

СТАТЬИ

УДК 615.276:615.011.4:577.151.042:547.583.5

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ В ИССЛЕДОВАНИИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИДОВ И ГИДРАЗИДОВ
N-АРОИЛЗАМЕЩЕННЫХ АНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ
С МУТАНТНОЙ ФОРМОЙ 5-ЛИПОКСИГЕНАЗЫ В ПОИСКЕ
СОЕДИНЕНИЙ С ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ****Андрюков К.В.***ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»**Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, e-mail: k_andrukov@mail.ru*

Методом молекулярного моделирования с использованием молекулярного докинга построены трехмерные модели исследования взаимодействия амидов и гидразидов N-ароилзамещенных антралиловых кислот с мутантной формой 5-липоксигеназы. Выполнен расчет новых конформаций для двадцати гомологов производных антралиловой кислоты ингибированием активного участка фермента. Расчет и построение новых конформаций проводили с помощью программного комплекса MGL Tools. Молекулярное конструирование производных амидов и гидразидов N-ароилзамещенных антралиловых кислот выполняли в активную ячейку фермента 5-липоксигеназы (PDB ID: 3v99), содержащей арахидоновую кислоту. Анализ результатов расчета новых конформаций проводили по RMSD относительно арахидоновой кислоты. Энергия связывания с 3V99 по величине $Be_{s,log}$ получена в интервале от -3,24 до -5,92 ккал/моль и характеризует низкое сродство исследуемых веществ к данной мутантной форме фермента. Оценку взаимодействия с использованием конформаций проводили так же по межмолекулярной энергии ($Ime_{s,log}$) и ингибированию константе ($Ki_{s,log}$). Максимальное значение энергии связывания с 5-липоксигеназой, равное -5,92 ккал/моль, найдено по конформации № 9 с RMSD = 7,17 для соединения IV, межмолекулярная водородная связь при этом образуется по аминокислоте аргинин (ARG596). Осуществлена проверка результатов моделирования на экспериментальных данных торможения каррагенинового отека с помощью множественного линейного регрессионного анализа.

Ключевые слова: антралиловая, молекулярный докинг, 5-липоксигеназа, противовоспалительная активность**MOLECULAR DOCKING IN THE STUDY OF THE INTERACTION OF AMIDES
AND HYDRAZIDES OF N-AROYL-SUBSTITUTED ANTHRANILIC ACIDS
WITH THE MUTANT FORM OF 5-LIPOXYGENASE IN THE SEARCH
FOR COMPOUNDS WITH ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY****Andryukov K.V.***Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, e-mail: k_andrukov@mail.ru*

Three-dimensional models for studying the interaction of amides and hydrazides of N-aroyl substituted anthranilic acids with the mutant form of 5-lipoxygenase were constructed using molecular modeling with molecular docking. The calculation of new conformations for twenty homologues of anthranilic acid derivatives by inhibition of the active site of the enzyme was performed. Calculation and construction of new conformations were carried out using the MGL Tools software package. Molecular construction of derivatives of amides and hydrazides of N-aroyl substituted anthranilic acids was performed in the active cell of the enzyme 5-lipoxygenase (PDB ID: 3v99) containing arachidonic acid. The analysis of the results of the calculation of new conformations was carried out by RMSD with respect to arachidonic acid. The binding energy with 3V99 in the Be_{5-LOG} value was obtained in the range from -3,24 to -5,92 kcal/mol and characterizes the low affinity of the studied substances to this mutant form of the enzyme. The evaluation of the interaction using conformations was also carried out by intermolecular energy (Ime_{5-LOG}) and inhibition constant (Ki_{5-LOG}). The maximum binding energy with 5-lipoxygenase equal to -5,92 kcal/mol was found by conformation no. 9 with RMSD= 7,17 for compound IV, an intermolecular hydrogen bond is formed by the amino acid arginine (ARG596). The simulation results were verified on experimental data of carrageenan edema inhibition using multiple linear regression analysis.

Keywords: anthranilic, molecular docking, 5-lipoxygenase, anti-inflammatory activity

Воспаление является нормальной реакцией на любой вредный раздражитель, угрожающий организму, и может варьироваться от локализованной до генерализованной реакции. Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) достигают своего противовоспалительного действия за счет ингибирующего действия на фермент циклооксигеназу (ЦОГ), белок необходим

для биосинтеза простагландинов из арахидоновой кислоты. ЦОГ существует в двух изоформах, а именно ЦОГ-1 и ЦОГ-2. В общих чертах, ЦОГ-1 отвечает за защиту слизистой оболочки желудка и поддержание гомеостаза, тогда как ЦОГ-2 индуцируется провоспалительными стимулами в очагах воспаления. Арахидоновая кислота является одним из основных компонентов фос-

фолипидов клеточных мембран и действует как нормальный субстрат для различных ферментов, таких как 5-липоксигеназа (5-ЛОГ) [1] и ЦОГ [2].

5-ЛОГ метаболизирует арахидоновую кислоту с образованием лейкотриенов, которые являются медиаторами при астме и воспалении, и инициирует биосинтез провоспалительных лейкотриеновых липидных медиаторов и вместе с 15-ЛОГ также необходима для синтеза противовоспалительных липоксинов. 5-липоксигеназа (5-ЛОГ) является одним из трех основных изоферментов, участвующих в метаболическом процессе арахидоновой кислоты, и существует в виде компенсаторного механизма с ЦОГ [3]. Лейкотриены (ЛТ), в конечном счете продуцируемые ЛОГ-путем, рассматриваются как важные медиаторы воспалительных и аллергических заболеваний и, как полагают, тесно связаны с раком и сердечно-сосудистыми заболеваниями [4]. Каталитическая активность 5-ЛОГ регулируется с помощью множества механизмов, включая Ca(2+)-направленное связывание с мембраной и фосфорилирование по специфическим сериновым остаткам. Следовательно, можно снизить потенциальный риск сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с НПВП, путем ингибирования 5-ЛОГ и снижения синтеза ЛТ.

Биологическая активность производных антралиловой кислоты характеризуются широким спектром: анальгетической, противомикробной, в том числе и противовоспалительной [5, 6] и антиоксидантной [7].

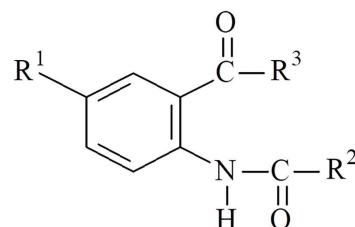
Целью данной работы является расчет новых конформаций для двадцати гомологов ряда амидов и гидразидов N-ароил антралиловых кислот моделированием связывания с 5-ЛОГ, а также проверка результатов моделирования на экспериментальных данных торможения каррагенинового отека с помощью регрессионного анализа.

Материалы и методы исследования

Молекулярное моделирование исследуемых соединений ряда антралиловой кислоты осуществляли с помощью: ChemDraw и Gaussian 03. Расчет анализируемых конформаций с 5-липоксигеназой с PDB ID Code: 3v99 [8] проводили программным комплексом MGL Tools и AutoDock 4.2.. Подготовку исследуемых производных для молекулярного докинга AutoDock 4.2 осуществляли переводением веществ в трехмерный формат (.pdb) программой Marvin Sketch. Проверку результатов моделирования осуществляли на экспериментальных данных торможения каррагенинового отека программой Statistica 6.

Результаты исследования и их обсуждение

Молекулярное моделирование двадцати гомологов (I–XX) амидов и гидразидов N-ароил антралиловых кислот проводили программой ChemDraw.



R¹ = H, R² = 4-BrC₆H₄, R³ = NHCH₂CH=CH₂ (I);
 R¹ = H, R² = 2-фурил, R³ = NHCH₂CH=CH₂ (II);
 R¹ = Br, R² = 2-COON C₆H₄, R³ = NH₂ (III); R¹ = I,
 R² = 2-фурил, R³ = NHCH₂C₆H₅ (IV); R¹ = H,
 R² = 4-NO₂C₆H₄, R³ = NHCH₂CH=CH₂ (V); R¹ = Br,
 R² = 2-фурил, R³ = NHNHCOCH₂Cl (VI); R¹ = Br,
 R² = 2-фурил, R³ = NHCH₂CH₂CH(CH₃)₂ (VII);
 R¹ = Br, R² = 2-фурил, R³ = NHCH₃ (VIII); R¹ = I,
 R² = -фурил, R³ = NHCH₃ (IX); R¹ = H, R² = 3, 4,
 5-(OCH₃)₃C₆H₂, R³ = NHCH₂CH=CH₂ (X); R¹ = Br,
 R² = 2-фурил, R³ = NHNHCOCH₂CH₂CH₃ (XI);
 R¹ = Br, R² = 2-фурил, R³ = NHNHCO(2-фурил)
 (XII); R¹ = Br, R² = 2-фурил, R³ = NHNHCO-
 CH₂C₆H₅ (XIII); R¹ = Br, R² = 2-фурил,
 R³ = NHNHCO 2-COON C₆H₄ (XIV); R¹ = I,
 R² = 2-фурил, R³ = N(CH₃)₂ (XV); R¹ = Br,
 R² = 2-OCH₃C₆H₄, R³ = NH₂ (XVI); R¹ = Br,
 R² = 3-NO₂C₆H₄, R³ = NH₂ (XVII); R¹ = Br,
 R² = 2-фурил, R³ = NHNH₂ (XVIII); R¹ = H, R² =
 4-OCH₃C₆H₄, R³ = NHCH₂CH=CH₂ (XIX);
 R¹ = I, R² = C₆H₅, R³ = NHCH₂CH₂OH (XX).

Спектральные характеристики и результаты экспериментального определения противовоспалительной активности ПВА (ПВА_{эсп.}) на модели торможения каррагенинового отека объекта исследования (I–XX) опубликованы в работе [9].

Для проведения расчета новых конформаций исследуемых амидов и гидразидов N-ароил антралиловых кислот выполняли молекулярный докинг с мутантной формой 5-ЛОГ с 10 мутациями [8].

Наш выбор биологической мишени основан на публикации, посвященной исследованию различных форм 5-ЛОГ, полученных из так называемой человеческой стабильной формы фермента 5-ЛОГ, в которой авторы отмечают, что модель 3V99 по своему составу предназначена для исследования связывания с субстратом в качестве структурной основы.

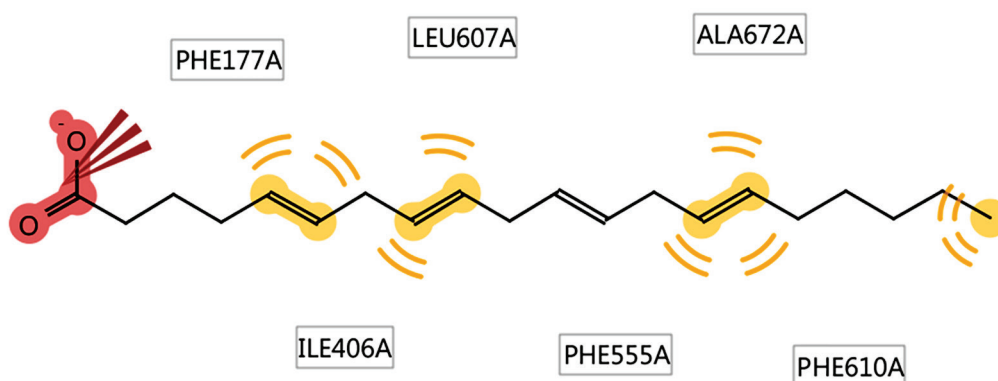


Рис. 1. Диаграмма взаимодействия арахидоновой кислоты с 5-ЛОГ

Таблица 1

Результаты молекулярного докинга по 5-ЛОГ:
номер конформации, скоринговые функции
и остатки аминокислот с водородной связью (Н-связь) и ПВА_{эксп.}

№	Конформация №	Н-связь (5-ЛОГ)	Ki _{5-ЛОГ}	Be _{5-ЛОГ}	Ime _{5-ЛОГ}	ПВА _{эксп.} , %
I	3	нет	463,25	-4,55	-6,04	33,60
II	3	нет	155,06	-5,20	-6,69	66,30
III	3	ARG596	63,81	-5,72	-7,21	59,95
IV	9	ARG596	45,81	-5,92	-7,41	60,05
V	6	GLY431, CYS300	1,77	-3,75	-5,54	-8,10
VI	9	ARG596	112,45	-5,39	-6,88	46,40
VII	4	ASN180	362,25	-4,69	-6,48	31,65
VIII	3	ARG596	618,84	-4,38	-5,27	19,55
IX	7	нет	720,52	-4,29	-5,18	36,15
X	7	ARG596	4,05	-3,26	-5,65	22,70
XI	10	ARG596	500,34	-4,50	-6,29	35,65
XII	2	GLY430, HIS432	346,25	-4,72	-6,21	42,05
XIII	5	нет	4,25	-3,24	-5,03	28,20
XIV	9	ARG596, GLN363	201,13	-5,04	-7,13	33,65
XV	10	ASN180	161,22	-5,17	-6,07	51,50
XVI	9	ARG596	147,86	-5,23	-6,42	46,30
XVII	7	GLY430, ASP293	473,06	-4,54	-5,73	46,15
XVIII	10	нет	347,11	-4,72	-5,91	41,05
XIX	10	нет	1,09	-4,04	-5,83	36,50
XX	8	нет	1,10	-4,03	-5,82	21,30

Кроме того, активный центр модели 3V99 находится в открытой конфигурации, доступной для второй небольшой молекулы – исследуемого лиганда.

Для оптимизации дизайна исследования методом молекулярного докинга и проведения расчета новых конформаций необходимо было выявить и локализовать сайт связывания лигандов с биологической ми-

шенью, в пределах которого проводилось дальнейшее моделирование.

Локализацию сайта связывания проводили на основе комплекса внутри исследуемой мутантной формы 5-ЛОГ: арахидоновой кислоты с активным участком (рис. 1).

На рис. 1 изображен комплекс арахидоновой кислоты с активным участком 5-ЛОГ.

Диаграмма, представленная на рис. 1, показывает наличие ионизационных и гидрофобных взаимодействий. Ионизационная связь образуется по карбоксильной группе арахидоновой кислоты с остатком фенилаланина (PHE177). Структурные фрагменты арахидоновой кислоты, содержащие двойные связи и алкильный радикал, гидрофобно ориентируются рядом с остатками фенилаланина (PHE177, PHE555, PHE610), изолейцина (ILE406), лейцина (LEU607), аланина (ALA672). Локальный участок связывания внутри 5-ЛОГ мы определили в координатах: $x=16,91, y=-72,12, z=-47,24$.

Далее проводили построение 20 Grid-карт ($x=16,91, y=-72,12, z=-47,24$), с координатами точек ($60 \times 60 \times 60$) внутри исследуемой ячейки 5-ЛОГ. Выполнен расчет 10 конформаций по каждому исследуемому амиду и гидразиду N-ароил антрапиновой кислоты. Анализ результатов расчета новых конформаций проводили по RMSD относительно арахидоновой кислоты. Полученные конформации по каждому исследуемому соединению представлены в табл. 1.

Анализ результатов расчета новых конформаций приведен в табл. 1 в виде энергии докинга ($Ve_{5-ЛОГ}$) и скоринговых функций,

характеризующих межмолекулярные взаимодействия (межмолекулярная энергия ($Ime_{5-ЛОГ}$)) и количество вещества, необходимое для связывания активного участка (константа ингибирования ($Ki_{5-ЛОГ}$)).

Наибольшее значение энергии связывания с 5-ЛОГ, равное $-5,92$ ккал/моль, найдено по конформации № 9 для соединения IV (рис. 2), межмолекулярная связь показывает взаимодействие карбонильной группы в NH-ацильном фрагменте по аминокислоте аргинин (ARG 596).

Осуществлена проверка результатов моделирования на экспериментальных данных торможения каррагенинового отека с помощью множественного линейного регрессионного анализа. Проведено составление регрессионных многофакторных моделей зависимости и связи экспериментальных данных торможения каррагенинового отека с конформационным анализом.

Проверку осуществляли исследованием зависимости $PBA_{эксп.}$ от $Ve_{5-ЛОГ}, Ime_{5-ЛОГ}, Ki_{5-ЛОГ}$. Полученные результаты представлены уравнениями с наибольшими значениями коэффициента множественной регрессии (R), критерия Фишера (F) и минимальным значением средней квадратичной ошибки (S) (табл. 2).

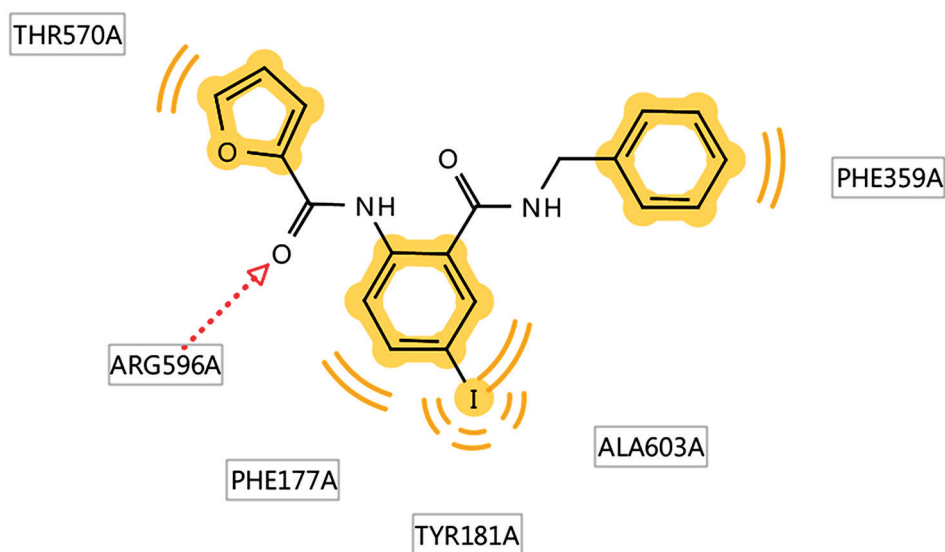


Рис. 2. Диаграмма взаимодействия соединения IV с 5-ЛОГ в активном участке фермента

Таблица 2

Уравнения регрессии зависимости $PBA_{эксп.}$ от $Ve_{5-ЛОГ}, Ime_{5-ЛОГ}, Ki_{5-ЛОГ}$

№	Уравнение регрессии	R	F	S	N
1	$PBA_{расч. 1} = -39,0983 - 18,8373 \times Ve_{5-ЛОГ} + 1,6908 \times Ime_{5-ЛОГ}$	0,762	11,77	11,47	20
2	$PBA_{расч. 2} = -42,9889 - 17,5416 \times Ve_{5-ЛОГ} - 0,0021 \times Ki_{5-ЛОГ}$	0,761	11,74	11,48	20

Выводы

1. Методом молекулярного моделирования построены трехмерные модели исследования взаимодействия амидов и гидразидов N-ароил антралиловых кислот с мутантной формой 5-ЛОГ.

2. Выполнен расчет новых двадцати конформаций взаимодействия исследуемых производных с мишенью 3v99 мутантной формы 5-липоксигеназы.

3. Осуществлена проверка результатов поиска соединений с ПВА на экспериментальных данных торможения каррагенинового отека, в результате получены две двухфакторные модели зависимости с высоким значением R в интервале от 0,761 до 0,762.

Список литературы

1. Hošek J., Leláková V., Bobal P., Pizova H., Gazdová M., Malanik M. Prenylated stilbenoids affect inflammation by inhibiting the NF- κ B/AP-1 signaling pathway and cyclooxygenases and lipoxygenase // *Journal of natural products*. 2019. Vol. 82, Is. 7. P. 1839–1848.

2. Abdelgawad M.A., Labib M.B., Ali W.A.M., Kamel G., Azouz A.A., El-Nahass E.S. Design, synthesis, analgesic, anti-inflammatory activity of novel pyrazolones possessing aminosulfonyl pharmacophore as inhibitors of COX-2/5-LOX enzymes:

Histopathological and docking studies // *Bioorganic chemistry*. 2018. Vol. 78. P. 103–114.

3. Walker C., Biasucci L.M. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs revisited // *Postgraduate Medicine*. 2018. Vol. 130, Is. 1. P. 55–71.

4. Koundouros N., Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer // *British journal of cancer*. 2020. Vol. 122, Is. 1. P. 4–22.

5. Han S.H., Suh H.S., Jo H., Oh Y., Mishra N.K., Han S., Kim I.S. Synthesis and anti-inflammatory evaluation of N-sulfonyl anthranilic acids via Ir (III)-catalyzed C–H amidation of benzoic acids // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2017. Vol. 27, Is. 10. P. 2129–2134.

6. Du L., Du S., Li J., Wang H. Design, synthesis, and biological evaluation of dual-target COX-2/5-LOX inhibitors for the treatment of inflammation // *Medicinal Chemistry Research*. 2023. Vol. 32, Is. 2. P. 218–238.

7. Kausar N., Muratza S., Raza M.A., Rafique H., Arshad M.N., Altaf A.A., Shafqat S.R. Sulfonamide hybrid schiff bases of anthranilic acid: synthesis, characterization and their biological potential // *Journal of Molecular Structure*. 2019. Vol. 118. P. 8–20.

8. Gilbert N.C., Rui Z., Neau D.B., Waight M.T., Bartlett S.G., Boeglin W.E., Newcomer M.E. Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663 // *The FASEB Journal*. 2012. Vol. 26, Is. 8. P. 3222–3229.

9. Шакирова А.Б., Подчезерцева А.В., Коркодинова Л.М., Васильева М.Ю., Колла В.Э., Марданова Л.Г., Вахрина Н.И., Данилов Ю.Л. Синтез, противовоспалительная и анальгетическая активности некоторых ариламидов N-замещенных антралиловых кислот // *Химико-фармацевтический журнал*. 2001. Т. 35, № 4. С. 193–195.