

## Рациональный драг-дизайн капсаициномиметиков в поиске противоопухолевых лекарственных средств

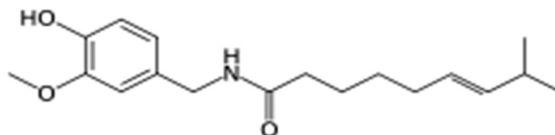
Лахвич Ф. Ф., Пиришук А. М.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** В эксперименте *in silico* была исследована структура-биологическая зависимость для ряда капсаициномиметиков по отношению к ванилоидным рецепторам TRPV1 и PPAR gamma. Исходя из полученных данных разработан дизайн структур и созданы модели для скрининговых исследований производных капсаицина, обладающих наибольшим сродством к рецептору PPAR gamma, при взаимодействии с которым индуцируется апоптоз раковых клеток.

**Ключевые слова:** докинг, зависимость структура-активность, капсаициномиметики, капсаицин, рациональный драг-дизайн.

**Введение.** Капсаицин — природное соединение, обнаруженное в различных видах стручкового перца *Capsicum*.



Капсаицин обнаружен наряду с дигидрокапсаицином, нордигидрокапсаицином, гомодигидрокапсаицином и гомокапсаицином. На капсаицин и дигидрокапсаицин приходится примерно 90 % (рисунок 1) [1]. Считается, что эти соединения синтезируются растением в качестве защитных веществ от атак микробов и травоядных животных [2].

Капсаицин применяется как лекарственное средство (ЛС) и принадлежит к фармакологической группе «местнораздражающие средства». Он раздражает верхние дыхательные пути, кожу и слизистые

оболочки. Является компонентом спиртовой настойки и медицинского пластыря, используемых как отвлекающее и обезболивающее средство, а также в качестве мази от обморожений. Капсаицин всасывается через кожу при местном применении (гели, крем-гели и т. п.) [2].

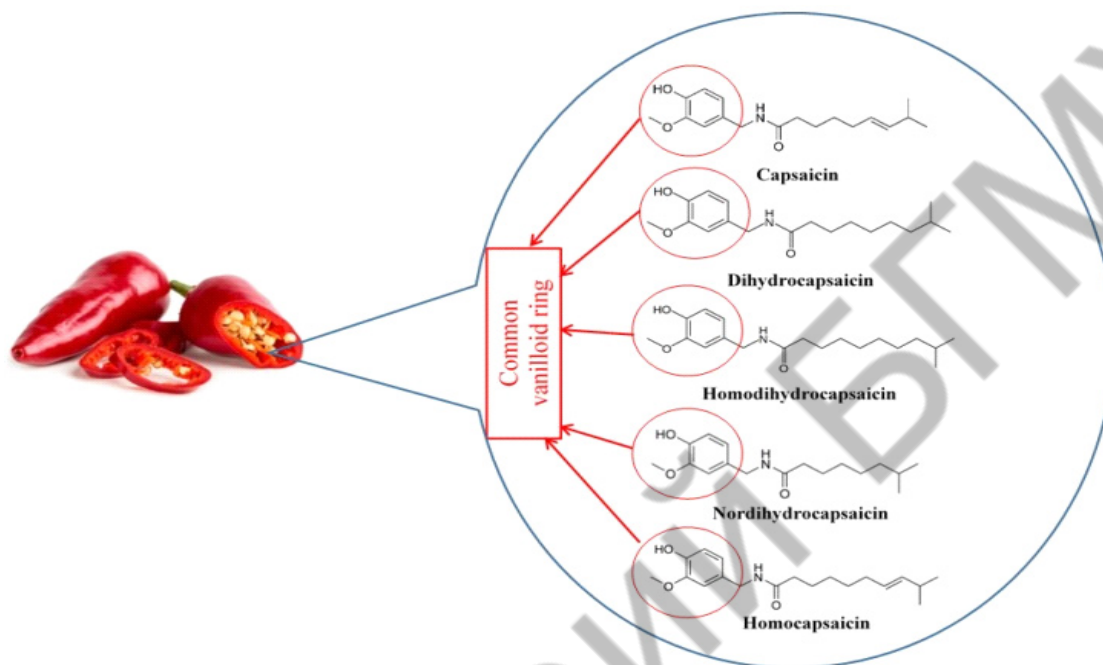


Рисунок 1 — Капсаициноиды, содержащиеся в стручковом перце

Употребление перца в пищу в тропических странах способствовало капсаицин-индуцированной вазодилатации поверхностных сосудов кожи и увеличению потоотделения, а следовательно, терморегуляции организма. Перец также применяли при лечении кашля, тонзиллита, язвы желудка, холеры, подагры, задержки воды, ревматизма, судорог, диареи, диспепсии и зубной боли, стимуляции аппетита и для восстановления роста волос [3]. В конце прошлого столетия было обнаружено двойное действие капсаицина в отношении сенсорных нейронов: мгновенное, но временное возбуждение, сменяющееся длительным рефрактерным состоянием, обычно известным как десенсибилизация. В этом состоянии ранее стимулированные нейроны больше не чувствительны к своим предыдущим или другим стимулам. Этот эффект может являться потенциальным в терапевтическом использовании [4].

В молекулах капсаицина были выделены три фрагмента: А (арильный), В (амидный) и С (ациклический гидрофобный). Известно, что заместители в положениях 3 и 4 А-кольца необходимы для действия агонистов, особенно сильно влияет на активность фенольный гидроксил 4-ОН. Донорно-акцепторные свойства Н-связи фенольной группы являются ключевыми для агонистической активности (рисунок 2) [1].

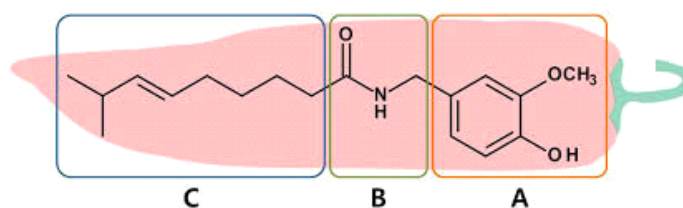


Рисунок 2 — Разделение структуры капсаицина на три фрагмента

На сегодняшний день исследования показали, что капсаициноиды, в частности капсаицин, обладают широким спектром биологической и физиологической активности, таких как антиоксидантная, проинвоопуховая, противовоспалительная, а также стимулирование энергетического обмена и подавление накопления жира [5].

Обжигающее действие капсаицина является результатом его взаимодействия с чувствительными нейронами. Капсаицин связывается с ванилоидным рецептором 1-го подтипа (TRPV1). Родтип TRPV1 является рецептором ионных каналов, может также стимулироваться теплом, протонами и физическим истиранием и позволяет катионам проходить через клеточную мембрану при активации [1, 6]. При связывании с рецептором TRPV1 молекула капсаицина производит ощущения, похожие на ощущения ожога или абразивного повреждения.

Было показано, что капсаицин передает более длительный импульс по сравнению с другими химическими агонистами рецептора TRPV1. Существует ряд ионных каналов, чувствительных к различным диапазонам температур, которые отвечают за наш диапазон температурных ощущений. Таким образом, капсаицин на самом деле не вызывает химический ожог или прямое повреждение тканей. Считается, что воспаление, вызванное воздействием капсаицина, является результатом реакции организма на нервное возбуждение.

Также было обнаружено, что капсаицин обладает проапоптотической активностью посредством рецептора TRPV1 при многих типах рака [1, 6]. TRPV1 является неселективным катионным каналом, который принадлежит к семейству переходных потенциальных рецепторов (TRPs) [6]. Преимущественно осуществляет перенос ионов  $Ca^{2+}$ . Таким образом, данный рецептор способствует изменению концентрации свободного  $Ca^{2+}$  в цитозоле и является основной клеточной мишенью капсаицина [1]. Так, TRPV1 также широко распространен в тканях мозга, мочевом пузыре, почках, кишечнике, кератиноцитах эпидермиса, глиальных клетках, печени и полиморфоядерных гранулоцитах, тучных клетках и макрофагах. До недавнего времени капсаицин был однозначно идентифицирован как агонист TRPV1. Экспрессия TRPV1 была продемонстрирована в большинстве проанализированных опухолевых клеток. TRPV1 экспрессируется в клетках MCF-7 и BT-20 рака молочной железы человека [7], в клетках LNCaP и PC-3, полученных из рака предстательной железы [8]. Было показано, что капсаицин ингибирует рост или вызывает апоптоз в клетках опухоли предстательной железы как *in vitro*, так и *in vivo*.

Тем не менее было установлено, что капсаицин предпочтительно индуцирует апоптоз определенных раковых клеток, и, следовательно, его аналоги могут рассматриваться как потенциальные ЛС в химиопрофилактике и лечении онкологических заболеваний. Гамма-рецептор, активированный пролифератором пероксисом (PPAR-gamma), член надсемейства ядерных рецепторов, является зависимым от лиганда фактором транскрипции. Активация PPAR-gamma приводит к остановке роста и/или апоптозу в различных раковых клетках. Был исследован потенциал капсаицина для индуцирования апоптотической гибели в клетках рака толстой кишки человека в ассоциации PPAR-gamma и капсаицина. Апоптоз клеток определялся количественно фрагментацией ДНК с помощью иммуноферментного анализа с ферментным связыванием. HT-29 человеческие клетки рака толстой кишки обладают рецепторами PPAR-gamma и VR-1. Обработка капсаицином индуцировала апоптотическую гибель в дозозависимом режиме клеток карциномы толстой кишки HT-29. Капсаицин-индуцированную гибель клеток полностью блокировали диглицидиловым эфиром бисфенола А — специфическим антагонистом PPAR-gamma. Капсазепин, специфический антагонист для ванилоидного рецептора, не ингибировал апоптоз, индуцированный капсаицином. Приведенные данные свидетельствуют о том, что индуцированный капсаицином апоптоз в клетках HT-29 может быть связан со специфическим метаболическим путем PPAR-gamma без участия ванилоидного рецептора [9]. Поэтому поиск веществ, действие которых связано с подобным механизмом действия, может расширить возможности направленной химиотерапии злокачественных новообразований, особенно резистентных к традиционным ЛС.

Некоторые эффекты, вызываемые действием капсаицина на различные типы опухолевых клеток, перечислены в таблице 1 [10].

Таблица 1 — Противоопухолевые эффекты капсаицина в отношении некоторых раковых клеток или клеточных линий

Тип рака	Опухолевые клетки / клеточные линии	Противоопухолевый эффект
Рак молочной железы	MCF-7, BT-20, SKBR-3, MDA-MB231, T47D, BT-474, MCF10A	Снижение потенциала митохондриальной мембраны, остановка клеточного цикла, апоптоз
Холангиокарцинома	TFK-1 and SZ-1	Модуляция сигнального пути, апоптоз

Окончание табл. 1

Тип рака	Опухолевые клетки / клеточные линии	Противоопухолевый эффект
Рак толстой кишки	SW480, LoVo, HCT-116, CT-26, HT-29, CoLo320, Colo205	Остановка клеточного цикла, апоптоз, изменения морфологии клеток, фрагментация ДНК
Рак желудка	AGS, SNU-668, HGC-27	Апоптоз, подавление пролиферации клеток
Гепатоцеллюлярная карцинома	HepG2, Hep3B	Апоптоз
Рак поджелудочной железы	AsPC-1, VxPC-3, PANC-1	Апоптоз
Рак простаты	LNCaP, PC-3, DU-145	Апоптоз, диссипация внутреннего трансмембранного потенциала митохондрий

Капсаициномиметики могут рассматриваться как кандидаты для создания лекарственных средств при лечении различных опухолей. Рациональный драг-дизайн предусматривает начало поиска соединений-кандидатов с проведения эксперимента *in silico*; за счет варьирования структуры и функциональностей в молекуле биогенного агониста можно выделить группу веществ, которые перспективны для дальнейших исследований. Выделение веществ-кандидатов, которые действуют на опухолевые клетки через ванилоидные рецепторы является актуальным и практически значимым, так как дает возможность рационально планировать синтез и испытания потенциальных ЛС для направленной химиотерапии злокачественных новообразований, особенно резистентных к традиционным ЛС.

**Материалы и методы.** Выбор белков-рецепторов проведен из банка данных 3D-структур белков и нуклеиновых кислот *Protein Data Bank* (PDB ID: 3E00). Дизайн структур выполнен с помощью специализированной программы ChemOffice. Молекулярный докинг *in silico* осуществлен с помощью программы Dockingserver с использованием полуэмпирического метода расчётов квантовой химии PM6, метода геометрической оптимизации MMFF94 и метода расчёта заряда Gasteiger при значении pH 7.0 [11].

К атомам лиганда были добавлены частичные заряды Гастейгера. неполярные атомы водорода были объединены, и были определены вращающиеся связи. Моделирование стыковки проводилось с использованием генетического алгоритма Ламарка (LGA) и метода локального поиска Solis & Wets. Исходное положение, ориентация и кручение молекул лиганда были установлены случайным образом. Все вращающиеся торсионы были выпущены во время стыковки. Каждый эксперимент по стыковке был получен из 10 различных прогонов, которые завершались после соответствующих программе оценок энергии.

Смоделированные структуры конвертированы в формат PDB и интегрированы в процессинг компьютерной программы Molecular Docking Server для изучения взаимодействия капсаицина и капсаициномиметиков с различными видами рецепторов TRPV1 и PPAR-gamma, которые были выбраны из банка данных 3D-структур белков и нуклеиновых кислот Protein Data Bank. Наилучшие результаты и их сравнение представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Сравнение взаимодействия капсаицина с рецепторами TRPV1 и PPAR-gamma

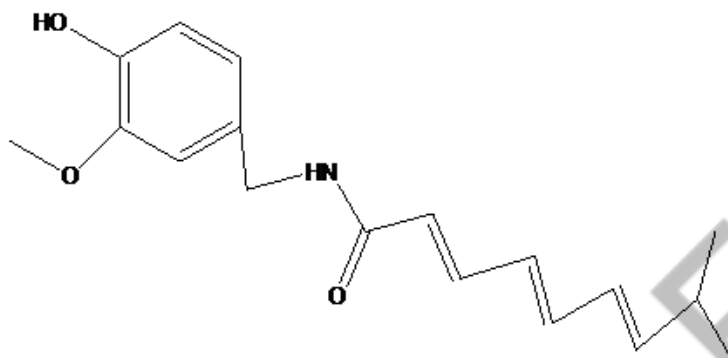
Рецептор	Свободная энергия связывания ( $\Delta G$ )	Константа ингибирования $K_i$
TRPV1	-6,52 kcal/mol	16,72 $\mu$ M
PPAR-gamma	-6,86 kcal/mol	9,42 $\mu$ M

Так как образование комплекса лиганда с рецептором PPAR-gamma происходит лучше, чем с TRPV1, следовательно, именно этот рецептор был выбран для дальнейших взаимодействий.

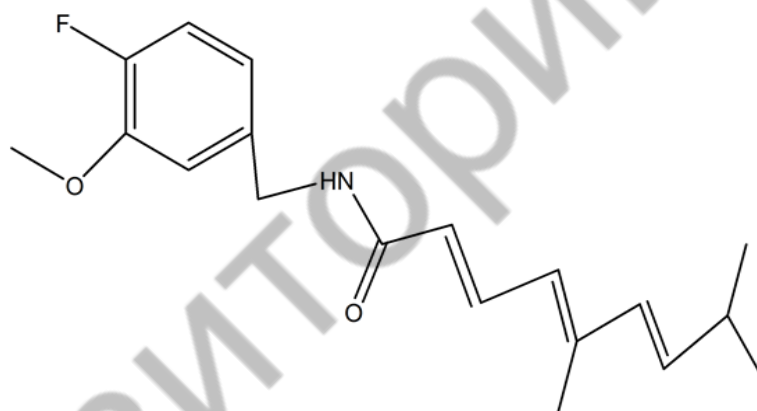
**Результаты и их обсуждение.** Ранее нами было проанализированы структуры 62 капсаициномиметиков: получены путем изменения самого углеродного скелета, введения и варьирования положения кратных связей, электронно-донорных и электронно-акцепторных заместителей в ацильном фраг-

менте, замещения гидроксильной и эфирной группы в бензольном кольце, замены атома водорода амидной группы на метильную, трифторметильную группы, а также перестановка и замена уже имеющихся функциональных групп в данной структуре. Рассмотрим соединения, для которых были получены максимальные значения энергии связывания.

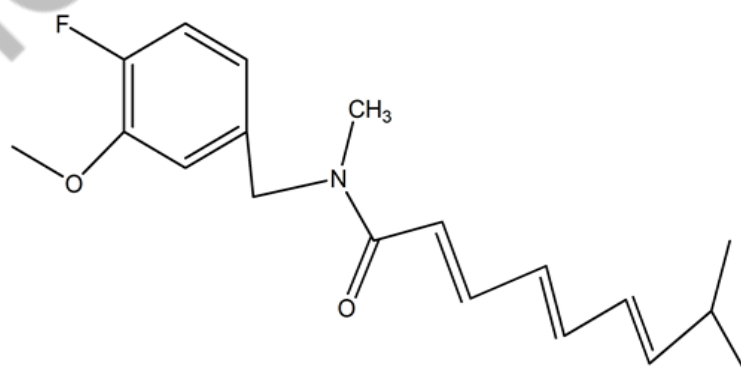
Так, при введении в структуру капсаицина системы кратных связей привело к увеличению энергии связывания ( $\Delta G = -6,95 \text{ kcal/mol}$ ,  $K_i = 8,07 \text{ uM}$ ).



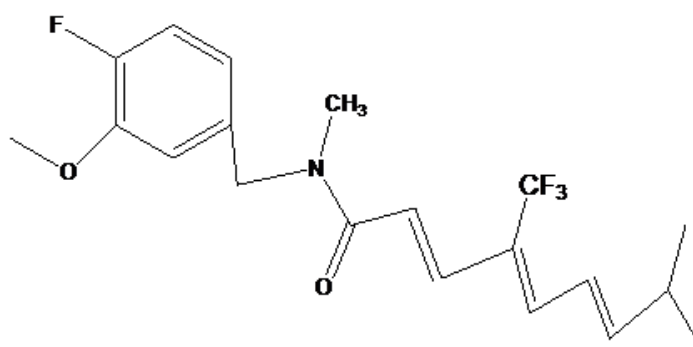
В структуру потенциальных ЛС часто вводят фтор, так как он является изостером гидроксильной группы. При замене в структуре капсаицина гидроксильной группы на фтор наблюдается увеличение энергии связывания ( $\Delta G = -8,50 \text{ kcal/mol}$ ,  $K_i = 585,44 \text{ nM}$ ).



При замене водорода амидной группы на метильную был получен пептидомиметик. Повышение липофильности может сделать такое производным более биодоступным. Энергия связывания также увеличивается ( $\Delta G = -8,99 \text{ kcal/mol}$ ,  $K_i = 258,92 \text{ nM}$ ).

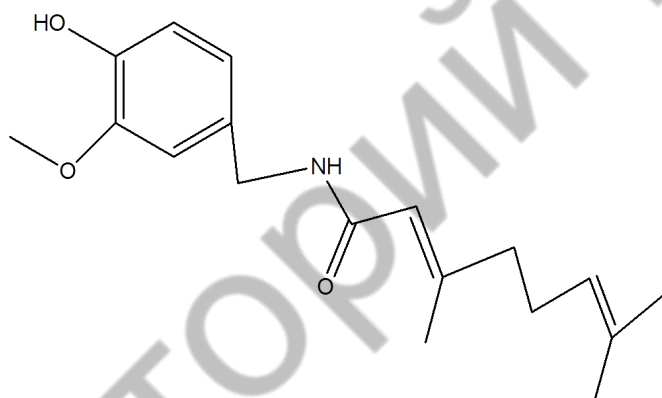


Для увеличения энергии связывания в структуру капсаицина был введён электронно-акцепторный заместитель CF<sub>3</sub> в ацильный фрагмент.



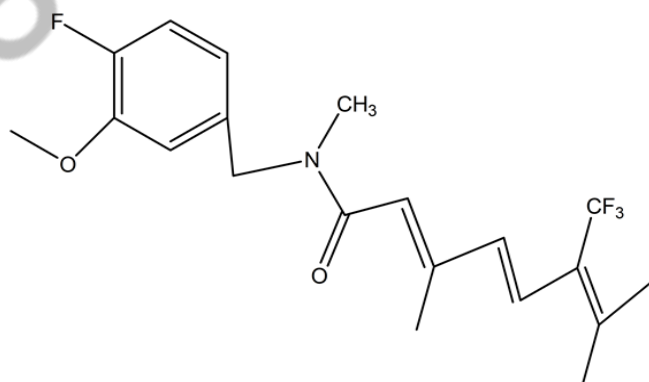
Данная структура показала наибольшее по модулю значение энергии связывания ( $\Delta G = -9,67$  kcal/mol,  $K_i = 82,02$  nM).

Дизайн потенциального лекарственного средства группы капсаиномиметиков должен включать и анализ возможных путей синтеза целевой структуры. Нами был предложен субстрат, который содержит синтетически доступный гераниольный ацильный фрагмент, и который легко может быть введен в молекулу капсаициномиметика. Имеются данные о получении капсаициномиметиков на основе гераневой кислоты [2].



Свободная энергия связывания данного вещества составила  $-7,44$  ккал/моль.

После введения в производное на основе гераниола всех функциональных групп и кратных связей, присутствующих в капсаицине, энергия связывания составила  $-8,89$  ккал/моль ( $K_i = 82,02$  nM).

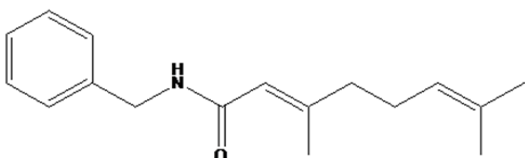
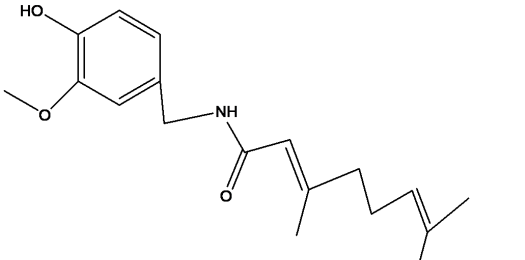


Приведенные данные говорят о том, что гераниол является хорошим субстратом для синтеза биологически активных аналогов капсаицина.

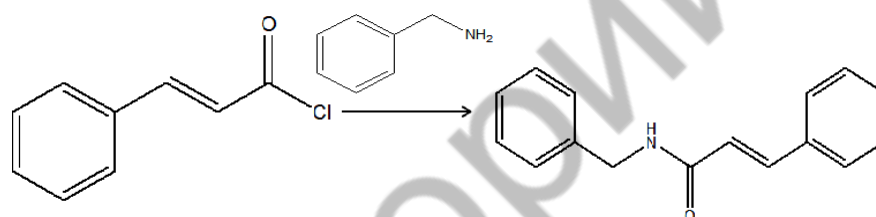
На следующем этапе в качестве субстратов для капсаициномиметиков были предложены бензиламин и гераниевая кислота. Проведя молекулярный докинг с рецептором PPAR-gamma и соединениями на основе бензиламина и гераневой кислоты, а также их производным, значения энергии связывания оказались выше, чем у исходного капсаицина (таблица 3).



Таблица 3 — Результаты докинга для лигандов на основе гераневой кислоты и бензиламина

Структура	Энергия связывания	Константа ингибирования
	-7,65 kcal/mol	122 nM
	-7,44 kcal/mol	189 nM

В качестве потенциальных исходных для синтеза капсаициномиметиков были рассмотрены хлорангидриды и сложные эфиры гераневой, нероловой, коричной кислот и бензиламин, а также их замещенные аналоги, исходя из легкости их получения.



Энергия связывания и константа ингибирования незамещенного соединения и его производного, которое содержит такие же функциональные группы в бензольном кольце, что и исходная структура капсаицина, представлены в таблице 4.

Таблица 4 — Результаты докинга для лигандов на основе коричной кислоты и бензиламина

Структура	Энергия связывания	Константа ингибирования
	-7,72 kcal/mol	2,19 uM
	-8,79 kcal/mol	360,62 nM

Проанализировав полученные данные, можно сделать вывод о том, что энергия связывания соединений на основе бензиламина и коричной кислоты имеет более высокие значения чем капсаицин, а значит и большее сродство с рецептором. Следовательно, в дальнейшем результаты исследования можно использовать для синтеза аналогов капсаицина, чтобы исследовать полученные вещества на культурах клеток.

**Заключение.** В данном исследовании показано, что активность проанализированных капсаициномиметиков по отношению к ванилоидным рецепторам зависит от природы и взаимного расположения функциональных групп и структурных фрагментов (положение и количество кратных связей,

алкильных групп и др.). Бензиламин и галогенангидриды (сложные эфиры) коричной, нероловой или гераневой кислот, а также их замещенные аналоги являются удобным субстратом в синтезе потенциальных капсаициномиметиков. Полученные результаты являются основой для планирования синтеза веществ-кандидатов группы капсаициномиметиков для изучения противоопухолевой активности *in vitro*.

### Литература.

1. Reyers-Escogido Mde, L. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin / L. Reyers-Escogido Mde, E. G. Gonzalez-Mondragon, E. Vazquez-Tzompantzi // *Molecules*. — 2011. — P. 1253–1270.
2. Antibacterial activity of *Capsicum annuum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans* / M. Santos [et al.] // *J. Nat. Med.* — 2012. — Vol. 66. — P. 354–356.
3. Conway, S. J. TRPping the switch on pain: an introduction to the chemistry and biology of capsaicin and TRPV1 / S. J. Conway // *Chemical Society reviews*. — 2008. — P. 1530–45.
4. Zallasi, A. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept / A. Zallasi, D. N. Cortright, C. A. Blum // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2007. — P. 357–372.
5. Kaga, H. A facile procedure for synthesis of capsaicin / H. Kaga, M. Miura, K. Orito K. // *J. Org. Chem.* — 1999. — P. 3477–3478.
6. Arnab, S. Induction of Apoptosis by Eugenol and Capsaicin in Human Gastric Cancer AGS Cells- Elucidating the Role of p53 / S. Arnab, S. Bhattacharjee, D. P. Mandal // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* — 2015. — P. 6753–6759.
7. Expression and functionality of TRPV1 receptor in human MCF-7 and canine CF41 cells / C. Vercelli [et al.] // *Vet. Comp. Oncol.* — 2013. — P. 77–155.
8. Capsaicin sensitizes TRAIL-induced apoptosis through Sp1-mediated DR5 up-regulation: Involvement of Ca<sup>2+</sup> influx / D. O. Moon [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 2012. — P. 87–95.
9. Yousefnia, S. The influence of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligands on cancer cell tumorigenicity / S. Yousefnia, S. Momenzadeh, F. Seyed Forootan // *Gene*. — 2018. — Vol. 647. — P. 14–22.
10. Shaherin Basith Harnessing the Therapeutic Potential of Capsaicin and Its Analogues in Pain and Other Diseases / B. Shaherin [et al.] // *Molecules*. — 2016. — P. 966.
11. Bikadi, Z. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock / Z. Bikadi, E. Hazai // *J. Cheminf.* — 2009. — P. 1–15.

## Structure based drug-design in finding of capsaicinomimetics' antitumor medications

*Todar T. Lakhvich, Anastasiya M. Pirshtuk,*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

Structure-activity relationship with respect to the vanilloid receptors TRPV1 and PPAR gamma has been studied *in silico* for a series of capsaicinomimetics. Based on the data obtained, the computer aid drug design has been carried in context of finding of the substances with the highest affinity to PPAR gamma receptor in context of milligent cell apoptosis activity.

**Keywords:** capsaicin, capsaicinomimetics, docking, rational drug-design, structure-activity relationship.

*Поступила 27.11.2020*