

NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC THƯ VIỆN HỢP CHẤT HỮU CƠ THƯƠNG MẠI TÌM KIẾM NHỮNG CHẤT ỨC CHẾ MỚI CHO PROTEIN MMP13 TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH VIÊM XƯƠNG KHỚP

NGUYỄN VĂN DIN - Khoa Hoá, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng, tác giả chính;
NGUYỄN TRƯỜNG TIẾN, NGÔ MINH KHÔI - Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 2, tác giả chính;
ĐẶNG THỊ MỸ HUỆ - Khoa Dược, Đại học Kỹ thuật Y Dược Đà Nẵng

SUMMARY:

Osteoarthritis is the most common form of arthritis, affecting over hundred million people all over the world. Enzyme matrix metalloproteinase-13 plays a vital role in cartilage destruction involved in osteoarthritis, thus protein matrix metalloproteinase-13 is considered as an attractive therapeutic target. Molecular dynamics simulations were performed on the crystal structure of matrix metalloproteinase-13 to generate dynamic conformations. A database that contains over 1.5 millions commercial small molecules was screened using structure-based drug design. Herein we report 10 new selective matrix metalloproteinase-13 inhibitors that can be optimized in order to develop drugs for osteoarthritis treatment.

Key words: MMP13, inhibitors, pharmacophore, docking, selective.

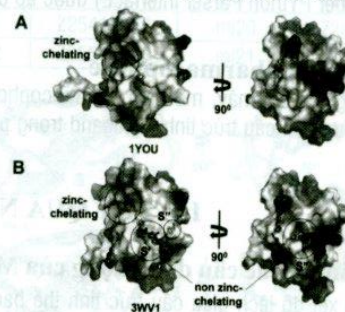
I. GIỚI THIỆU

Viêm xương khớp (Osteoarthritis (OA)) là một trong những căn bệnh phổ biến, ảnh hưởng đến hàng trăm triệu người lớn tuổi trên toàn thế giới[1]. OA được chia thành ba dạng: viêm khớp gối, tay, hoặc hông. Trong đó, viêm khớp gối là dạng phổ biến nhất, chiếm gần 60% tổng số bệnh nhân lớn tuổi (trên 65 tuổi) ở khu vực Bắc Mỹ và châu Âu[2]. Tính đến thời điểm hiện tại việc điều trị OA chỉ tập trung vào khía cạnh giảm đau bằng cách sử dụng các thuốc acetaminophen (paracetamol), không steroid (NSAID), corticosteroids[3]. OA được chứng minh có quan hệ đến sự thay đổi cấu trúc diễn ra trong sụn khớp, lớp xương dưới sụn, dây chằng, bao khớp, màng hoạt dịch, và cơ nhu động[4]. Do đó, trong những năm gần đây, liệu pháp điều trị đặc trưng hướng tới sự ức chế thoái hoá lớp sụn, sự tái tạo lớp sụn; hay sự ức chế thoái hoá xương được quan tâm cao[5]. Tuy nhiên những liệu pháp này vẫn chưa được công nhận trong điều trị OA.

Enzyme matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) có vai trò trung tâm trong quá trình thoái hoá lớp sụn[6], vì vậy, ức chế hoạt động của các protein này được xem là một trong những liệu pháp hữu hiệu cho điều trị OA. Nhiều chất ức chế non-zinc MMP13 chứa các bộ khung cấu trúc khác nhau như ethers, biaryls (aryltetrazoliums, arylfurans, pyrazole-indoles), pyrimidines, and aryl/cycloalkyl-fused pyrimidines đã được nghiên cứu[7]; nhưng vẫn chưa có chất nào được công nhận sử dụng cho điều trị OA. Vì vậy, nghiên cứu này hướng đến tìm kiếm hợp chất ức chế non-zinc MMP13 mới. Những chất này có thể được xem như

hợp chất lead trong việc phát triển loại thuốc mới trong điều trị bệnh viêm xương khớp.

Trong bài báo này, chúng tôi sử dụng phương pháp thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc (structure-based drug design (SBDD)) để dự đoán các chất ức chế mới cho MMP13. Thông qua phương pháp SBDD với 2 giai đoạn chính: sàng lọc pharmacophore và sàng lọc docking phân tử; chúng tôi đã tìm ra 10 phân tử hữu cơ mới có khả năng ức chế chọn lọc cho MMP13. Những phân tử này được dự đoán có tính đặc trưng cho MMP13 so với các protein còn lại của họ MMP.



Hình 1. Cấu trúc tinh thể MMP13 với các ligand. (A) ligand pyrimidinetrione liên ở tâm zinc chelating của protein (PDB 1YOU). (B) ligand liên kết với tâm non-zinc chelating (PDB 3WV1). Tâm này gồm vùng liên kết chính S' và vùng mở rộng S''.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Cấu trúc protein và thư viện phân tử hữu cơ

Cấu trúc tinh thể của phức MMP13-ligand gồm hai loại: tinh thể ligand có thể liên kết với tâm hoạt tính kẽm (zinc chelating) hoặc liên kết với tâm không hoạt tính kẽm (non-zinc chelating). Ví dụ, trong phức hợp tinh thể mã PDB 1YOU[8], ligand pyrimidinetrione liên kết với tâm zinc chelating (Hình 1A). Ligand liên kết với tâm non-zinc chelating có tính chọn lọc cao với MMP13; do đó, trong nghiên cứu này, cấu trúc tinh thể phức hợp MMP13 non-zinc chelating ligand có mã số protein PDB 3WV1 [9] được sử dụng. Tâm non-zinc chelating gồm hai tâm: tâm liên kết chính S' và tâm liên kết mở rộng S'', tương tác tại vùng S'' được xem là yếu tố quyết định tính ức chế chọn lọc của chất ức chế MMP13[10] (Hình 1B). Cấu trúc protein được xử lý bằng phần mềm MOE phiên bản 2018[13].

Thư viện chứa hơn 1,5 triệu phân tử hữu cơ thương mại dạng 2D được sàng lọc theo quy tắc Lipinski[14] và veber[15]. 1,2 triệu chất được giữ lại và được chuyển sang cấu dạng 3D. Các phân tử hữu cơ trong thư viện được đưa về dạng tồn tại chính trong môi trường cơ thể (pH = 7).

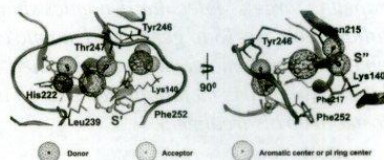
2. Mô phỏng động học phân tử

Phần mềm mô phỏng động học Gromacs phiên bản 2018[11] được áp dụng. Quá trình mô phỏng sử dụng các tham số: trường lực amber99sb, hộp dung môi rhombic dodecahedron, mô hình phân tử nước TIP3. Toàn bộ hệ thống chứa protein và hộp dung môi sau đó được đưa về trạng thái cân bằng nhiệt NVT, và cân bằng bằng áp suất NPT. Mô phỏng được tiến hành trong khoảng thời gian 20ns, được lặp lại 3 lần. Trong quá trình mô phỏng, thuật toán LINCS, và phương pháp Ewald PME được dùng. Để tạo tham số mô phỏng cho ligand, chương trình ACPYPE (AnteChamber PYthon Parser interfacE) được áp dụng.

3. Mô hình pharmacophore

Trong nghiên cứu này, mô hình pharmacophore được xây dựng dựa trên cấu trúc tinh thể ligand trong phức hợp

với protein có mã số cấu trúc PDB 3WV1[9]. Mô hình bao gồm 4 điểm nhận liên kết hydro (acceptor), 1 điểm cho liên kết hydro (donor) và 2 điểm vòng thơm (aromatic) (Hình 2). Tương tác tĩnh điện giữa nhóm mang điện tích âm của ligand và Lys140 của MMP13 đóng vai quyết định tính đặc trưng của chất ức chế MMP13 so với các chất ức chế MMP khác[10]. Do đó, hai điểm nhận liên kết hydro gần Lys140 sẽ được chọn là điểm chính yếu trong sàng lọc. Điều này có nghĩa là những hợp chất thu được của quá trình sàng lọc phải chứa nhóm chức tạo liên kết hydro với Lys140.



Hình 2. Mô hình pharmacophore của ligand trong tâm liên kết non-zinc chelating của MMP13 với mã số PDB 3WV1.

Mô hình bao gồm các điểm nhận liên kết hydro (acceptor) (màu xanh lam), điểm cho liên kết hydro (donor) (màu hồng), điểm vòng thơm (aromatic/pi ring) (màu cam).

4. Docking phân tử

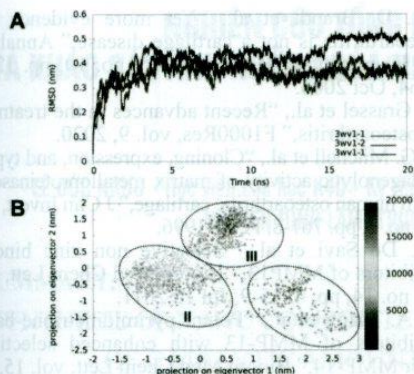
Các chất thu được từ giai đoạn sàng lọc pharmacophore được dock vào tâm liên kết non-zinc của protein MMP13 với sự hỗ trợ của hai phần mềm docking phân tử GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) phiên bản 2018[12] và MOE phiên bản 2018[13]. Thuật toán GA và hàm GoldScore được thiết lập trong GOLD. Trong khi đó MOE sử dụng thuật toán Triangle Matcher và hàm GBVI/WSA dG. 10 cấu dạng liên kết có năng lượng thấp nhất của mỗi chất được ghi lại ở kết quả đầu ra.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÌNH LUẬN

1. Khảo sát các cấu dạng động của MMP13

Để xem xét độ lệch giữa cấu trúc tinh thể ban đầu và cấu trúc mô phỏng lúc ở trạng thái cân bằng, giá trị RMSD được phân tích. Trong 3 lần mô phỏng, hệ đạt cân bằng sau 5ns, với giá trị RMSD giữa 0,35 – 0,45nm (3,5 – 4,5) (Hình 3A). Lần mô phỏng thứ nhất được chọn để khảo sát

cấu dạng động của protein theo phương pháp phân tích hợp phần cơ bản, (principle component analysis (PCA)) (Hình 3B). Theo đó, chuyển động MMP13 phân bố trong 3 vùng không gian chính: vùng xanh nước biển (vùng I, tương ứng khoảng thời gian 0 – 5ns), vùng xanh da trời – xanh lá cây – vàng (vùng II, tương ứng khoảng thời gian 5 – 15ns), vùng đỏ (vùng III, tương ứng khoảng thời gian 15 – 20ns).



Hình 3. Mô phỏng động học cho tinh thể MMP13. (A) Giá trị độ lệch chuẩn RMSD của cấu trúc MMP13 trong ba lần mô phỏng động học. (B) Chuyển động của protein trong khoảng thời gian mô phỏng qua phân tích PCA

Vùng I bị loại bỏ vì vùng này tương ứng với khoảng thời gian hệ chưa đạt cân bằng. Quá trình ghép nhóm cấu dạng được áp dụng cho hai vùng không gian II, III. 3 nhóm cấu dạng đầu tiên của mỗi vùng được chọn. Do vậy, có tổng cộng 6 nhóm cấu dạng MMP13 thu được từ quá trình mô phỏng động học phân tử. Mỗi nhóm được đại diện bởi một cấu dạng trung bình.

2. Sàng lọc hợp chất ức chế mới

Từ thư viện 3D của 1,2 triệu phân tử hữu cơ, quá trình sàng lọc pharmacophore giữ lại hơn 5.000 phân tử hữu cơ khớp với mô hình pharmacophore, có thể được gọi là pharmacophore hits. Để đảm bảo sự tương tác giữa những phân tử hữu cơ và tâm liên kết của protein. 5.000 pharmacophore hits được dock vào tâm liên kết non-zinc chelating của 7 cấu trúc MMP13 (gồm 1 cấu trúc tinh thể và 6 cấu dạng mô phỏng động học). Quá trình docking sẽ tạo ra tổng cộng 50.000 cấu dạng liên kết.

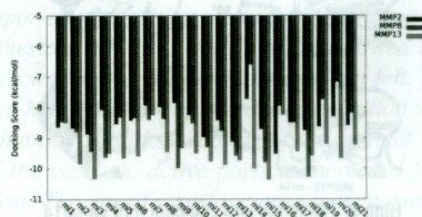
Những cấu dạng liên kết không khớp với mô hình pharmacophore, hoặc cho các tương tác bất lợi với các amino acid trong tâm liên kết của protein sẽ bị loại bỏ. Trong bước cuối cùng, những phân tử chứa các nhóm chức dễ bị chuyển hoá dưới sự tác động của các enzym gan, hay những phân tử chứa nhóm chức có khả năng gây độc tính sẽ bị loại. Kết quả thu được 21 phân tử hữu cơ có khả năng ức chế MMP13.

3. Khảo sát tính đặc trưng của những chất ức chế mới

Tính đặc trưng của các chất ức chế MMP13 được qui định bởi khả năng tương tác của chúng với Lys140 trong không gian mở rộng S'' thuộc tâm liên kết non-zinc chelating (tâm S'')[10]. Cấu trúc tinh thể của những protein thuộc họ MMP bao gồm MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13,

MMP14, MMP16, MMP20 được xem xét. Tâm liên kết của các cấu trúc tinh thể được khảo sát bằng sử dụng phần mềm Fmap[16] và MOE phiên bản 2018[13]. Chỉ có cấu trúc tinh thể của MMP2 với mã số PDB 1HOV[17] và MMP8 với mã số PDB 3DNG[18] chứa tâm liên kết S' với vùng mở rộng S'' tương tự như tâm liên kết của MMP13. Do đó, có thể khẳng định các chất ức chế mới cho MMP13 trong nghiên cứu này không có khả năng ức chế các protein khác trong họ MMP, ngoại trừ MMP2 và MMP8.

Để khảo sát mức độ ức chế của các chất ức chế mới trong hai protein MMP2 và MMP8, 21 chất ức chế thu được (kí hiệu từ mi1, mi2, ..., mi20, mi21) được dock vào tâm S' của hai protein này. Kết quả năng lượng liên kết docking chỉ ra rằng 15/21 chất liên kết với MMP13 tốt hơn MMP2, MMP8 (Hình 4).

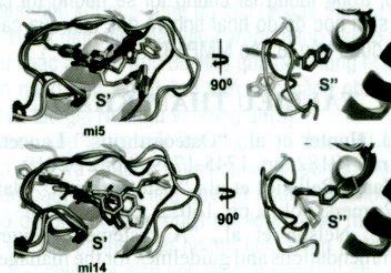


Hình 4. Giá trị năng lượng liên kết của 21 chất ức chế trong tâm liên kết non-zinc chelating của MMP2, MMP8 và MMP13

Thông qua phân tích tương tác của 15 chất này với amino acid của tâm liên kết, 5 chất bị loại vì chúng không cho liên kết tốt với Lys140. Như vậy 10 chất được chọn trở thành chất ức chế mới, tiềm năng cho MMP13. Mã số thương mại của các chất được chỉ ra trong Bảng 1.

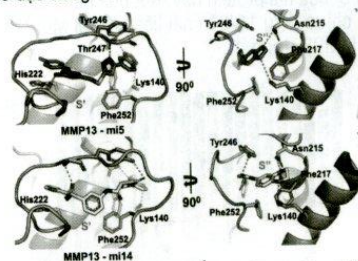
Bảng 1: Mã số thương mại của các chất ức chế mới

| Tên chất | Mã số | Tên chất | Mã số |
|----------|------------|----------|------------|
| mi2 | Z234975458 | mi14 | Z30001678 |
| mi5 | Z51154290 | mi17 | Z91933543 |
| mi10 | Z19456090 | mi19 | Z237846856 |
| mi11 | Z25417557 | mi20 | Z241266150 |
| mi12 | Z25505246 | mi21 | Z98049818 |



Hình 5. Vị trí tương tác của hợp chất mi5 và mi14 trong tâm liên kết MMP13 (màu cá hồi), MMP2 (màu xanh da trời), MMP8 (màu xanh lá cây).

Vị trí chiếm giữ của hai chất mi5 và mi14 trong các tâm liên kết non-zinc chelating của MMP13 (màu cá hồi), MMP2 (màu xanh da trời), MMP8 (màu xanh lá cây) được chỉ ra ở Hình 5. Qua đó, dễ dàng thấy rằng tương tác ở vùng S' chỉ diễn ra trong MMP13. Nhìn chung các chất mi5 và mi14 tạo ra tương tác không phân cực và liên kết hydro ở cả hai vùng S' và S'' trong tâm liên kết non-zinc chelating của MMP13 (Hình 6). Các vòng thơm của các ligand này tương tác không phân cực với các amino acid Phe217, His222, Tyr246, Phe252. Trong khi đó các nhóm chức phân cực của các ligand cho tương tác hydro với Thr247, Asn215, Lys140. Từ tương tác với Lys140, có thể nói rằng các chất ức chế này mang tính chọn lọc đặc trưng với MMP13.



Hình 6. Tương tác của các chất mi5 và mi14 trong tâm liên kết non-zinc chelating của MMP13.

IV. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã dự đoán thành công 10 phân tử ức chế mới cho protein MMP13 bằng cách áp dụng thành công quá trình thiết kế thuốc dựa trên nền tảng cấu trúc tinh thể. Quá trình nghiên cứu sử dụng các tính chất cấu trúc của hợp chất thuốc của qui tắc Lipinski and Veber. Bên cạnh đó, các phương pháp sàng lọc pharmacophore, sàng lọc docking phân tử đóng vai trò chính trong sàng lọc thư viện kích thước lớn chứa hơn 1,5 triệu chất hữu cơ. Để đảm bảo tính chọn lọc đặc trưng, liên kết của 21 phân tử trong tâm liên kết của các protein MMP2, MMP8 được khảo sát. Khảo sát giúp loại bỏ những chất có tính đặc trưng thấp, nhằm giúp tránh được hiệu ứng off-target. 10 chất được chọn như là chất ức chế chọn lọc tiềm năng cho MMP13. Để kiểm chứng những kết quả dự đoán, trong tương lai chúng tôi sẽ hướng tới các thí nghiệm sinh học để đo hoạt tính và độc tính của các hợp chất tìm được trên tế bào MMP13.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. J. Hunter et al., "Osteoarthritis," *Lancet*, vol. 393, no. 10182, pp. 1745-1759, Apr 27 2019.
- [2] J. Martel-Pelletier et al., "Osteoarthritis," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 2, pp. 16072, Oct 13 2016.
- [3] A. E. Nelson et al., "A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The chronic osteoarthritis management initiative of the U.S. bone and joint initiative," *Semin Arthritis Rheum*, vol. 43, no. 6, pp. 701-12, Jun 2014.
- [4] K. D. Brandt et al., "Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 65, no. 10, pp. 1261-1264, Oct 2006.
- [5] S. Grassel et al., "Recent advances in the treatment of osteoarthritis," *F1000Res*, vol. 9, 2020.
- [6] P. G. Mitchell et al., "Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage," *J Clin Invest*, vol. 97, no. 3, pp. 761-8, Feb 1 1996.
- [7] C. De Savi et al., "Selective non zinc binding inhibitors of MMP13," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 21, no. 14, pp. 4215-9, Jul 15 2011.
- [8] J. A. Blagg et al., "Potent pyrimidinetrione-based inhibitors of MMP-13 with enhanced selectivity over MMP-14," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 15, no. 7, pp. 1807-10, Apr 1 2005.
- [9] H. Nara et al., "Discovery of Novel, Highly Potent, and Selective Quinazoline-2-carboxamide-Based Matrix Metalloproteinase (MMP)-13 Inhibitors without a Zinc Binding Group Using a Structure-Based Design Approach," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 57, no. 21, pp. 8886-8902, Nov 13 2014.
- [10] A. Gimeno et al., "Understanding the variability of the S1' pocket to improve matrix metalloproteinase inhibitor selectivity profiles," *Drug Discov Today*, vol. 25, no. 1, pp. 38-57, Jan 2020.
- [11] S. Pronk et al., "GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit," *Bioinformatics*, vol. 29, no. 7, pp. 845-54, Apr 1 2013.
- [12] G. Jones et al., "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking," *J Mol Biol*, vol. 267, no. 3, pp. 727-48, Apr 4 1997.
- [13] Molecular Operating Environment (MOE), 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2020.
- [14] C. A. Lipinski et al., "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 4-17, Dec 2012.
- [15] D. F. Veber et al., "Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates," *J Med Chem*, vol. 45, no. 12, pp. 2615-23, Jun 6 2002.
- [16] D. Kozakov et al., "The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins," *Nat Protoc*, vol. 10, no. 5, pp. 733-55, May 2015.
- [17] Y. Q. Feng et al., "Solution structure and backbone dynamics of the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2 complexed with a hydroxamic acid inhibitor," (in English), *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, vol. 1598, no. 1-2, pp. 10-23, Jul 29 2002.
- [18] G. Pochetti et al., "Extra Binding Region Induced by Non-Zinc Chelating Inhibitors into the S-1' Subsite of Matrix Metalloproteinase 8 (MMP-8)," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 52, no. 4, pp. 1040-1049, Feb 26 2009. ❖

Phản biện: TS NGÔ SƠN TÙNG

Hóa học & Ứng dụng

Số 1B (60B)/5-2022

