

О. Є. Ядловський, Л. С. Бобкова, О. Ю. Баглай,
А. М. Демченко, Т. А. Бухтіарова

Особливості супрамолекулярної взаємодії 6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]-тріазоло[4,3-a] азепінів з ізоформами циклооксигенази

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: тріазоло-азепіни, докінг-аналіз, інгібітори циклооксигенази, супрамолекулярна взаємодія

Попередніми дослідженнями було показано перспективність пошуку потенційних біологічно активних речовин (БАР) у рядах гетероциклічних нітрогеновмісних сполук, структура яких містить азепінове кільце, зокрема похідних 4-аміно-N-(4,5,6,7-тетрагідро-3H-азепін-2-іл)-бензенсульфонаміду [1]. Водночас залишається практично не розкритим фармакологічний потенціал сполук з базовим скаффолдом 6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]-тріазоло[4,3-a]азепіну. За сучасними підходами для дослідження фармакологічного потенціалу сполук застосовують *in silico* молекулярний докінг. Використання методу молекулярного докінгу дозволяє провести моделювання можливого механізму дії потенційної БАР і є важливим елементом цілеспрямованого пошуку нових лікарських засобів (ЛЗ), зокрема для регулювання болю та запалення [2–5]. Відповідно до сучасних уявлень підходи, що засновані на пошуку нових інгібіторів СОХ, є одним з пріоритетних напрямів цілеспрямованого пошуку нових препаратів для контролю болю та запалення [6–8].

Мета дослідження – вивчення та порівняльний аналіз особливостей

супрамолекулярних взаємодій похідних тріазоло-азепіну з циклооксигеназою (СОХ-1 і СОХ-2) та визначення їхніх перспектив як потенційних нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) з СОХ-залежним механізмом дії.

Матеріали та методи. Вибір мішеней для проведення докінгу. Як біомішені, що асоційовані з механізмом дії НПЗП, було вибрано й охарактеризовано за методом рентгеноструктурного аналізу три білка (3N8y, 5WBE; та 3LN1) з бази PDB (Protein Data Bank) [9]. Активний сайт зв'язування (або, як іноді також називають, кишень зв'язування) обох ізоферментів СОХ містить видовжену гідрофобну зону, на вході до якої є важливі залишки *Arg120*, *Tyr355*, а в його дистальній частині розташований залишок *Tyr385* – каталітичний центр для перетворень арахідонової кислоти. Відомо також, що активний сайт зв'язування СОХ-2 має додаткову зону, що пов'язана з СОХ-2-фармакофорами в структурі ліганду. Саме ці зони в активному сайті зв'язування СОХ є важливими для дослідження супрамолекулярних взаємодій нових лігандів і пошуку різноманітних потенційних інгібіторів з СОХ-залежним механізмом дії.

PDB – структури білків (3N8y, 5WBE; та 3LN1), які містили ліганди: молекули диклофенаку, мофезолаку та целекоксибу відповідно. Саме дикло-

фенак (1), мофезолак (селективний інгібітор COX-1) (2) і целекоксиб (високоселективний інгібітор COX-2) (3) були залучені до *in silico* досліджень нових сполук як препарати порівняння [10, 11] (рис. 1).

Вибір лігандів для проведення докінгу. Як ліганди використовували структури молекул на основі гетероциклу 6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]-тріазоло[4,3-а]азепіну, у третьому положенні якого були замісники зі структурними фрагментами препаратів порівняння, що значною мірою дозволить визначити вплив даного гетероциклу на позицію ліганду в активному сайті зв'язування. Такими фрагментами в структурах лігандів були *para*-метилсульфамойльний (COX-2 фармакофорна група), *para*-метилфенільний (один з ароматичних замісників молекули целекоксибу), *para*-метоксифенільний (ароматичний замісник молекули мофезолаку), вторинна аміногрупа (у структурі диклофенаку) та 1,2,4-тріазольний цикл (п'ятичленні азотовмісні гетероцикли: ізоксазолний у структурі мофезолаку та піразольний у структурі целекоксибу). Така модифікація структур лігандів передбачає також можливість зрозуміти роль тріазоло-азепінового та інших структурних фрагментів лігандів у супрамолекулярних взаємодіях з ізоформами COX.

Були досліджені ліганди на основі гетероциклу 6,7,8,9-тетрагідро-5H-

[1,2,4]-тріазоло[4,3-а]азепіну загальної формули (рис. 2).

У третьому положенні гетероциклу 6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]-тріазоло[4,3-а]азепіну були замісники зі структурними фрагментами препаратів порівняння (табл. 1).

Молекулярний докінг. Перед проведенням молекулярного докінгу з вибраних протеїнів видаляли молекули води та нативний ліганд. Побудову 3D-структур нового ліганду та наступну його оптимізацію проводили в силовому полі згідно з MMFF94x за RMSD градієнта 0,01 нм [12].

З метою пошуку оптимального розміщення молекули нового ліганду на білку COX для кожної молекули відповідно до умов експериментів виконано 32 дослідження. При цьому генерували різні варіанти зв'язування ліганду з протеїном, що враховували молекули з полярними атомами водню (P та L) та молекули з усіма атомами водню (PH і LH), з яких потім вибирали один оптимальний варіант. Підготовка файлів для AutodockVina виконана в форматі AutodockTools 1.5.6 [13]. Докінг досліджуваних молекул у COX проведений за програмою AutodockVina за умови, що передбачала гнучкий ліганд, жорсткий рецептор [14, 15]. За результатами докінгу здійснювали 2D- та 3D-візуалізацію, використовуючи програму LigPlot+ (версія 1.4) для дослідження можливих зв'язків

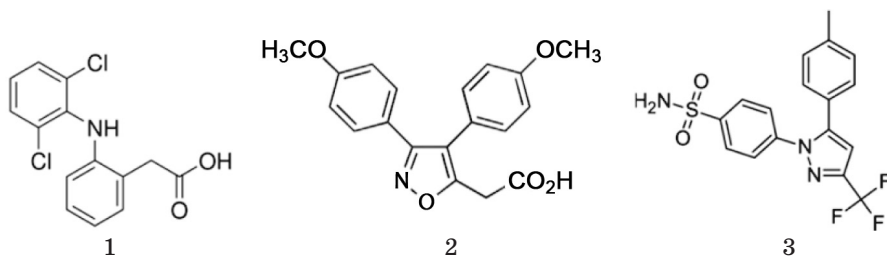


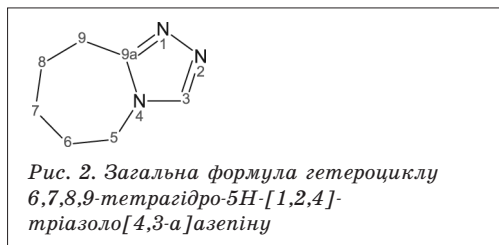
Рис. 1. Структури молекул диклофенаку, мофезолаку та целекоксибу

Примітка. 1 – диклофенак, $(COX-1) IC_{50} > (COX-2) IC_{50}$; 2 – мофезолак, $(COX-1) IC_{50} \ll (COX-2) IC_{50}$. 3 – целекоксиб, $(COX-1) IC_{50} \gg (COX-2) IC_{50}$ [10, 11].

Замісники у третьому положенні гетероциклу
6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]-тріазоло[4,3-а]азепіну

З-Р-замісник	Шифр сполуки	З-Р-замісник	Шифр сполуки
$C_6H_5NHCH_2-$	IFT-y2 / або IFT-384	C_6H_5-	IFT-674
$4'-Me-C_6H_4NHCH_2-$	IFT-386	$4'-Me-C_6H_4-$	IFT-670,
$4'-MeO-C_6H_4NHCH_2-$	IFT-298	$4'-MeO-C_6H_4-$	IFT-301
$4'-MeSO_2-C_6H_4NHCH_2-$	IFT-y3	$4'-MeSO_2-C_6H_4-$	IFT-y1
$2'-MeO-C_6H_4NHCH_2-$	IFT-392	$CH_3C(=O)NH-C_6H_4-$	IFT-2354

Примітка. Гетероцикл – шифр (IFT-y).



ліганду з амінокислотними залишками активного сайту зв'язування за схематичним 2D-зображенням [16]. Загальну оцінку положення ліганду в комплексі «ліганд – рецептор» і дослідження сайту зв'язування за амінокислотним оточенням ліганду в радіусі 4 ангстрем виконали за 3D-візуалізацією в програмі PyMol 2.3 [17].

Особливості супрамолекулярних взаємодій ізоформ COX з лігандами на основі гетероциклу 6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]-тріазоло[4,3-а]азепіну вивчали за докінговими формами їхніх комплексів порівняно з відповідними кристалографічними та редокінговими формами комплексів препаратів порівняння, а також лігандів між собою.

Редокінгові дослідження. Здійснили редокінг молекул препаратів порівняння щодо вибраних мішеней. Нативний ліганд видаляли з протеїну та повторно докували в сайт зв'язування, порівнюючи енергетичні параметри конформацій ліганду та визначаючи ідентичні позиції щодо нативної форми ліганду.

Редокінгові дослідження препаратів порівняння диклофенаку та мофезолаку до сайту зв'язування COX-1. Редокінг молекул диклофенаку (натрієвої солі та кислоти) в COX-1 проведено за методом напівгнучкого докінгу в програмному пакеті AutodockVina (гнучкий ліганд, жорсткий рецептор) з урахуванням усієї поверхні білкової молекули (без просторового обмеження зони зв'язування ліганду). Для диклофенаку натрію мінімальна вільна енергія зв'язування у COX-1 (3N8Y), яка отримана за умови врахування полярних атомів водню для молекул ліганду та рецептору, була -8,6 ккал/моль. Для диклофенаку (кислоти) за відповідних умов мінімальна вільна енергія зв'язування у COX-1 (3N8Y) була -8,4 ккал/моль. Аналогічно проведений редокінг мофезолаку у сайт зв'язування COX-1 (5WBE та 3N8Y). При цьому енергія зв'язування мофезолаку у COX-1 за аналогічних умов докінгу становила -8,3 ккал/моль і -7,4 ккал/моль відповідно. Візуалізацію молекул диклофенаку та мофезолаку в COX-1 наведено на рисунку 3.

Редокінгові дослідження молекули целекоксибу до сайту зв'язування COX-2. За даними проведеного молекулярного моделювання (редокінг, 3LN1) знайдено, що вільна енергія зв'язування комплексу «Целекоксиб – COX-2» за умови врахування полярних атомів водню для молекул ліган-

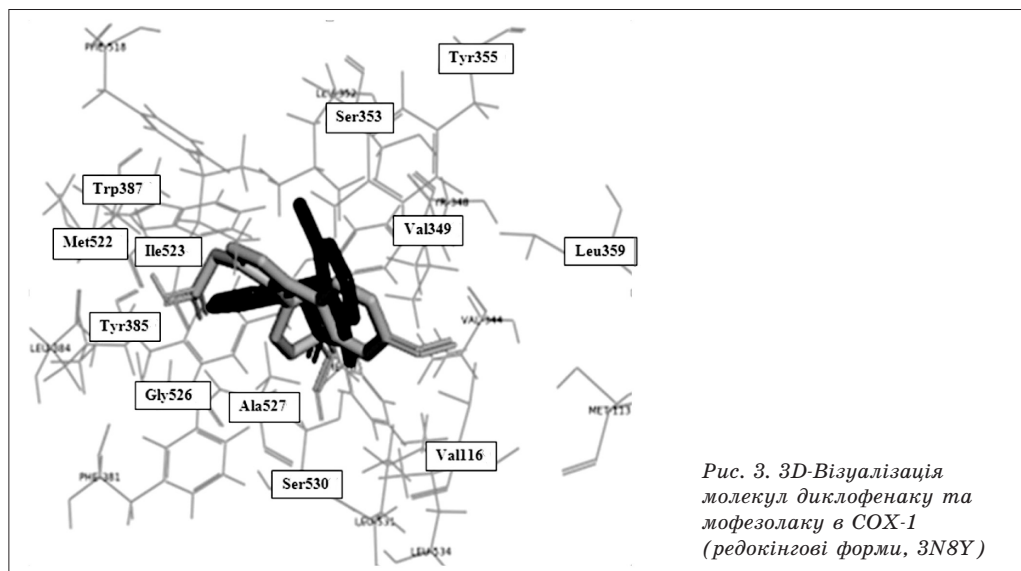


Рис. 3. 3D-Візуалізація молекул диклофенаку та мофезолаку в COX-1 (редокінгові форми, 3N8Y)

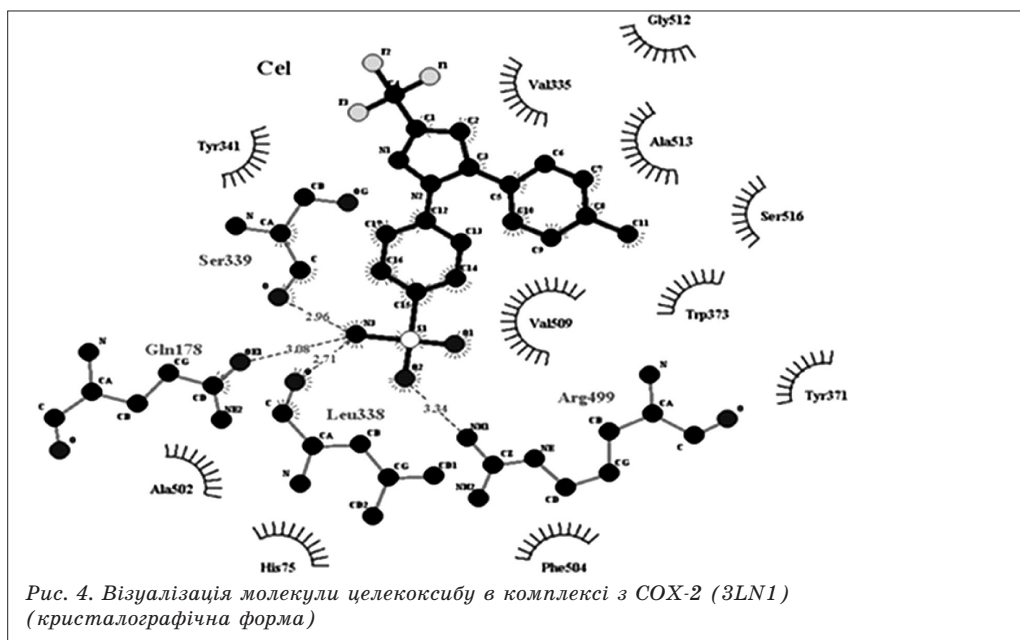
ду та рецептора становила -11,9 ккал/моль. Для кристалографічної форми комплексу «Целекоксиб – COX-2» (3LN1) важливими є водневі зв'язки між протоном аміногрупи сульфонамідного фрагмента целекоксибу й атомами кисню залишків *Ser339*, *Gln178* та *Leu338* відповідно (відстань 2,96 Å, 3,08 Å та 2,71 Å відповідно), а також між атомом кисню сульфонамідного фрагмента целекоксибу та атомом водню аміногрупи гуанідинового фрагмента *Arg499* (відстань 3,34 Å) (рис. 4). Для визначення пріоритетності оцінювання нових лігандів важливою може бути також відстань між атомом азоту N₂ піразольного циклу та атомами кисню сульфогрупи в комплексі «Целекоксиб – COX-2», яка становила 6,67 Å.

За результатами аналізу кристалографічної та редокінгової форм комплексу «Целекоксиб – COX-2» визначені специфічні особливості оточення ліганду залишками амінокислот, зокрема такими, як *Arg499*, *Ala502*, *Phe503*, *Phe504*, серед яких залишок *Arg499* забезпечує ключову ліганд-ферментну взаємодію, що характеризує целекоксиб з сульфамідним COX-2 фармакофором як високоселективний (специфічний) інгібітор.

Результати та їх обговорення. Особливості супрамолекулярної взаємодії лігандів на основі гетероциклу 6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]-тріазоло[4,3-а]азепіну як інгібіторів COX визначали за вільною енергією зв'язування, геометричними характеристиками та особливостями амінокислотного оточення лігандів в активному сайті зв'язування COX-2 і COX-1 відповідно.

Результати молекулярного докінгу лігандів на основі гетероциклу 6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]-тріазоло[4,3-а]азепіну з ізоформами COX. Вільна енергія зв'язування ($E_{зв.}$, ккал/моль) (табл. 2). За отриманими результатами досліджені ліганди характеризуються енергіями зв'язування в межах від -7,7 ккал/моль (для IFT-2354) до -8,8 ккал/моль (для IFT-386) з COX-1 та від -8,3 ккал/моль (для IFT-392) до -10,0 ккал/моль (для IFT-у3) з COX-2.

Порівняльний аналіз відповідних комплексів лігандів (сполук і препаратів) визначив, що IFT-384 (R=3-C₆H₅NHCH₂-), IFT-670 (R=3-MeC₆H₄-) та диклофенак взаємодіють з COX-1 та COX-2 з рівнозначними величинами енергій зв'язування -8,6 і -8,8 ккал/моль відповідно. До лігандів, для



яких комплекси з COX-2 є енергетично вигідніші, ніж комплекси з COX-1, належать IFT-2354 ($R=4\text{-MeCONHC}_6\text{H}_4$) та IFT-298 ($R=4\text{-MeOC}_6\text{H}_4\text{NHCH}_2$) («-7,7 проти -8,8» та «-8,3 проти -9,3») ккал/моль відповідно. А комплекси триазоло-азепінів (IFT: 301, 298, 386, у1, у3) та целекоксибу з COX-2 є енергетично вигідніші: -9,2; -9,3; -9,4; -9,4; -10 та -11,9 ккал/моль відповідно. Показники лігандів IFT-у3 та IFT-у1, IFT-386 та IFT-298 у комплексах з COX-2 найближчі до показників целекоксибу в його комплексі з COX-2, як це наочно демонструє відносний показник вільної енергії зв'язування (табл. 2). Крім того, ліганди (IFT: у3, 386, у1, 298, 301) з COX-2 та целекоксиб з COX-2 переважають диклофенак з COX-2 у (1,14±1,05) рази та 1,35 рази відповідно (табл. 2).

Отже, згідно з отриманими значеннями енергій зв'язування досліджених лігандів з COX-1 і COX-2 та відповідного порівняння з целекоксибом (IS: (COX-1, IC_{50}) >> (COX-2, IC_{50})) та диклофенаком (IS: COX-1, IC_{50} > COX-2, IC_{50}) можливо передбачити подвійну активність сполук щодо обох ферментів COX

з можливою перевагою щодо COX-2.

Оточення лігандів амінокислотними залишками в активному сайті зв'язування циклооксигенази (COX-1 і COX-2) (табл. 3).

Амінокислотне оточення молекули целекоксибу та інших лігандів дослідженого ряду в COX-2. Порівняльний аналіз оточення цих лігандів показав, що в досліджених зонах активного сайту зв'язування COX-2 знаходяться такі їхні спільні залишки, як His75, Val335, Leu338, Tyr341, Ser339 (без 392), Tyr341, Leu370, Tyr371, Trp373, Arg499, Phe504, Met508, Val509, Gly512, Ala513, Ser516. Важливо, що таке оточення є особливою ознакою целекоксибу як специфічного інгібітора COX-2, водночас для традиційних НПЗП як лігандів COX-2 (кристалографічні та докінгові форми) таке оточення не характерне. Тому особливою ознакою оточення досліджених лігандів (триазоло-азепінів) є залишки амінокислот, що притаманні оточенню целекоксибу, які зумовлюють значну вірогідність механізму їхньої протизапальної дії за участю COX-2.

Енергія зв'язування тріазоло-азепінів з ізоформами циклооксигенази

Шифр	Енергія зв'язування, СОХ-2, (3LN1)			Енергія зв'язування, СОХ-1, (3N8y)			Енергія зв'язування, СОХ-1, (5WBE)		
	ккал/моль	відносно целекоксибу	відносно диклофенаку	ккал/моль	відносно диклофенаку	ккал/моль	відносно мофезолаку	відносно диклофенаку	
У	-6,1	0,51	0,69	нд	нд	нд	нд	нд	
384	-8,8	0,74	1,00	-8,6	1,00	-7,8	0,94	0,99	
386	-9,4	0,79	1,07	-8,8	1,02	-8,0	0,96	1,01	
298	-9,3	0,78	1,06	-8,3	0,97	-7,6	0,92	0,96	
392	-8,3	0,70	0,94	-8,2	0,95	-7,1	0,86	0,90	
У3	-10,0	0,84	1,14	нд	нд	нд	нд	нд	
670	-8,8	0,74	1,00	-8,6	1,00	нд	нд	нд	
301	-9,2	0,77	1,05	нд	нд	нд	нд	нд	
У1	-9,4	0,79	1,07	нд	нд	нд	нд	нд	
2354	-8,8	0,74	1,00	-7,7	0,90	нд	нд	нд	
Целекоксиб	-11,9	1,00	1,35	нд	нд	нд	нд	нд	
Диклофенак	-8,8	0,74	1,00	-8,6	1,00	-7,9	0,95	1,00	
Мофезолак	нд	нд	нд	-7,4	0,86	-8,3	1,00	1,05	

Примітка. Тут і в табл. 3: нд – не досліджувалося.

**Амінокислотне оточення лігандів в активному сайті зв'язування ізоформ
циклооксигенази**

№	Сайт COX-2 (3LN1)	Сайт COX-1 (3N8y)
	Залишки амінокислот	
384	<i>His75, Tyr334, Val335, Leu338, Ser339, Tyr341, Phe367, Leu370, Tyr371, Trp373, Arg499, Ala502, Ile503, Phe504, Met508, Val509, Gly512, Ala513, Ser516</i>	<i>Met113, Val116, Arg120, Ile345, Tyr348, Val349, Leu352, Ser353, Tyr355, Leu359, Phe381, Leu384, Tyr385, Trp387, Met522, Ile523, Gly526, Ala527, Ser530, Leu531</i>
386	<i>His75, Val335, Leu338, Ser339, Tyr341, Tyr371, Trp473, Arg499, Ala502, Phe504, Met508, Val509, Gly512, Ala513, Ser516</i>	<i>Met113, Val116, Val349, Tyr355, Leu359, Phe381, Leu384, Tyr385, Trp387, Phe518, Met522, Ile523, Gly526, Ala527, Ser530, Leu531</i>
298	<i>His75, Val335, Leu338, Ser339, Tyr341, Leu370, Tyr371, Trp373, Arg499, Ala502, Phe504, Met508, Val509, Gly512, Ala513, Ser516</i>	<i>Met113, Val116, Arg120, Ile345, Val349, Leu352, Tyr355, Leu359, Tyr385, Trp387, Met522, Ile523, Gly526, Ala527, Ser530, Leu531</i>
392	<i>Val102, Arg106, Tyr334, Val335, Leu338, Tyr341, Leu345, Tyr371, Trp373, Phe504, Met508, Val509, Gly512, Ala513, Ser516, Leu517</i>	<i>Val116, Arg120, Val349, Leu352, Tyr355, Leu359, Tyr385, Trp387, Met522, Ile523, Gly526, Ala527, Ser530, Leu531</i>
y3	<i>His75, Gln178, Val335, Leu338, Ser339, Tyr341, Tyr371, Trp373, Arg499, Ala502, Ile503, Phe504, Met508, Val509, Gly512, Ala513, Ser516</i>	нд
670	<i>His75, Val335, Leu338, Ser339, Tyr341, Phe367, Leu370, Tyr371, Trp373, Arg499, Phe504, Met508, Val509, Gly512, Ala513, Ser516</i>	<i>Met113, Val349, Ser353, Leu359, Leu384, Ile523, Phe518, Met522, Ser530, Gly526, Ala527</i>
2354	<i>His75, Val335, Leu338, Ser339, Tyr341, Phe367, Leu370, Tyr371, Trp373, Arg499, Phe504, Met508, Val509, Gly512, Ala513, Ser516</i>	<i>Met113, Val116, Arg120, Ile345, Val349, Leu352, Tyr355, Leu359, Tyr385, Trp387, Met522, Ile523, Gly526, Ala527, Ser530</i>
Целе- коксиб	<i>His75, Arg106, Gln178, Val335, Leu338, Ser339, Tyr341, Leu345, Leu370, Trp373, Arg499, Ala502, Ile503, Phe504, Met508, Val509, Gly512, Ala513, Ser516, Leu517</i>	<i>His90, Val116, Arg120, Gln192, Val349, Leu352, Ser353, Tyr355, Leu359, Phe381, Leu384 Tyr385, Trp387, Ser516, Ile517, Phe518, Met522, Ile523, Gly526, Ala527, Ser530, Leu531</i>
Дикло- фенак	<i>Phe205, Val344, Tyr348, Val349, Leu352, Ser353, Tyr355, Phe381, Leu384, Tyr385, Trp387, Phe518, Met522, Ile523, Gly526, Ala527, Ser530, Leu531, Leu534</i>	<i>Tyr348, Val349, Leu352, Ser353, Tyr355, Leu384, Tyr385, Trp387, Met522, Ile523, Gly526, Ala527, Ser530, Leu531</i>
Мофе- золак	нд	<i>Met113, Val116, Phe205, Tyr348, Val349, Leu352, Tyr355, Leu359, Leu384, Tyr385, Trp387, Phe518, Met522, Ile523, Gly526, Ala527, Ser530, Leu531</i>

Амінокислотне оточення лігандів в активному сайті зв'язування COX-1. Досліджуючи оточення лігандів (тріазоло-азепінів) в активному сайті COX-1, були відзначені характерні для них ознаки: тріазоло-азепіновий фрагмент ліганду розташований у дистальній зоні активного сайту зв'язування – під каталітичним центром (Tyr385); спільні залишки такі: Arg120 (без Mof, ДН, 670, 386), Val349, Tyr355 (без 670), Leu359 (без ДН), Tyr385 (без 384, 670, Cel), Trp387 (без 670), Met522, Ile523, Gly526, Ala527, Ser530, Leu531. Порівняльний аналіз оточення лігандів (традиційні НПЗП, а також целекоксиб і тріазоло-азепіни) показав, що в досліджених зонах активного сайту зв'язування COX-1 знаходиться до 12 спільних залишків амінокислот.

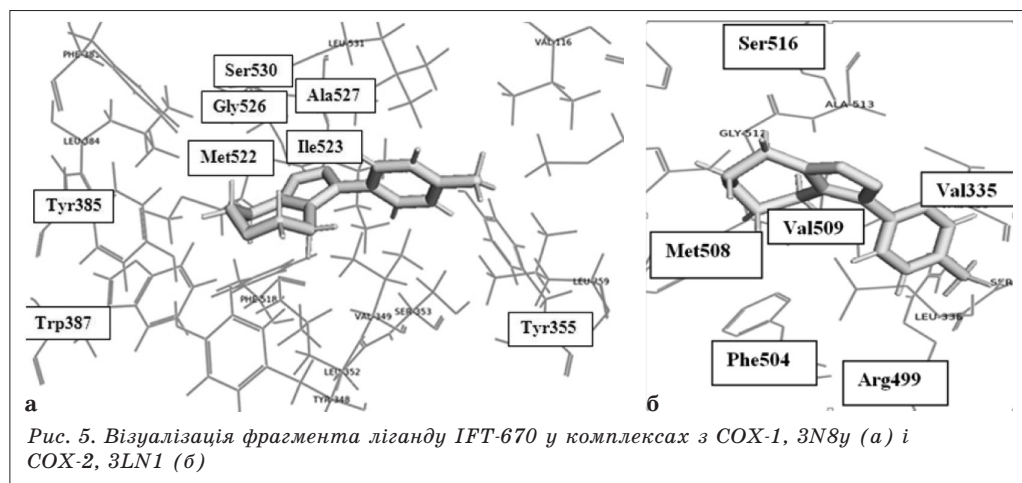
Особливості комплексів досліджених лігандів з COX-1 і з COX-2 візуально продемонстровано на прикладі ліганду IFT-670 в COX-1 (а) і COX-2 (б) (рис. 5), де їхнє оточення залишками в COX-1 і COX-2 має значні відмінності, притаманні й іншим дослідженим тріазоло-азепінам.

Особливості геометричних характеристик і супрамолекулярних взаємодій між COX-2 та похідними з метилсульфамойльною групою в структурі ліганду. Визначені геометричні

характеристики лігандів щодо залишків Arg499, His75 та Ser516. Для міжмолекулярного комплексу ліганду IFT-y1 з COX-2 ($E_{зв.} = -9,4$ ккал/моль) характерними є відстані між атомом кисню *para*-метилсульфамойльної групи ліганду та атомом вуглецю в 3-му положенні гетероциклу (6,71 Å/6,865 Å), а також атомами водню аміногруп залишків Arg499 та His75 (2,192 Å та 2,337 Å відповідно). Але атом азоту (N1) тріазольного циклу ліганду віддалений від атому водню гідроксигрупи залишку Ser516 на > 4 Å.

Характерними є аналогічні відстані в комплексі «IFT-y3 – COX-2» ($E_{зв.} = -10$ ккал/моль): водневі зв'язки між атомами кисню *para*-метилсульфамойльної групи ліганду та воднем азоту гуанідинового фрагмента Arg499 (відстань 2,98 Å), а також воднем аміногрупи Phe504 (відстань 3.32 Å). Також між атомом азоту (N1) тріазольного циклу ліганду та гідроксигрупою Ser516 (відстань 3,18 Å) (рис. 6).

Особливості геометричних характеристик і супрамолекулярних взаємодій між COX-2 та похідними з *para*-метоксифенільним (IFT-301) та *para*-метоксифеніламінометильним (IFT-298) замісниками. Геометричні характеристики цих лігандів у їхніх комплексах з COX-2 наступні. Відстані від атомів кисню



метоксигруп лігандів до: атому вуглецю ($C_{\text{циклу}}$) у 3-му положенні гетероциклу (5,602 Å та 7,47 Å відповідно); атому водню аміногрупи залишку *Arg499* (3,475 Å та 2,583 Å відповідно); атому водню аміногрупи залишку *His75* (2,440 Å та 2,640 Å відповідно); також між атомом азоту (N1) триазольного циклу ліганду та гідроксигрупою *Ser516* відстань (3,524 Å та 2.295 Å відповідно).

Міжмолекулярні взаємодії молекул досліджених сполук в активному сайті COX-2 відбуваються завдяки гідروفобним контактам зі залишками до 11 амінокислот та утворенню одного або кількох водневих зв'язків.

Особливості супрамолекулярної взаємодії 6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]-тріазоло[4,3-а]азепінів з COX-1. За показником вільної енергії зв'язування лігандів і препаратів порівняння з COX-1, визначеної за результатами докінгу до макромолекул 5WBE та 3N8y, було отримано результати, що не виключають вплив тріазоло-азепінів на COX-1 (табл. 2, 3).

Протизапальна активність. Інгібіція карагенінового набряку. Протизапальну активність похідних тріазоло-азепіну було вивчено в дослідях *in vivo* на моделі карагенінового набряку порівняно з диклофенаком (табл. 4) [18–20].

Досліджені тріазоло-азепіни характеризуються протизапальною дією (за виключенням IFT-384), що перевищує дію препарату порівняння у (1,56 ÷ 1,18) рази або є співставною з нею.

Оцінка можливого механізму біологічної дії досліджених сполук з використанням молекулярного докінгу дозволила виявити особливості їхнього комплексоутворення з COX-1 і COX-2. Комплекси похідних тріазоло-азепіну розміщуються в активному сайті зв'язування COX-2 і COX-1,

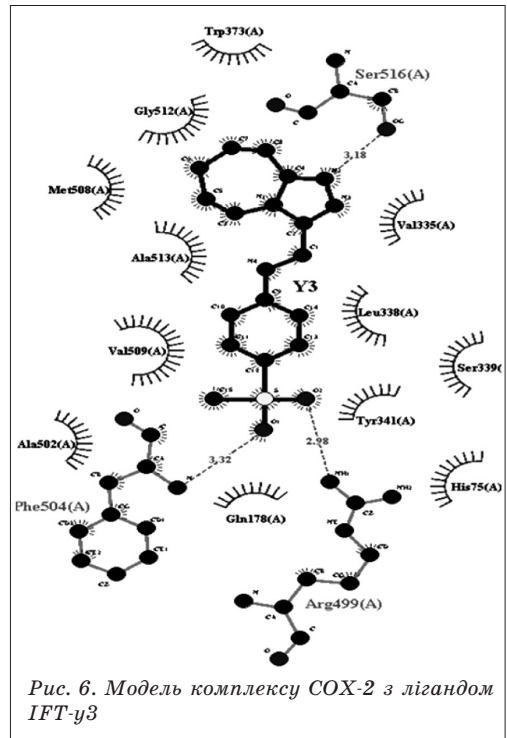


Рис. 6. Модель комплексу COX-2 з лігандом IFT-у3

характерному для структур комплексів з целекоксибом (COX-2) та диклофенаком, мофезолаком, целекоксибом (COX-1) відповідно. Вільна енергія зв'язування співставима з такою для препаратів порівняння. Отримані дані дозволяють передбачити один з механізмів дії досліджених сполук, який може бути опосередкований через взаємодію з ізоферментами COX. Зважаючи на особливості, а саме: позицій досліджених лігандів у COX-2 (позицій, специфічних для COX-2 інгібіторів) при загальних спільних особливостях оточення лігандів у COX-1; вільної енергії зв'язування; характерних геометричних характеристик (особливо для COX-2 інгібіторів, зокрема целекоксибу) як відстаней між атомами замісника ліганду, що важливі для розміщення його в зоні COX-2-фармакофору, тобто, у сульфамідному фрагменті ліганду целекоксибу (6,67 Å ($N2_{\text{циклу}}-O_2S$) та в *пара*-метилсульфамойльних ($3-C_{\text{циклу}}-O_2S$; $HN-O_2S$) та в *пара*-метоксифенільних

Протизапальна активність нових похідних тріазоло-азепіну на моделі карагенінового набряку порівняно з диклофенаком

Шифр	Інгібіція набряку відносно диклофенаку	Шифр	Інгібіція набряку відносно диклофенаку
IFT-2354	1,56	IFT-386	1,18
IFT-670	1,27	IFT-392	0,95
IFT-674	1,21	IFT-384	0,23
IFT-298	0,94	Диклофенак натрію	1,0

групах ($3\text{-C}_{\text{циклу}}\text{-OMe}$; HN-OMe): (6,71 Å; 6,28 Å та 6,58 Å; 6,47 Å відповідно), можна очікувати їхню більшу спорідненість до COX-2.

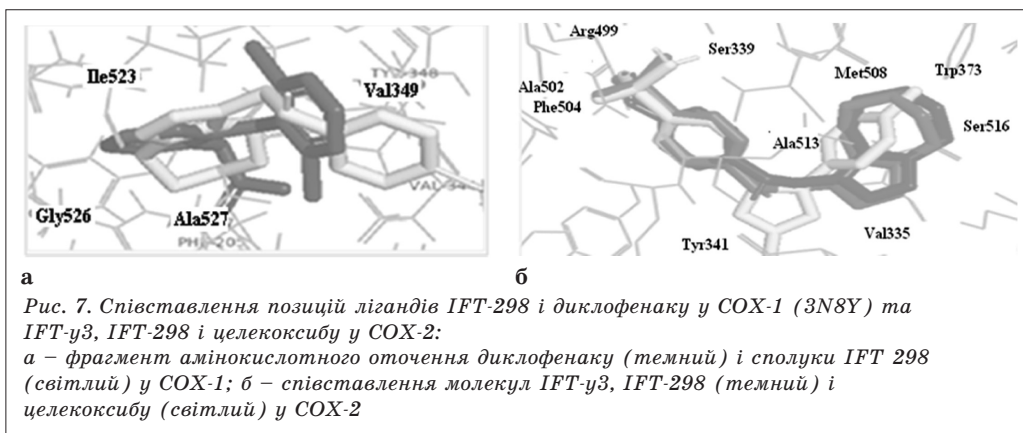
За проведеними дослідженнями особливостей супрамолекулярної взаємодії тріазоло-азепінів з ізоформами COX визначено низку характеристик як критеріїв їхньої спорідненості до COX-2 та як додаткових даних до побудови рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів COX-2 (рис. 7).

Висновки

1. Досліджено особливості комплексоутворення макромолекул COX-1 і COX-2 з молекулами на основі тріазоло-азепінового скаффолду (6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]-тріазоло[4,3-а]азепіну), розраховано енергію зв'язування, відносну відстань від атомів ліганду до амінокислотних залишків білка, відста-

ні між важливими атомами фрагмента ліганду, визначено найближче оточення лігандів залишками амінокислот і проаналізовано переважуючий тип взаємодії ліганду з COX-2 порівняно з таким з COX-1.

- Міжмолекулярна взаємодія похідних тріазоло-азепіну характеризується енергіями зв'язування в межах від -7,7 до -8,8 ккал/моль (3N8y), від -7,1 до -8,0 ккал/моль (5WBE) з COX-1 та від -8,2 до -10,0 ккал/моль (3LN1) з COX-2, що співставимо з характеристиками відповідних комплексів препаратів порівняння – мофезолаку та диклофенаку з COX-1 (5WBE, 3N8Y відповідно) і диклофенаку, цефекоксиду з COX-2 (3LN1).
- Ліганди з метилсульфамойлфенільним і тріазольним фрагментами, які важливі для утворення водневих зв'язків з амінокислотними залишками активного сайту COX-2



(Arg499, Phe504 і Ser516) характеризуються вільною енергією зв'язування, що наближається до такої для целекоксибу.

4. Досліджені ліганди – триазоло-азепіни в активному сайті зв'язування COX-1 розташовані в оточенні залишків амінокислот, які притаманні оточенню відповідних препа-

ратів порівняння. Наявність характерної додаткової зони, що представлена залишками Arg499, Ala502, Ile503, Phe504 в їхніх комплексах з COX-2, дозволяє передбачати, що один з механізмів протизапальної дії досліджених сполук може бути опосередкований через взаємодію з COX-2.

1. Синтез похідних бензенсульфонамідів і вивчення їхньої спорідненості до циклооксигенази-2 методом молекулярного докінгу. С. А. Демченко, О. Ю. Баглай, Н. М. Серединська, О. Є. Ядловський, А. Є. Зелінська, Т. А. Бухтіарова, Л. С. Бобкова, А. М. Демченко. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2020. Т. 14, № 1. С. 24–35.
2. Garcia-Nieto R., Perez C., Gago E. Automated docking and molecular dynamics simulations of nimesulide in the cyclooxygenase active site of human prostaglandin – endoperoxid synthase-2 (COX-2). *J. Computer Aided Mol. Design*. 2000. V. 14. P. 147–160.
3. Docking studies on NSAID/COX-2 isozyme complexes using contact statistics analysis. G. Ermondia, G. Carona, R. Lawrenceb, D. Longo. *J. Computer Aided Mol. Design*. 2004. V. 18. P. 683–696. <https://doi.org/10.1007/s10822-004-6258-1>.
4. Design, synthesis and modeling study of acylated 1,2,4-triazole-3-acetates with potential anti-inflammatory activity. A. M. Abdel-Megeed, H. M. Abdel-Rhman, G.-E. S. Alkaramany et. al. *Eur. J. Med. Chem*. 2009. V. 44. P. 117–123.
5. Abdelall E. K.A., Kamel G. M. Synthesis of new thiazolo-celecoxib analogues as dual cyclooxygenase-2/15-lipoxygenase inhibitors: determination of regio-specific different pyrazole cyclization by 2D NMR. *Eur. J. Med. Chem*. 2016. V. 118 (8). P. 250–258. <https://doi.org/10.1016/J.ejmech.2016.04.049>.
6. Structural basis of non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac binding to human serum albumin. Y. Zhang, P. Lee, S. Liang et al. *Chem. Biol. Drug Des*. 2015. V. 86 (5). P. 1178–1184.
7. Synthesis, computational investigation and biological evaluation of α,α -difluoromethyl ketones embodying pyrazole and isoxazole nuclei as COX inhibitors. Citarella L. Lelo, Stagno M. Cristani, Muscara V. Pase et al. *Org. Biomol. Chem*. 2022. V. 20. P. 8293–8304. <https://doi.org/10.1039/d2ob01382g>.
8. Mahesh G., Kumar A. K. Overview on the discovery and development of anti-inflammatory drugs: should the focus be on synthesis or degradation of PGE2? *Journal of Inflammation Research*. 2021. V. 14. P. 253–263. <https://doi.org/10.2147/JIR.S278514>.
9. Proteins Data Bank (PDB) (онлайн-ресурс). URL: <https://www.rcsb.org/>.
10. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis. T. D. Warner, R. Giuliano, I. Vojnovic et al. *Pharmacology*. 1999. V. 96. P. 7563–7568.
11. Гладких Ф. В. Нестероїдні протизапальні засоби. Терапевтичні та небажані ефекти, шляхи їх оптимізації. Вінниця : ТВОРИ, 2022. 216 с. <https://doi.org/10.46879/2022.1>.
12. Thomas A. H. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comp. Chem*. 1996. V. 17. P. 490–519.
13. AutodockTools 1.5.6. URL: <http://autodock.scripps.edu>.
14. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010. V. 31. P. 455–461.
15. Autodock Vina current version is 1.1.2. URL: <http://vina.scripps.edu/>.
16. LigPlot+ v.1.4 – multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. URL: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>.
17. PyMol 2.3 (PyMOL by Schrödinger) (без активації ліцензії, обмежений інтерфейс). URL: <https://pymol.org/2/buy.html?#academic>.
18. Лекарственные средства. Биоскрининг; под. ред. А. В. Стефанова. Киев : ВД «Авіцена», 1998. 252 с.
19. Патент на винахід № 115756 Україна. Застосування 3-ариламінометил-6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепінів, як анальгетиків. Демченко С. А., Серединська Н. М., Бухтіарова Т. А., Бобкова Л. С., Бершова Т. А., Демченко А. М. № а 2017 03263; Заявл. 05.04.2017; Опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.
20. Синтез й аналізуюча активність 6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]-триазоло[4,3-а] азепінів. С. А. Демченко, Н. М. Чаленко, Т. А. Бухтіарова, Н. М. Серединська, Л. С. Бобкова, О. Є. Ядловський, А. М. Демченко. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2018. № 4–5 (60). С. 25–31.

**О. Є. Ядловський, Л. С. Бобкова, О. Ю. Баглай, А. М. Демченко,
Т. А. Бухтіарова**

Особливості супрамолекулярної взаємодії 6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]- тріазоло[4,3-а]азепінів з ізоформами циклооксигенази

Відповідно до сучасних уявлень підходи, що засновані на пошуку нових інгібіторів COX, є одним з пріоритетних напрямів цілеспрямованого пошуку нових препаратів для контролю болю та запалення. Особливості міжмолекулярної взаємодії відомих нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) з ізоформами циклооксигенази є важливим елементом системи оцінки біологічних ефектів у медичних технологіях спрямованого пошуку нових біологічно активних речовин.

Мета дослідження – вивчення та порівняльний аналіз особливостей супрамолекулярних взаємодій похідних тріазоло-азепіну з циклооксигеназою (COX-1 і COX-2), визначення їхніх перспектив як потенційних НПЗП.

Особливості супрамолекулярної взаємодії тріазоло-азепінів як інгібіторів COX визначали за вільною енергією зв'язування, геометричними характеристиками лігандів та особливостями оточення досліджених молекул залишками амінокислот в активному сайті зв'язування кожної з ізоформ. Використання молекулярного докінгу для оцінки можливого механізму біологічної дії гетероциклічних сполук – похідних тріазоло-азепіну дозволило виявити особливості їхнього комплексоутворення з COX-1 і COX-2.

Похідні тріазоло-азепіну розміщуються в активному сайті зв'язування COX-1 і COX-2, який є характерним для молекул цекококсибу з COX-2 та диклофенаку, мofезолаку, цекококсибу з COX-1 відповідно. Досліджені тріазоло-азепіни в активному сайті зв'язування циклооксигенази (COX-1 і COX-2) розташовані в оточенні залишків амінокислот, які притаманні оточенню відповідних препаратів порівняння. Ключовою ліганд-ферментною взаємодією тріазоло-азепінів є позиція ліганду та його взаємодія в окремій області зі залишком *Arg499*, як це властиво для цекококсибу. Вільна енергія зв'язування досліджених комплексів співставна з такою препаратів порівняння.

Наявність характерної додаткової зони, що представлена залишками *Arg499*, *Ala502*, *Ile503*, *Phe504* в їхніх комплексах з ЦОГ-2, дозволяє передбачати, що один з механізмів протизапальної дії досліджених сполук може бути опосередкований через взаємодію з COX-2.

Ключові слова: тріазоло-азепіни, докінг-аналіз, інгібітори циклооксигенази, супрамолекулярна взаємодія

O. E. Yadlovskiy, L. S. Bobkova, O. Yu Baglay, A. M. Demchenko, T. A. Bukhtiarova Peculiarities of the supramolecular interaction of triazolo-azepines with isoforms of cyclooxygenase

The purpose of the study was to conduct the comparative analysis of the features of the supramolecular interaction of triazolo-azepine derivatives with cyclooxygenase (COX-1 and COX-2), and to determine their prospects as potential NSAIDs.

Features of the supramolecular interaction of triazolo-azepine derivatives as COX inhibitors were determined by the binding free energy, geometrical characteristics of the ligands, and specific environment of the molecules by amino acid residues in the active site of COX-2 and COX-1 binding.

Derivatives of triazolo-azepine are located in the active site of COX binding, which is typical for molecules of celecoxib with COX-2 and diclofenac, mofezolac, celecoxib with COX-1, respectively. Triazolo-azepines are placed in the active site of COX binding in the presence of amino acid residues, which are typical for the molecules of comparison drugs. The key interaction of triazolo-azepine derivatives is the position of the ligand and its binding to *Arg499* residue in a separate cavity, as it is inherent to celecoxib. The binding energies of the investigated complexes are comparable to drugs.

Availability of characteristic additional zones with *Arg499*, *Ala502*, *Ile503*, *Phe504* residues in complexes of triazolo-azepines with COX-2 allows us to predict the mechanism of their anti-inflammatory action which can be mediated through interaction with COX-2.

Key words: triazolo-azepines, docking analysis, cyclooxygenase inhibitors, supramolecular interaction

Дослідження виконано за напрямом «Фармако-математичний аналіз результатів скринінгу анагетичної та протизапальної дії похідних моно-, ди- та трициклічних нітрогеновмісних гетероциклів для спрямованого пошуку нових БАР», № державної реєстрації 0117U006445 (ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»).

Надійшла: 6 лютого 2024 р.

Прийнята до друку: 20 березня 2024 р.

Контактна особа: Бобкова Людмила Станіславівна, доктор фармацевтичних наук, головний науковий співробітник, відділ медичної хімії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 94 18.