – V.15, N11/12. – P. 444-450.

11. Orlando B.J., Lucido M.J., Malkowski M.G. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2 // *Journal Structural Biology*. – 2015. – V.189, N1. – P. 62-66.
12. Uddin M.J., Crews B.C., Xu Shu et al. Antitumor Activity of Cytotoxic Cyclooxygenase-2 Inhibitors // *Antitumor Activity of Cytotoxic Cyclooxygenase-2 Inhibitors // ACS Chemical Biology*. – 2016. – V.18, N11. – P. 3052-3060.
13. Windsor M.A., Malkowski M.G. Substrate-Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2: Development and Evaluation of Achiral Profen Probes // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2012. – V.3, N9. – P. 759-763.
14. Xu S., Hermanson D.J., Banerjee S. et al. Oxicams Bind in a Novel Mode to the Cyclooxygenase Active Site via a Two-water-mediated H-bonding Network // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – V.289, N10. – P. 6799-6808.
15. Xu S., Uddin J.Md., Banerjee S. et al. Fluorescent indomethacin-dansyl conjugates utilize the membrane-binding domain of Cyclooxygenase-2 to block the opening to the active site // *Journal Biological Chemistry*. – 2019. – V.294, N22. – P. 8690-8698.
16. Wang J.L., Limburg D., Graneto M.J. et al. The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – V.20, N23. – P. 7159-7163.
17. Xu S., Uddin M.J., Banerjee S. et al. Harmaline Analogs as Substrate-Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – V.11, N10. – P. 1881-1885.
18. Xu S., Goodman M.C., Rouzer C.A. et al. Dual cyclooxygenase-fatty acid amide hydrolase inhibitor exploits novel binding interactions in the cyclooxygenase active site // *Enzymology*. – 2018. – V.293, N9. – P. 3028-3038.
19. Xu S. Windsor M.A., Valket P.L. et al. Exploring the molecular determinants of substrate-selective inhibition of cyclooxygenase-2 by lumiracoxib // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2013. – V.23, N21. – P. 5860-5864.

Информация об авторе

Сауц Артур Валерьевич – кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры процессов и аппаратов химической технологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, доцент кафедры медиакоммуникаций и рекламы ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский университет технологий управления и экономики». E-mail: artur.sautc@pharminnotech.com

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.08.2024

Принята к печати 12.12.2024