

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی شیراز

دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد
در رشته شیمی گرایش شیمی فیزیک

طراحی کامپیوتری مهارکننده‌های جدید انتخابی سیکلوآکسیژناز-۲ (COX-2) با استفاده از شبیه‌سازی‌های داکینگ و دینامیک مولکولی

نگارش:

زهرا جعفری

استاد راهنما:

دکتر دلارا محمدآقائی

استاد مشاور:

دکتر عبدالرضا نکوئی

شهریور ماه ۱۳۹۲

تقدیم به خانواده‌ی عزیزم

به پدر و مادرم که بودند نشان تاج افتخاری است بر سرم و نشان دلیلی است بر بودنم.

به خواهر نازنین و دو برادر عزیزم که وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه آرامش من است.

پاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان، بخشید و خوشه چینی از علم و معرفت را روزی مان ساخت.

بر حسب وظیفه و از باب "من لم یسکر المنعم من المخلوقین لم یسکر الله عزوجل":

از خانواده می عزیزم که در تمام عرصه های زندگی یار و یاور می بی چشم داشت برایم بوده اند؛

از استاد با کمال و شایسته، سرکار خانم دکتر دلار احمد آقایی که در کمال سه صدر، با حسن خلق و فروتنی،

زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛

از استاد مشاور فرزانه و دلوز، جناب آقای دکتر عبدالرضا کنونی که بار، بنمودهای علمی و اخلاقی ارزنده شان

مراهمرای نمودند؛

از دوست عزیزم، سرکار خانم فاطمه کشاورز که با همکاری و همراهی شان این تحقیق به نتیجه رسید؛

و از سایر اساتید دانشکده، آقایان دکتر محمد مهدی علویان مهر، دکتر محمد نوید سلطانی راد، دکتر رضا خلیفه و سرکار خانم

دکتر سمیه بهروز که در طول این دوره، همت آموزش و ارتقای علمی بنده، زحمت کشیده اند، کمال تشکر و قدردانی

را دارم.

باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را پاس گوید.

چکیده

طراحی کامپیوتری مهارکننده‌های جدید انتخابی سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) با

استفاده از شبیه‌سازی‌های داکینگ و دینامیک مولکولی

نگارش:

زهرا جعفری

در حال حاضر مهارکننده‌های انتخابی COX-2 توجه زیادی را در طراحی داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) به خود جلب کرده‌اند زیرا آن‌ها عاری از اثرات جانبی معمول NSAIDsهای کلاسیک‌اند. تحقیق پیش رو بر طراحی مهارکننده‌های جدید انتخابی COX-2 متمرکز است. ابتدا مدل‌های سه‌بعدی آنزیم‌های COX با مدل‌سازی هم‌سانی ساخته شدند. سپس ساختارهای مدل‌سازی شده تحت شبیه‌سازی دینامیک مولکولی قرار گرفتند تا ساختارهای تعادلی آن‌ها در شرایط فیزیولوژیکی حاصل شود. ترکیبات رهبر مناسب، به وسیله‌ی داکینگ ۳۵ مهارکننده‌ی گزینشی انتخاب گردیدند. بر طبق ساختارهای رهبر، ترکیباتی با اسکلت‌های جدید شامل هسته‌های تری‌آزول، پیرازول و ایمیدازول طراحی شدند. شبیه‌سازی داکینگ برای تمام ترکیبات طراحی شده در مقابل آنزیم‌ها انجام شد. ارزیابی ترکیبات طراحی شده با توجه به کارایی لیگاند، اندیس گزینش‌پذیری و خصوصیات ADMET، 5^1 ، 15^1 ، 24^1 ، 18^P و 22^P را به عنوان کاندیدهای دارویی جدید متمایز کرد.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فصل ۱: مقدمه.....
۲	۱-۱ آنزیم سیکلواکسیژناز (COX).....
۲	۱-۱-۱ مقدمه.....
۶	۲-۱-۱ اطلاعات ژنتیکی COXs.....
۷	۳-۱-۱ ساختار COXs.....
۱۰	۲-۱ التهاب.....
۱۰	۳-۱ انواع داروهای ضدالتهاب.....
۱۱	۱-۳-۱ داروهای ضدالتهاب استروئیدی.....
۱۲	۲-۳-۱ داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی.....
۱۳	۴-۱ اکتشاف دارو به کمک کامپیوتر.....
۱۶	۵-۱ همانندی دارویی.....
۱۸	۶-۱ مدل سازی همسانی.....
۱۹	۷-۱ شبیه سازی دینامیک مولکولی (MDS).....
۲۳	۸-۱ بهینه سازی ساختار هندسی.....
۲۶	۹-۱ شبیه سازی اتصال مولکولی.....

۱۰-۱ هدف تحقیق و اهمیت آن	۲۷
فصل ۲: مروری بر مطالعات پیشین.....	۲۹
۱-۲ مقدمه	۳۰
۲-۲ مروری بر تحقیقات گذشته	۳۰
۳-۲ نتیجه‌گیری	۳۸
فصل ۳: روش پیشنهادی برای حل مساله.....	۳۹
۱-۳ مقدمه	۴۰
۲-۳ مدل‌سازی هم‌سانی	۴۰
۳-۳ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی	۴۱
۴-۳ آماده کردن لیگاندها	۴۷
۵-۳ شبیه‌سازی اتصال مولکولی	۵۳
فصل ۴: نتایج و تفسیر آن‌ها.....	۵۶
۱-۴ مدل‌سازی هم‌سانی	۵۷
۲-۴ شبیه‌سازی‌های مولکولی	۵۸
۱-۲-۴ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی	۵۸
۲-۲-۴ شبیه‌سازی اتصال مولکولی	۶۰
۳-۴ طراحی دارو	۶۳
۴-۴ جمع‌بندی و پیشنهادها	۷۶
مراجع.....	۷۹

فهرست جدول‌ها

صفحه	عنوان
۱۵	جدول ۱-۱: تقسیم‌بندی روش‌های طراحی دارو به کمک کامپیوتر
۴۸	جدول ۱-۳: ساختار مهارکننده‌های انتخابی COX-2
۵۷	جدول ۱-۴: جزئیات مدل‌سازی هم‌سانی آنزیم‌های COX
۶۲	جدول ۲-۴: نتایج داکینگ ۳۵ مهارکننده‌ی COX-2
۶۳	جدول ۳-۴: طبقه‌بندی مهارکننده‌های COX-2 بر اساس ساختار
۶۶	جدول ۴-۴: لیست استخلاف‌های R_1 و R_2
۶۷	جدول ۵-۴: نتایج داکینگ مشتقات تری‌آزول
۶۸	جدول ۶-۴: نتایج داکینگ مشتقات پیرازول
۶۹	جدول ۷-۴: نتایج داکینگ مشتقات ایمیدازول
۷۴	جدول ۸-۴: نتایج حاصله از مرورگر OSIRIS
۷۵	جدول ۹-۴: نتایج حاصله از مرورگر OSIRIS برای ترکیبات رهبر
۷۵	جدول ۱۰-۴: ساختار شیمیایی و جایگاه اتصال کاندیدهای دارویی جدید به COX-2

فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
۲	شکل ۱-۱: ساختار آراشیدونیک اسید.....
۳	شکل ۲-۱: متابولیسم آراشیدونیک اسید.....
۴	شکل ۳-۱: مسیر سیکلواکسیژناز.....
۵	شکل ۴-۱: سایت‌های کاتالیزوری آنزیم سیکلواکسیژناز.....
۷	شکل ۵-۱: ساختار کریستالی COX-1 در حالت کمپلکس با فلوربپروفن.....
۷	شکل ۶-۱: ساختار کریستالی COX-2 در حالت کمپلکس با یک مهارکننده‌ی انتخابی.....
۹	شکل ۷-۱: ساختار کریستالی COX-2 در حالت کمپلکس با دیکلوفناک.....
۹	شکل ۸-۱: انطباق سایت فعال COX-2 (بنفش) و COX-1 (سبز).....
۱۲	شکل ۹-۱: ساختار کلی استروئیدها و چند داروی کورتونی.....
۲۴	شکل ۱۰-۱: نمودار انرژی الکترونی برای بوتان بر حسب زاویه دووجهی CCCC.....
۳۱	شکل ۱-۲: ساختار روفکوکسیب.....
۳۱	شکل ۲-۲: طرح کلی روفکوکسیب برای مطالعات QSAR.....
۳۲	شکل ۳-۲: طرح کلی ۲-(۵-فنیل-پیرازول-۱-یل)-۵-متان سولفونیل پیریدین.....
۳۳	شکل ۴-۲: ترکیبات استخراج شده از منگوستین.....
۳۵	شکل ۵-۲: ترکیبات طراحی شده با توجه به ساختار دیکلوفناک.....

عنوان

صفحه

- شکل ۲-۶: ساختار گالیک اسید ۳۶
- شکل ۲-۷: ساختار لیگاندهای مورد بررسی در مطالعات لگاسپی ۳۷
- شکل ۳-۱: پتانسیل لنارد-جونز بر حسب فاصله ۴۴
- شکل ۳-۲: فایل ورودی برای بهینه‌سازی ساختاری Nimesulid ۵۲
- شکل ۳-۳: نحوه‌ی تنظیم مرکز و ابعاد جعبه‌ی گرید در اتوداک وینا ۵۴
- شکل ۴-۱: نمودار RMSD اسکلت آنزیم‌های COXs ۵۹
- شکل ۴-۲: کمپلکس COX-2 با ترکیب شماره ۵ ۶۳
- شکل ۴-۳: کمپلکس COX-2 با ترکیب شماره ۱۶ ۶۴
- شکل ۴-۴: کمپلکس COX-2 با ترکیب شماره ۲۱ ۶۴
- شکل ۴-۵: کمپلکس COX-2 با ترکیب شماره ۲۳ ۶۴
- شکل ۴-۶: کمپلکس COX-2 با ترکیب شماره ۲۴ ۶۵
- شکل ۴-۷: انطباق تصاویر جفت شدن ترکیبات رهبر با COX-2 ۶۵
- شکل ۴-۸: ساختار اسکلت‌های طراحی شده الف) تری‌آزول ب) پیرازول پ) ایمیدازول ۶۶
- شکل ۴-۹: فرم‌های ایزومری تری‌آزول‌ها الف) ۱،۲،۳-تری‌آزول ب) ۱،۲،۴-تری‌آزول ۶۸
- شکل ۴-۱۰: شمایی از محیط کار مرورگر OSIRIS ۷۱
- شکل ۴-۱۱: دیاگرام توزیع cLogP در داروهای تجاری ۷۲
- شکل ۴-۱۲: دیاگرام توزیع LogS در داروهای تجاری ۷۲
- شکل ۴-۱۳: دیاگرام توزیع وزن مولکولی در داروهای تجاری ۷۳

فهرست نشانه‌های اختصاری

COX: Cyclooxygenase

AA: Arachidonic Acid

NSAIDs: Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs

SBDD: Structure Based Drug Design

LBDD: Ligand Based Drug Design

QSAR: Quantitative Structure Activity Relationship

LE: Ligand Efficiency

MDS: Molecular Dynamics Simulation

PES: Potential Energy Surface

NCBI: National Center for Biotechnology Information

HF: Hartree-Fock

ADT: Auto Dock Tools

RMSD: Root Mean Square Deviation

SI: Selectivity Index

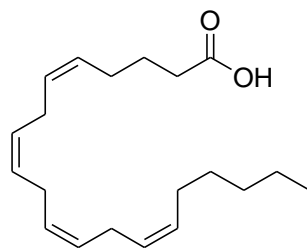
فصل ۱

مقدمه

۱-۱ آنزیم سیکلواکسیژناز (COX)^۱

۱-۱-۱ مقدمه

آراشیدونیک اسید (AA)^۲ عمده‌ترین اسید چرب اشباع نشده‌ای است که در سیستم بدن پستانداران وجود دارد [۱]. این اسید دارای بیست کربن و چهار پیوند دوگانه بوده و بیش‌تر از اسید لینولنیک^۳ موجود در غذا به دست می‌آید. در بدن تنها به صورت استری^۴، به عنوان جزئی از فسفولیپیدهای غشاء سلول یافت می‌شود. شکل ۱-۱ ساختار آراشیدونیک اسید را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۱: ساختار آراشیدونیک اسید.

آنزیم فسفولیپاز^۵ فسفولیپیدهای غشاء سلول را به اسید آراشیدونیک تبدیل می‌کند [۲]. با

توجه شکل ۱-۲، AA به وسیله‌ی سه مسیر مهم اکسیژن‌دار می‌شود که عبارتند از:

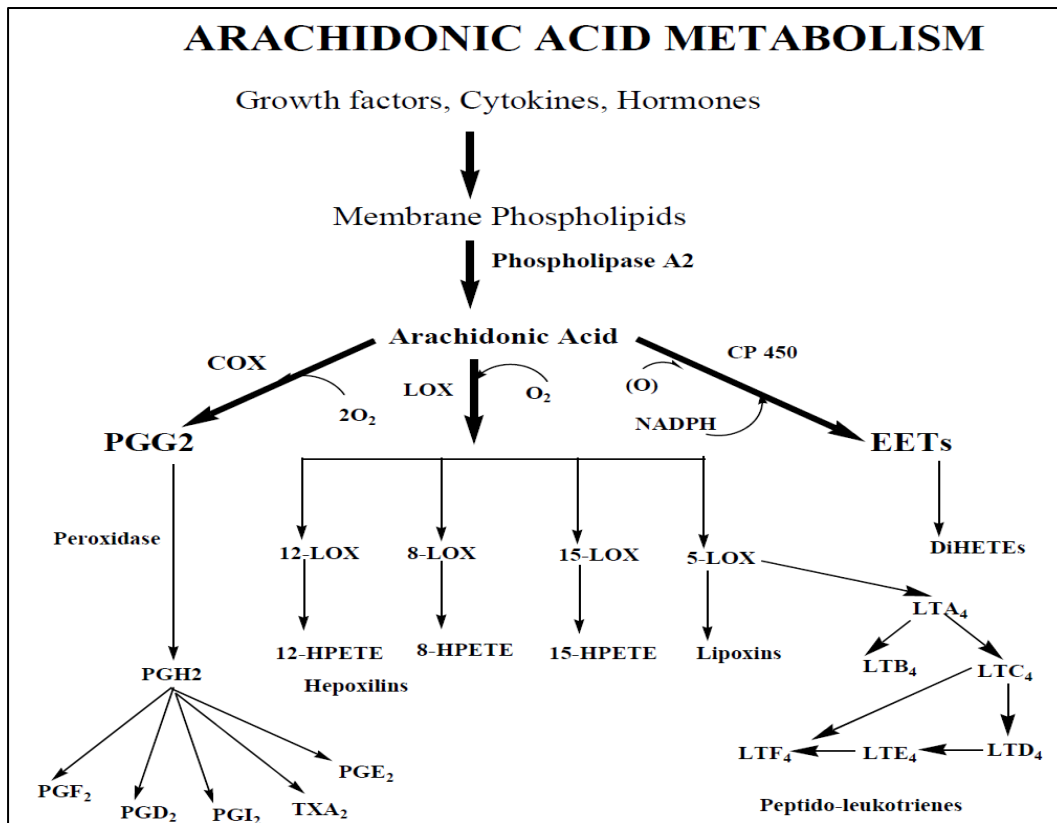
(۱) مسیر سیکلواکسیژناز

(۲) مسیر لپوکسیژناز^۶

(۳) مسیر اپوکسیژناز^۷ [۱]

Cyclooxygenase^۱
Arachidonic Acid^۲
Linolenic acid^۳
Esterify^۴
Phospholipase enzyme^۵
Lipoxygenase^۶
Epoxygenase^۷

فرآورده‌هایی که از سوخت‌وساز اسید آراشیدونیک به دست می‌آیند تاثیرات متنوعی بر فرآیندهای زیستی از جمله التهاب هموستاز^۱ دارند.



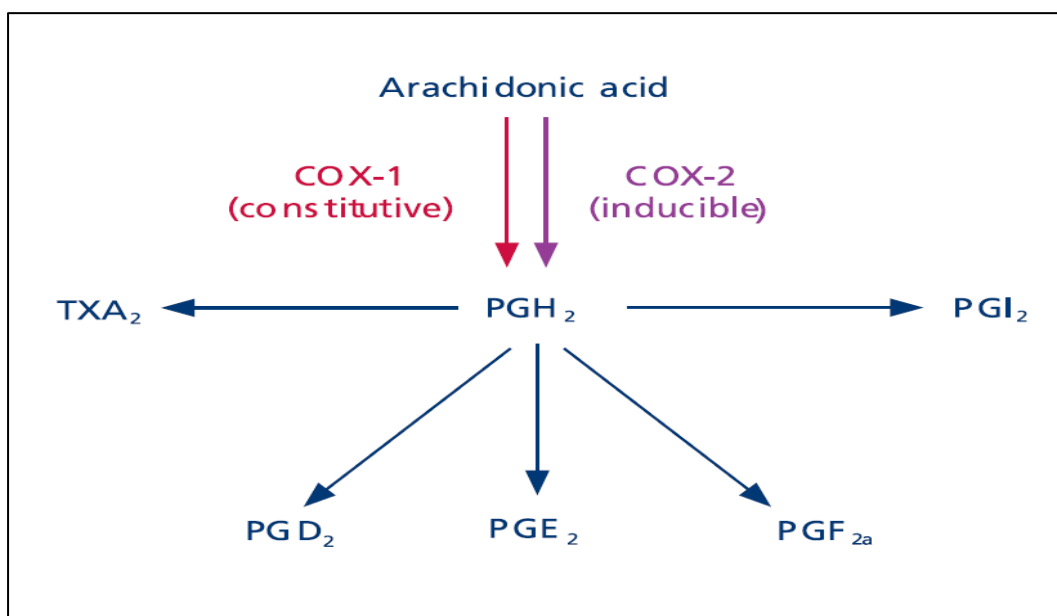
شکل ۱-۲: متابولیسم آراشیدونیک اسید.

آنزیم سیکلواکسیژناز (پروستاگلاندین H₂ سینتاز^۲ یا پروستاگلاندین G/H سینتاز^۳) تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین H₂^۴ را به عنوان اولین مرحله در سنتز زیستی^۵ پروستاانوئیدها^۶ (پروستاگلاندین‌ها^۷، پروستااسایکلین^۸ و ترومبوکسان^۹) کاتالیز می‌کند [۴،۳].

- Hemostase^۱
- Prostaglandin H₂ synthase (PGHS)^۲
- Prostaglandin G/H synthase^۳
- Prostaglandin H₂ (PGH₂)^۴
- Biosynthesis^۵
- Prostanoids^۶
- Prostaglandins (PGs)^۷
- Prostacyclin^۸
- Thromboxane^۹

این مسیر در شکل ۱-۳ به تصویر کشیده شده است.

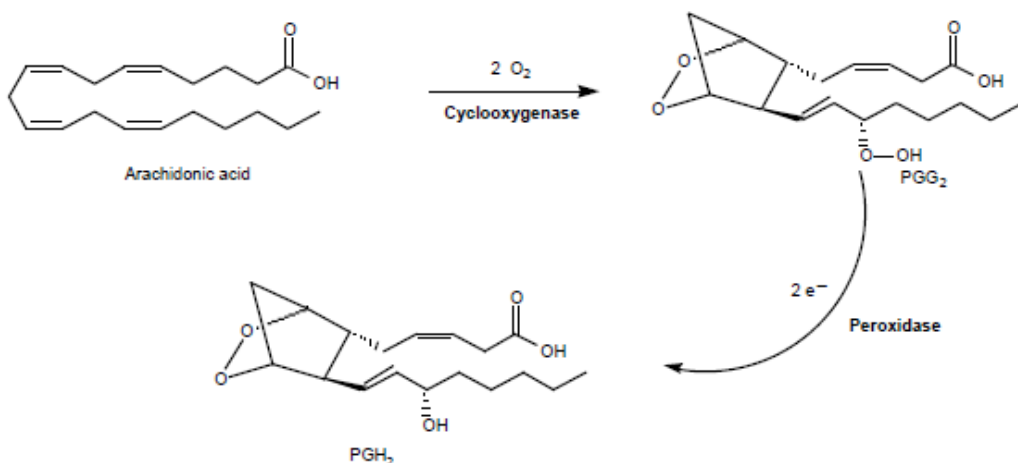
پروستاگلاندین‌ها از مهم‌ترین واسطه‌های شیمیایی در بدن می‌باشند که با تاثیر بر روی گیرنده‌های مختلف سلولی، تاثیرات متنوعی در بدن اعمال می‌کنند. این مولکول‌های لیپیدی بیست کربنه، دارای انواع مختلفی مانند F_2 ، E_2 آلفا، PGI_2 و ... می‌باشند. پروستاگلاندین‌ها یکی از مهم‌ترین واسطه‌های التهاب می‌باشند و مهار ساخت آن‌ها توسط داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی موجب کاهش التهاب می‌شود. این واسطه‌ها هم-چنین در افزایش حرکات روده، بهبود دفاع مخاطی معده و افزایش جریان خون کلیوی نیز نقش دارند و به همین دلیل در تهیه داروهای متعددی مورد استفاده قرار گرفته‌اند.



شکل ۱-۳: مسیر سیکلواکسیژناز.

همان‌طور که در شکل ۱-۴ نشان داده شده آنزیم COX دو سایت کاتالیزوری مجزا دارد. یک سایت با فعالیت سیکلواکسیژنازی که در آن آراشیدونیک اسید به هیدروپروکسی

اندوپروکساید^۱ اکسید می شود. متعاقباً این ماده به وسیله‌ی سایت پروکسیدازی به هیدروکسی اندوپروکساید تبدیل می‌گردد [۵]. در نهایت هیدروکسی اندوپروکساید به وسیله‌ی گستره‌ای از مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی به پروستانوئیدهای اولیه مبدل می‌شود [۴].



شکل ۱-۴: سایت‌های کاتالیزوری آنزیم سیکلواکسیژناز.

فعالیت COX از دیرباز در دست مطالعه بوده است. آنزیم سیکلواکسیژناز برای نخستین بار در سال ۱۹۷۶ خالص سازی شده [۶] و جداگانه توسط سه گروه در سال ۱۹۸۸ تکثیر گردید [۷، ۸، ۹]. در آغاز دهه ۱۹۹۰ چندین آزمایشگاه، محصولی از یک ژن ثانویه با فعالیتی مشابه COX را معرفی کردند و آن را COX-2 (ایزوفرم القایی)^۲ در مقابل COX-1 (ایزوفرم ساختاری)^۳ نامیدند [۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳]. (ایزوآنزیم‌ها^۴، آنزیم‌هایی هستند که در ترکیب اسیدهای آمینه تفاوت دارند اما واکنش شیمیایی یکسانی را تسریع می‌کنند).

کشف فرم دوم COX در آغاز دهه‌ی ۱۹۹۰ مهم‌ترین رویداد در بیولوژی پروستانوئیدها بود. تحقیقات نشان داده که COX-1 به مقدار زیاد در پلاکت‌ها [۱۴]، سلول‌های عروقی

^۱ Hydroperoxy endoperoxide (PGG₂)
^۲ Inducible isoform
^۳ Constitutive
^۴ Isoenzymes

اندوتلیال^۱ [۱۵]، معده [۱۷،۱۶] و کلیه‌ها [۱۸-۲۰] وجود دارد. COX-1 عمدتاً در سلول‌های غیرالتهابی یافت شده و پروستاگلاندین‌های حاصل از این مسیر، مسئول حفظ عملکرد فیزیولوژیکی طبیعی بدن می‌باشند [۲۱]. پروستاگلوئیدهایی که از COX-1 مشتق می‌شوند نقش مهمی در توقف خونریزی زخم‌های گوارشی و کلیه‌ها دارند [۲۲]. در مقابل، COX-2 تقریباً در شرایط فیزیولوژیکی^۲ مشاهده نمی‌شود، اما بیان آن به وسیله‌ی دامنه‌ی گسترده‌ای از محرک‌ها مانند اینترلوکین-۱^۳ [۲۳،۲۴]، لیپوپلی ساکارید^۴ [۲۵-۲۷]، سیتوکین‌های پیش التهابی و فاکتورهای رشد [۲۸-۳۲]، افزایش می‌یابد. از این جا می‌توان به نقش COX-2 در هر دو فرآیند التهاب و کنترل رشد سلول‌ها پی برد [۳۳،۳۴].

مشاهده شده که مقادیر زیادی از COX-2 در ستون فقرات مدل‌های حیوانی التهاب ترشح می‌شود [۳۵]. علاوه بر این مهارکننده‌های اختصاصی COX-2، خصوصیات ضد التهابی، تب بر و ضد درد را در چند مدل حیوانی و انسانی نشان داده‌اند. این شواهد اهمیت COX-2 را در فرایندهای التهابی نشان می‌دهد.

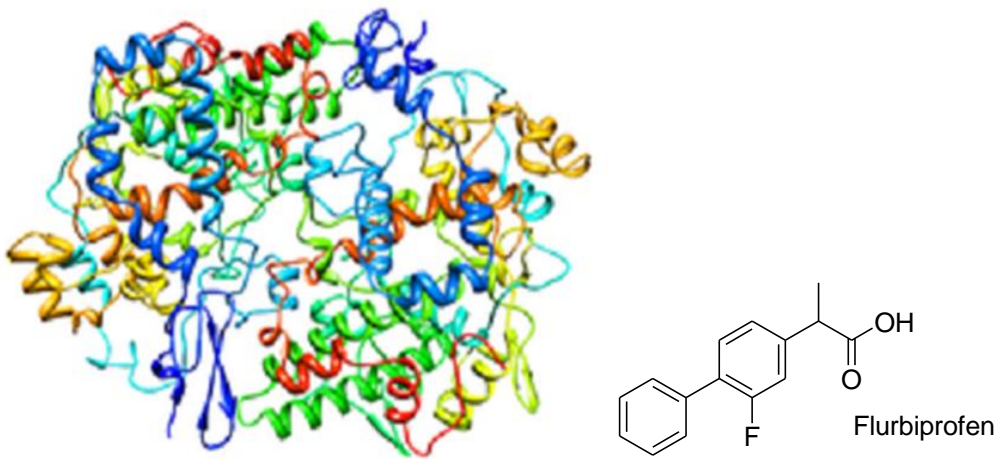
۱-۱-۲ اطلاعات ژنتیکی COXs

ژن‌های COX انسانی بر روی کروموزوم‌های مختلف قرار گرفته‌اند. ژن COX-1 روی کروموزوم ۹ و ژن COX-2 روی کروموزوم ۱ قرار دارد [۳۶،۳۷]. ژن COX-1 انسانی شامل ۱۱ اکسون ۲۲Kb، اما ژن COX-2 ۱۰ اکسون ۸/۳Kb دارد [۳۸،۳۹]. سائز نسبتاً کوچک‌تر COX-2 یکی از نشانه‌های زود هنگام بودن^۵ این ژن است [۴۰]. ژن‌های زود هنگام، ژن‌هایی هستند که در پاسخ به محرک‌های سلولی، سریع فعال می‌شوند.

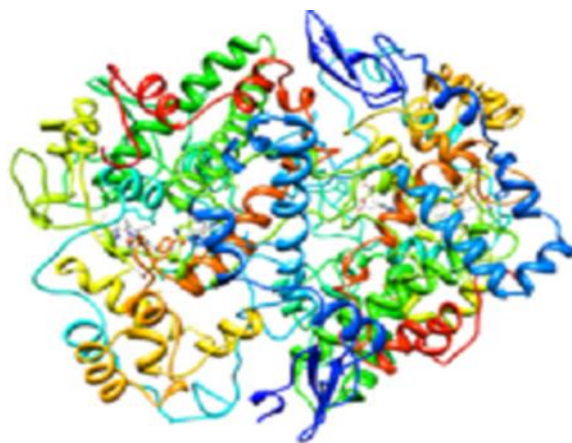
Vascular endothelial cells^۱
Physiological^۲
Interleukin-1^۳
Lipopolysaccharide^۴
Immediate early^۵

۳-۱-۱ ساختار COXs

هر دو فرم ایزومری COX از نظر ساختار و فعالیت آنزیمی بسیار شبیه می‌باشند. هر دو دارای وزن مولکولی حدود^۱ ۷۱ KDa بوده و بیش‌تر از ۶۰۰ آمینو اسید دارند، که در این میان تقریباً ۶۰ درصد [۴۱] توالی مشابه وجود دارد. شکل‌های ۱-۵ و ۱-۶ ساختار کریستالی این آنزیم‌ها را نشان می‌دهند.



شکل ۱-۵: ساختار کریستالی COX-1 در حالت کمپلکس با فلوربپروفن.



شکل ۱-۶: ساختار کریستالی COX-2 در حالت کمپلکس با یک مهارکننده‌ی انتخابی.

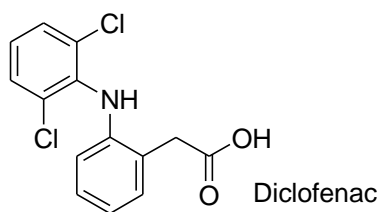
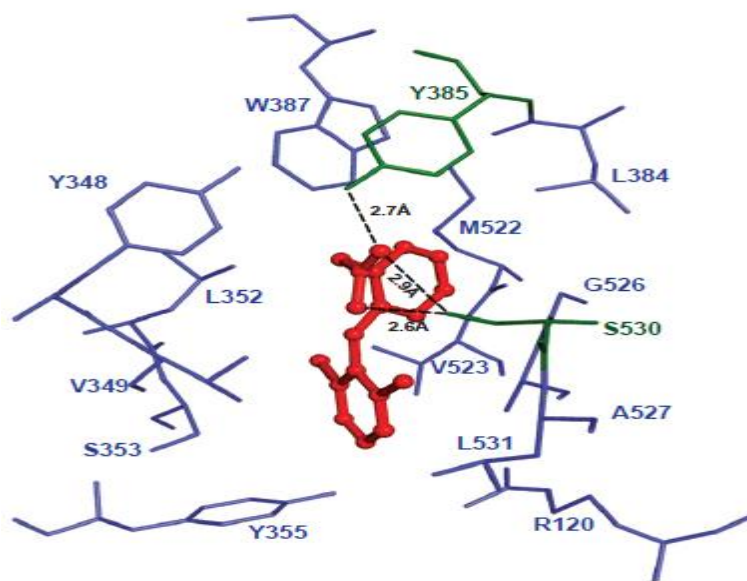
^۱ Kilodalton

هر دو فرم ایزومری آنزیم، مکانیسم‌های سیکلواکسیژنازی و پروکسیدازی یکسانی دارند، اگرچه تفاوت‌های کوچکی دیده می‌شود.

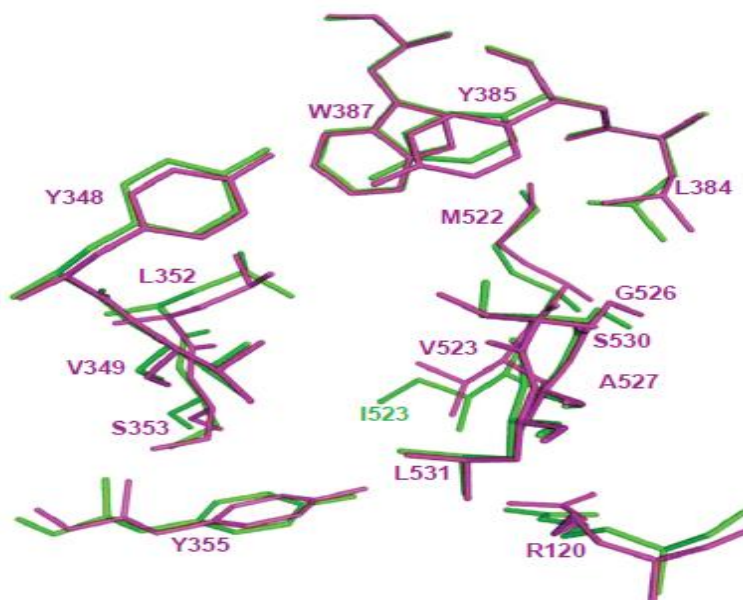
مهارکننده‌ی شناخته‌شده‌ای چون دیکلوفناک^۱، در کمپلکس با COX-2، با تیروزین^۲ ۳۸۵ و سرین^۳ ۵۳۰ [۴۲] تشکیل پیوند هیدروژنی می‌دهد. این مطلب در شکل ۱-۷ نشان داده شده است. آسپیرین^۴ به طور برگشت‌پذیر با سرین ۵۳۰ پیوند می‌دهد، در حالی که بیش‌تر داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی به طور برگشت‌پذیر با تیروزین ۳۸۵ و آرژینین^۵ ۱۲۰ تشکیل پیوند می‌دهند [۴۴،۴۳].

محل اتصال لیگاندها به آنزیم‌های COX به جز موقعیت ۵۲۳ که در COX-1 ایزولوسین^۶ و در COX-2 والین^۷ می‌باشد، تقریباً مشابه است؛ بنابراین همان‌طوری که در شکل ۱-۸ نشان داده شده است، جایگاه فعال COX-2 از جایگاه فعال COX-1 بزرگ‌تر است [۴۶،۴۵]. از این اختلاف می‌توان برای طراحی مهارکننده‌های اختصاصی COX-2 بهره گرفت.

Diclofenac^۱
Tyrosine^۲
Serine^۳
Aspirin^۴
Arginine^۵
Isoleucine^۶
Valine^۷



شکل ۱-۷: ساختار کریستالی COX-2 در حالت کمپلکس با دیکلوفناک.



شکل ۱-۸: انطباق سایت فعال COX-2 (بنفش) و COX-1 (سبز).