

К. В. Андрюков, Л. М. Коркодинова

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ В ИЗУЧЕНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИДОВ И ГИДРАЗИДОВ N-АРОИЛЗАМЕЩЕННЫХ ГАЛОГЕН(Н)АНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ С ЦИКЛООКСИГЕНАЗОЙ 1, ПРОЯВЛЯЮЩИХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ

ФГБОУ ВО "Пермская государственная фармацевтическая академия", Россия, 614990, Пермь, ул. Полевая, 2; e-mail: k_andrukov@mail.ru

Описан молекулярный докинг 22 амидов и гидразидов N-ароилзамещенных галоген(Н)антраниловых кислот с ферментом ЦОГ-1. Исследована зависимость ПВА от скоринговых функций ($Ve_{\text{ЦОГ1}}$, $Ime_{\text{ЦОГ1}}$, $Ki_{\text{ЦОГ1}}$) и констант липофильности ($\log P_{\text{расч}}$). Выбрано оптимальное уравнение регрессии для поиска биологически активных соединений ПВА_{расч.} = -42,1907 - 1,1029 · $Ve_{\text{ЦОГ1}}$ - 7,9806 · $Ime_{\text{ЦОГ1}}$ + 8,7036 · $\log P_{\text{расч}}$. ($R = 0,902$, $F = 26,32$, $S = 8,14$, $N = 22$, $Q_{\text{LOO}}^2 = 0,73$). Выполнена проверка прогноза ПВА_{расч.} на 6 соединениях и выявлена их взаимосвязь с экспериментальной ПВА_{эсп.} ($R = 0,909$).

Ключевые слова: антраниловая кислота; молекулярный докинг; энергия докинга; константа липофильности ($\log P$); противовоспалительная активность.

Циклооксигеназа (ЦОГ) является одним из ключевых ферментов, принимающих участие в развитии воспаления. ЦОГ при взаимодействии с арахидоновой кислотой образует простагландины, которые являются источником воспаления. Классические нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) действуют на ЦОГ [1] и приводят к снижению синтеза простагландинов и тромбоксанов. Ингибирование ЦОГ обеспечивает как полезные эффекты НПВС (например, противовоспалительный, жаропонижающий и обезболивающий), так и нежелательные побочные эффекты (например, раздражение ЖКТ вследствие снижения выработки слизи в желудке и кишечнике и желудочные кровотечения). Соединения из ряда производных антраниловой кислоты обладают широким спектром биологического действия, в том числе и противовоспалительного [2–4].

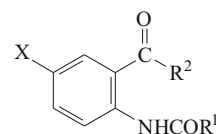
Целью работы является исследование взаимодействия производных антраниловой кислоты с ферментом ЦОГ-1 методом молекулярного докинга программой AutoDock 4 с использованием скоринговых функций и составление уравнений структура — противовоспалительная активность (ПВА).

Структуры всех лигандов построены и оптимизированы методом молекулярной механики (метод ММ2) и затем конвертированы в 3D-формат (.pdb) с помощью программы ChemBio3D Ultra 12,0. Моделирование лиганд-рецепторных взаимодействий осуществляли программой AutoDock 4.0 в составе программного комплекса MGL Tools 1.5.6 с использованием Ламарковского генетического алгоритма, который позволяет воспроизводить строение комплексов более точно. При проведении молекулярного докинга мы использовали трёхмерную модель молекулы ЦОГ-1, информация о которой получена из базы данных RCSB Protein Data Bank: PDB ID code: 3N8X [5]. Изначально все молекулы воды были удалены из структуры белка. Файлы рецептора и лигандов конвертировали в формат

PDBQT-файла с добавлением недостающих атомов водорода и частичных атомных зарядов по методу Гастейгера.

В процедуре докинга при построении Grid-карт за центр взяты координаты лиганда ($x = -19,44$, $y = -54,38$, $z = 6,07$) с координатами точек ($60 \times 60 \times 60$) вокруг каждого моделируемого участка. В результате получены 22 Grid-карты по параметрам для исследуемых соединений. Оценку качества позиционирования характеризовали величиной RMSD, представляющей собой среднеквадратичное отклонение положения лиганда после докинга от его начального положения в белке.

В качестве активного сайта принят участок макромолекулы фермента ЦОГ-1, содержащий аминокислоты (SER530, TYR385, ARG120, TYR355, ALA527, MET113, LEU531, VAL116, VAL349, ILE523, PHE518, LEU352, PHE381, TRP387, LEU359, ALA527, ILE517, LEU384) [5]. Значимым считали взаимодействие по аминокислоте SER530 с образованием водородной связи.



X = H, $R^1 = C_6H_4$ (4-Br), $R^2 = NHCH_2CH = CH_2$ (I); X = H, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHCH_2CH = CH_2$ (II); X = Br, $R^1 = C_6H_4$ (2-COON), $R^2 = NH_2$ (III); X = Br, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHC_6H_{11}$ (циклогексил) (IV); X = I, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHCH_2C_6H_5$ (V); X = H, $R^1 = C_6H_4$ (4-NO₂), $R^2 = NHCH_2CH = CH_2$ (VI); X = Br, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHHNCOCH_2Cl$ (VII); X = Br, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHCH_2CH_2CH(CH_3)_2$ (VIII); X = Br, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHCH_3$ (IX); X = Br, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHCH_2C_6H_5$ (X); X = I, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHCH_3$ (XI); X = H, $R^1 = C_6H_4$ (3, 4, 5-(OCH₃)₃), $R^2 = NHCH_2CH = CH_2$ (XII); X = Br, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHHNCOCH_2CH_2CH_3$ (XIII); X = Br, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHHNCO(2$ -фурил) (XIV); X = Br, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHHNCOCH_2C_6H_5$ (XV); X = Br, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHHNCO C_6H_4$ (2-COON) (XVI); X = I, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = N(CH_3)_2$ (XVII); X = Br, $R^1 = C_6H_4$ (2-OCH₃), $R^2 = NH_2$ (XVIII); X = Br, $R^1 = C_6H_4$ (3-NO₂), $R^2 = NH_2$ (XIX); X = Br, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHHN_2$ (XX); X = H, $R^1 = C_6H_4$ (4-OCH₃), $R^2 = NHCH_2CH = CH_2$ (XXI); X = I, $R^1 = C_6H_5$, $R^2 = NHCH_2CH_2OH$ (XXII).

Значения скоринговых функций, $\log P_{\text{расч.}}$ и ПВА_{эсп.}

Соединение	Водородная связь	$K_{i\text{ЦОГ1}}$	$Be_{\text{ЦОГ1}}$	$Ime_{\text{ЦОГ1}}$	$\log P_{\text{расч.}}$	ПВА _{эсп.} , %
I	SER530, ALA527	25,18	-6,27	-7,77	2,52	33,60
II	SER530, TYR355, ARG120	2,23	-7,71	-9,20	3,04	66,30
III	SER530, TYR385, ARG120	2,45	-7,65	-9,15	2,71	59,95
IV	SER530, TYR355, ARG120	221,22	-9,08	-10,27	3,26	63,65
V	ARG120	547,63	-8,54	-10,03	3,24	60,05
VI	SER530, ARG120	26,46	-2,15	-3,94	1,65	-8,10
VII	SER530, TYR355, ARG120	6,95	-7,04	-8,53	3,21	46,40
VIII	TYR385	8,21	-6,94	-8,73	3,22	31,65
IX	TYR385	84,41	-5,56	-6,45	3,09	19,55
X	ARG120, TYR385	207,33	-9,12	-10,61	3,27	60,25
XI	SER530, TYR355, ARG120	12,43	-6,69	-7,59	2,98	36,15
XII	SER530	11,24	-2,66	-5,05	3,92	22,70
XIII	TYR355, ARG120, ALA527	20,10	-6,41	-8,20	3,39	35,65
XIV	ARG120	3,77	-7,40	-8,89	3,95	42,05
XV	SER530	2,05	-3,67	-5,46	3,46	28,20
XVI	ARG120	288,77	-4,83	-6,92	3,60	33,65
XVII	SER530	3,28	-7,48	-8,38	3,15	51,50
XVIII	SER530	2,62	-7,62	-8,81	2,86	46,30
XIX	SER530, ARG120	2,49	-7,65	-8,84	1,48	46,15
XX	SER530	8,47	-6,92	-8,11	3,10	41,05
XXI	ARG120	122,83	-5,34	-7,12	2,91	36,50
XXII	SER530	107,04	-5,42	-7,21	2,75	21,30
Мефенамовая кислота	SER530	1,28	-6,36	-7,89	5,12	46,20

В качестве объекта исследования использовали амиды и гидразиды N-ароилзамещенных галоген(H)-антраниловых кислот (I – XXII), 22 соединения, структура, спектральные характеристики и результаты экспериментального определения ПВА (ПВА_{эсп.}) опубликованы в работах [2, 6, 7].

В результате проведенного докинга по ЦОГ-1 получены скоринговые функции: энергия связывания (Binding energy, $Be_{\text{ЦОГ1}}$), межмолекулярная энергия (Intermolecular energy, $Ime_{\text{ЦОГ1}}$) и константа ингибирования ($K_{i\text{ЦОГ1}}$), характеризующие взаимодействие лиганда с рецептором (ЦОГ-1), а исходя из квантово-химических параметров, полученных программой Gaussian 03 по соответствующим уравнениям, проведен расчёт констант липофильности ($\log P_{\text{расч.}}$) (табл. 1) [8].

Экспериментальные данные ПВА (ПВА_{эсп.}) приведены через 4 ч, а для соединений, у которых торможение отёка определено через 3 и 5 ч, взят усредненный вариант. Целесообразность выбранного подхода описана в работах [3, 4].

Связывающий участок ЦОГ-1 состоит из аминокислот (SER530, ARG120, TYR385 и ALA527), образующих водородные связи с атомом кислорода карбонильных групп ($C=O$) в амидном ($CONH$) и NH-ацильном фрагментах ($NHCO$) молекулы исследуемых веществ.

Проведен множественный линейный регрессионный анализ с использованием программы Statistica 6 пошаговым включением параметров, зависимости ПВА_{эсп.} от $Be_{\text{ЦОГ1}}$, $Ime_{\text{ЦОГ1}}$, $\log P_{\text{расч.}}$ и $K_{i\text{ЦОГ1}}$. В результате составлено 36 уравнений, из которых выбрали 3 уравнения с наибольшими значениями коэффициента множественной регрессии (R), критерия Фишера (F) и минимальным значением средней квадратичной ошибки (S) (табл. 2).

Проведена оценка составленных уравнений методом перекрестного контроля с выбором по одному (Leave-one-out Cross-validation, LOO) (Q_{LOO}^2) с использованием программы Statographics. Определен коэффициент детерминации предсказаний Q_{LOO}^2 , показывающий значимость составленных уравнений.

Таблица 2

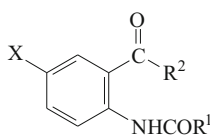
Уравнения регрессии зависимости ПВА_{эсп.} от дескрипторов $\log P_{\text{расч.}}$, $Be_{\text{ЦОГ1}}$, $Ime_{\text{ЦОГ1}}$ и $K_{i\text{ЦОГ1}}$

№	Уравнение регрессии	R	F	S	N	Q_{LOO}^2
1	$PVA_{\text{расч.}} = -37,2250 + 1,0669 \cdot Be_{\text{ЦОГ1}} - 10,5279 \cdot Ime_{\text{ЦОГ1}}$	0,894	38,22	8,20	22	0,72
2	$PVA_{\text{расч.}} = -42,1907 - 1,1029 \cdot Be_{\text{ЦОГ1}} - 7,9806 \cdot Ime_{\text{ЦОГ1}} + 8,7036 \cdot \log P_{\text{расч.}}$	0,902	26,32	8,14	22	0,73
3	$PVA_{\text{расч.}} = -43,2762 - 0,8318 \cdot Be_{\text{ЦОГ1}} - 8,3497 \cdot Ime_{\text{ЦОГ1}} + 3,7462 \cdot \log P_{\text{расч.}} - 0,0030 \cdot K_{i\text{ЦОГ1}}$	0,852	18,70	8,67	22	0,62

Значения $Ve_{ЦОГ}$, $Ime_{ЦОГ}$, $\log P_{расч.}$, $PBA_{расч.}$ и $PBA_{экс.}$

Соединение	$Ve_{ЦОГ}$	$Ime_{ЦОГ}$	$\log P_{расч.}$	$PBA_{расч.}$	$PBA_{экс.}$
XXIII	-4,94	-6,73	3,17	28,71	25,10
XXIV	-8,92	-10,11	2,64	58,12	55,50
XXV	-7,96	-8,86	2,46	46,44	51,85
XXVI	-7,32	-8,22	2,50	40,75	32,70
XXVII	-5,16	-6,95	3,17	30,71	21,15
XXVIII	-6,73	-7,62	2,44	35,11	38,75

Из 3 выбранных уравнений регрессии зависимости $PBA_{экс.}$ от дескрипторов наилучшие результаты получены для уравнения 2 ($R = 0,902$, $F = 26,32$, $S = 8,14$, $Q_{ЛО}^2 = 0,73$), которое было положено в основу прогноза $PBA_{расч.}$ на примере 6 соединений (XXIII – XXVIII) из ряда производных антралиновой кислоты.



$X = I$, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHCH_2CH_2OH$ (XXIII); $X = Br$, $R^1 = C_6H_4$ (4-Cl), $R^2 = NHC_6H_5$ (XXIV); $X = Br$, $R^1 = C_6H_4$ (4-CH₃), $R^2 = NH_2$ (XXV); $X = I$, $R^1 = C_6H_5$, $R^2 = NHCH_3$ (XXVI); $X = Br$, $R^1 = 2$ -фурил, $R^2 = NHCH_2CH_2OH$ (XXVII); $X = Br$, $R^1 = C_6H_5$, $R^2 = NH_2$ (XXVIII).

Результаты прогнозируемых значений $PBA_{расч.}$ и экспериментально найденных ($PBA_{экс.}$) оказались близки (табл. 3, 4).

Для оценки качества прогноза ($PBA_{расч.}$) составлено линейное уравнение взаимосвязи с экспериментальными значениями ($PBA_{экс.}$):

$$PBA_{расч.} = 0,71 \cdot PBA_{экс.} + 13,03; R_{прогн.} = 0,909.$$

Линейная зависимость уравнения с коэффициентом корреляции ($R_{прогн.} = 0,909$) показывает высокую степень связи $PBA_{расч.}$ с $PBA_{экс.}$

Таким образом, выбрано оптимальное уравнение регрессии взаимосвязи структура — противовоспалительная активность с использованием метода молекулярного докинга для поиска биологически активных соединений в ряду производных антралиновой кислоты.

Экспериментальная часть

Противовоспалительное действие соединений XXIII – XXVIII (табл. 4) исследовали на белых нелинейных крысах массой 200 – 220 г на модели каррагенинового отёка. Изучаемые вещества вводили внутривентриально в дозе 50 мг/кг в виде водной суспензии, стабилизированной твином-80, за 1 ч до инъекции флогогена. Крысам контрольной серии вводили эквивалентное количество раствора твина. Каждое соединение испытывали на 5 животных. О силе антиэкссудативного эффекта судили по степени ингибирования воспалительной реакции в % к контролю. Объем лап животных измеряли онкометрически до и через 3 и 5 ч после инициации воспаления [9]. Эффект оценивали по уменьшению прироста отека лап в сравнении с контрольной группой крыс. Статистическую обработку данных проводили с использованием коэффициента Стьюдента. Эффект считали достоверным при $p \leq 0,05$.

Таблица 4

Результаты экспериментального определения противовоспалительной активности соединений (XXII – XXVIII)

Соединение	Прирост объёма стопы, %		Торможение отёка, %		
	3 ч	5 ч	3 ч	5 ч	4 ч
XXIII	54,0 ± 6,40	59,1 ± 6,40	23,5*	26,7*	25,10
Контроль	70,6 ± 6,30	80,6 ± 0,60			
XXIV	44,0 ± 8,80	42,1 ± 7,40	54,3*	56,7*	55,50
Контроль	96,4 ± 9,50	97,40 ± 7,60			
XXV	25,1 ± 3,40	24,6 ± 2,80	51,4*	52,3*	51,85
Контроль	51,6 ± 6,87	51,6 ± 4,61			
XXVI	64,5 ± 2,92	87,3 ± 6,38	38,1*	27,3*	32,70
Контроль	104,3 ± 9,21	120,0 ± 10,0			
XXVII	32,9 ± 5,43	39,9 ± 5,13	7,1*	35,2*	21,15
Контроль	35,4 ± 1,03	61,6 ± 3,66			
XXVIII	45,2 ± 6,17	50,0 ± 4,70	42,0*	35,5*	38,75
Контроль	77,8 ± 8,70	77,5 ± 6,30			

* $p \leq 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. Bouaziz-Terrachet, A. Toumi-Maouche, *J. Mol. Model.*, **16**, 1919 – 1929 (2010).
2. А. В. Долженко-Подчерзцева, Л. М. Коркодинова, М. Ю. Васильюк и др., *Хим.-фарм. журн.*, **36**(12), 12 – 13 (2002); *Pharm. Chem. J.*, **36**(12), 647 – 648 (2002).
3. Л. М. Коркодинова, К. В. Андрюков, Г. А. Вейхман и др., *Фундам. исслед.*, **6**(6), 1468 – 1472 (2013).
4. К. В. Андрюков, Л. М. Коркодинова, *Фундам. исслед.*, **3**(3), 533 – 538 (2014).
5. R. S. Sidhu, J. Y. Lee, C. Yuan, *J. Biochemistry*, **49**, 7069 – 7079 (2010).
6. К. В. Андрюков, *Дис. канд. фармац. наук*, Пермь (2006).
7. Е. Р. Курбатов, *Дис. канд. фармац. наук*, Пермь (2006).
8. К. В. Андрюков, Л. М. Коркодинова, *Хим.-фарм. журн.*, **47**(12), 38 – 41 (2013); *Pharm. Chem. J.*, **47**(12), 660 – 663 (2014).
9. *Методические рекомендации по экспериментальному доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных фармакологических веществ*, Москва (1982).

Поступила 21.06.15

MOLECULAR DOCKING STUDY OF THE INTERACTION OF CYCLOOXYGENASE 1 WITH N-AROYL-SUBSTITUTED HALOGEN(H)ANTHRANILIC ACID AMIDES AND HYDRAZIDES EXHIBITING ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

K. V. Andryukov* and L. M. Korkodinova

Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, 614990 Russia

* e-mail: kandrukov@mail.ru

Molecular docking of 22 amides and hydrazides of N-aryl-substituted halogen(H)-anthranilic acids with cyclooxygenase 1 (COX-1) enzyme is described. Dependence of the anti-inflammatory activity (AIA) on scoring functions (Be_{COX1} , Ime_{COX1} , and K_{COX1}) and lipophilicity constants ($\log P_{calc}$) has been studied. Selected optimum regression equation for the search of biologically active compounds is $AI_{Acalc} = -42.1907 - 1.1029 \cdot Be_{COX1} - 7.9806 \cdot Ime_{COX1} + 8.7036 \cdot \log P_{calc}$ ($R = 0.902$, $F = 26.32$, $S = 8.14$, $N = 22$, and $Q_{LOO}^2 = 0.73$). The forecast of AI_{Acalc} checked on 6 compounds revealed their relationship with experimental AI_{Aexp} ($R = 0.909$).

Keywords: anthranilic acid; molecular docking; docking energy; lipophilicity constant ($\log P$); anti-inflammatory activity.