

Молекулярный поиск перспективных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁

Е. А. Бесхмельницына¹, Д. В. Кравченко², М. В. Покровский¹, М. В. Корокин¹,
А. А. Пересыпкина¹, Е. И. Варавин¹, Д. А. Костина¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Российская Федерация, 308015, Белгород, ул. Победы, д. 85

² Закрытое акционерное общество
«Исследовательский институт химического разнообразия»,
Российская Федерация, 141400, Химки, ул. Рабочая, д. 2а, корп. 1

Статья поступила 03.07.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Проведен анализ ряда молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ с помощью методов молекулярного моделирования в высокопроизводительном скрининге. Определены их механизмы действия и специфическая активность на клетках с суперэкспрессией ионного канала TRPA₁. Подтверждена антагонистическая активность изученных субстанций в отношении ионного канала TRPA₁ в результате молекулярного скрининга биологически активных молекул в сравнении с контрольным антагонистом. Установлено, что наибольшая активность проявлена веществом под шифром ZC02-0012, которое является основным кандидатом и может быть рекомендовано для проведения дальнейших исследований безопасности и селективности в тестах *in vitro* с последующим рядом экспериментов *in vivo* для определения его активности и безопасности применительно к живым системам.

Ключевые слова: ионный канал TRPA₁; боль; ноцицепция; воспаление; высокопроизводительный молекулярный скрининг; молекулы-кандидаты в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁.

Библиографическое описание: Бесхмельницына ЕА, Кравченко ДВ, Покровский МВ, Корокин МВ, Пересыпкина АА, Варавин ЕИ, Костина ДА. Молекулярный поиск перспективных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 186–189.

Учитывая огромное количество пациентов, страдающих от хронического болевого синдрома, одной из ведущих задач современной фармакологии являются поиск и создание новых анальгетических препаратов, не обладающих побочными эффектами нестероидных противовоспалительных средств и наркотических анальгетиков, но при этом имеющих достаточную эффективность. Проводимые на современном этапе исследования физиологии и патофизиологии боли с применением новейших достижений в области науки и техники привели к открытию новых рецепторов, участвующих в передаче болевых раздражений, что открыло перспективу на создание качественно новой группы анальгетических лекарственных препаратов, способных обеспечить достаточно эффективную и безопасную фармакотерапию болевого синдрома [1]. Одним из таких рецепторов является анкириновый рецептор TRPA₁, экспрессия которого наиболее выражена в ноцицепторах малого диаметра [2–5]. Проводимое на сегодняшний день огромное количество исследований подтвердило его роль в восприятии боли, что повысило к нему интерес исследователей как к потенциальной биологической мишени [6–8]. Некоторые авторы отмечали даже увеличение экспрессии TRPA₁ в условиях хронической боли и воспаления [9–12]. Сегодня ряд западных фармацевтических компаний работает над выводом на рынок новых лекарственных препаратов на основе селективных антагонистов ионного канала

TRPA₁, которые находятся на разных фазах клинических испытаний [13, 14].

Цель работы — подтверждение активности перспективных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁, полученных в результате высокопроизводительного скрининга сфокусированной библиотеки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изначально из полуторамиллионной библиотеки малых органических молекул, имевшейся в распоряжении ЗАО «Исследовательский институт химического разнообразия», методом высокопроизводительного молекулярного скрининга были отобраны наиболее перспективные кандидаты в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁. Затем на клетках с суперэкспрессией ионного канала TRPA₁ были подтверждены их механизм действия и специфическая активность.

Для эксперимента использовали клеточную суспензию в культуральной среде с 1-ммолярным раствором изопропилтиогалактопиранозидом (ИПТГ) в концентрации $8 \cdot 10^5$ клеток/мл, которую при помощи автоматических роботизированных станций Biomek FX или Biomek NX раскапывали в 384-луночные экспериментальные культуральные плашки с оптическим дном, по 25 мкл в каждую лунку. После этого экспериментальные плашки центрифугировали при

1500 об/мин в течение 5 мин и инкубировали при 37 °C в присутствии 5 % CO₂.

В день эксперимента к полученной клеточной суспензии добавляли Ca²⁺-чувствительную краску. Для этого содержимое одной ампулы тест-системы ФЛИПР® Кальций 4 («Molecular Devices», USA) растворяли в 20 мл буфера Хенкс/20mM ХЕПЕС и использовали в качестве 25-кратного стока. 25 мл рабочего раствора Ca²⁺-чувствительной краски добавляли в каждую лунку 384-луночной экспериментальной плашки, после чего плашку инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре в темном месте.

Серийные разведения исследуемых веществ готовили путем растворения в диметилсульфоксиде (ДСМО) с помощью Biomek 2000. Финальная максимальная тестируемая концентрация веществ составила 30 мкмоль.

С целью стимуляции ионного канала TRPA₁ использовали его агонист, аллилизотиоцианат, в концентрации ЕС₈₀, что составило 30 мкмоль. В качестве контроля использовали известный антагонист ионного канала TRPA₁ рутениевый красный в максимальной ингибирующей концентрации (IC₁₀₀), равной 6 мкмоль.

Для определения антагонистической активности тестируемых молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ в каждую лунку 384-луночной плашки в соответствии с ее схемой добавляли по 12,5 мкл тестируемых веществ и приступали к считыванию на ФЛИПР. После инкубации в течение 667 секунд в каждую лунку экспериментальной плашки раскатывали по 12,5 мкл аллилизотиоцианата и сразу проводили повторное считывание на ФЛИПР с целью определения активности потенциальных антагонистов ионного канала TRPA₁.

Для веществ был выполнен анализ зависимости антагонистической активности от концентрации, на основании которого была определена величина концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀). Для анализа полученных данных использовали программу GraphPad Prizm («GraphPad Software, Inc.», San Diego, CA, USA). Концентрационная зависимость рассчитывалась по следующей формуле:

$$Y = \text{Нижнее плато кривой} + \frac{\text{Верхнее плато кривой} - \text{Нижнее плато кривой}}{1 + 10^{\lg(\text{IC}_{50} - X) \cdot \text{Наклон кривой}}}. \quad (1)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного молекулярного скрининга биологически активных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ было установлено, что все исследованные кандидаты подтвердили свою активность. Механизм действия всех молекул заключается в антагонизме ионного канала TRPA₁. Активность веществ в сравнении со стандартом (рутениевый красный) приведена в таблице 1 и на рисунке 1.

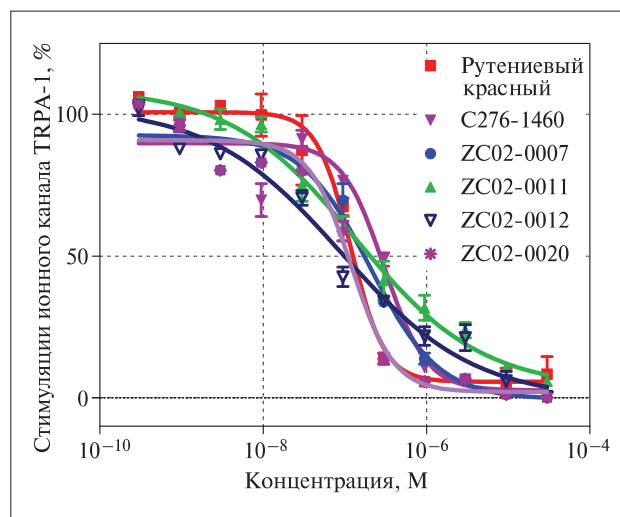


Рис. 1. Концентрационная зависимость антагонистической активности от концентрации исследуемых веществ (каждая концентрационная точка представляет собой усредненное значение для двух повторов)

Таблица 1

КОНЦЕНТРАЦИЯ ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ МОЛЕКУЛ-КАНДИДАТОВ В СЕЛЕКТИВНЫЕ АНТАГОНИСТЫ ИОННОГО КАНАЛА TRPA₁

Вещество	IC ₅₀ , нмоль
Рутениевый красный	118,2
C276-1460	303,3
ZC02-0007	204,0
ZC02-0011	135,2
ZC02-0012	91,3
ZC02-0020	120,2

Представленные данные свидетельствуют о высокой специфической активности, которую ряд исследованных биологически активных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ демонстрирует *in vitro*. Наибольшую активность проявило соединение под шифром ZC02-0012, его IC₅₀ составила 91,3 нмоль.

ВЫВОДЫ

Результаты молекулярного скрининга биологически активных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ в сравнении с контрольным антагонистом (рутениевый красный) подтвердили антагонистическую активность изученных субстанций в отношении ионного канала TRPA₁, при этом наибольшую активность проявило вещество под шифром ZC02-0012, его IC₅₀ составила 91,3 нмоль. Таким образом, вещество под шифром ZC02-0012 является основным кандидатом и может быть рекомендовано для проведения дальнейших исследований безопасности (влияние на hERG K⁺ ионный канал и цитохромы) и селективности в тестах *in*

vitro с последующим рядом экспериментов *in vivo* для определения его активности и безопасности применительно к живым системам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тактика и неотложная терапия болевого синдрома. Научно-информационный материал. М.: Ассоциация московских ВУЗов; 2010.
2. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogenestadt ED, et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004; 427(6971): 260–5.
3. Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(33): 13519–24.
4. Shelukhina I, Mikhailov N, Abushik P, Nurulin L, Nikolsky EE, Giniatullin R. Cholinergic Nociceptive Mechanisms in Rat Meninges and Trigeminal Ganglia: Potential Implications for Migraine Pain. *Front Neurol*. 2017; (8): 163.
5. Bohonyi N, Pohoczky K, Szalontai B, Perkecz A, Kovacs K, Kajtar B, et al. Local upregulation of transient receptor potential ankyrin 1 and transient receptor potential vanilloid 1 ion channels in rectosigmoid deep infiltrating endometriosis. *Mol Pain* 2017; (13): 1744806917705564.
6. Asai Y, Holt JR, Geleoc GS. A quantitative analysis of the spatiotemporal pattern of transient receptor potential gene expression in the developing mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2010; 11(1): 27–37.
7. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(25): 8784–9.
8. Бесхмельницина ЕА, Покровский МВ, Корокин МВ, Якушев ВИ, Гудырев ОС. Биологическая роль ионного канала TRPA₁ при различных патологических состояниях. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация* 2012; 20(22–3): 30–5.
9. Nie Y, Huang C, Zhong C, Wortley MA, Luo Y, Luo W, et al. Cigarette smoke extract (CSE) induces transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) expression via activation of HIF1 α in A549 cells. *Free Radic Biol Med*. 2016; (99): 498–507.
10. Nakao S, Mabuchi M, Wang S, Koqure Y, Shimizu T, Noguchi K, et al. Synthesis of resveratrol derivatives as new analgesic drugs through desensitization of the TRPA1 receptor. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017; 27(14): 3167–72.
11. Pryde DC, Marron BE, West CW, Reister S, Amato G, Yoger K, et al. Discovery of a Series of Indazole TRPA1 Antagonists. *ACS Med Chem Lett*. 2017; 8(6): 666–71.
12. Kravchenko DV, Beskhmel'nitsyna EA, Korokin MV, Avtina TV, Serenov LN, Tishin AN, Kostina DA. Molecular screening of prospective candidates for TRPA1 ion channel selective antagonists. *Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology* 2016; 2(1): 63–6.
13. Skerratt S. Recent Progress in the Discovery and Development of TRPA1 Modulators. *Prog Med Chem*. 2017; (56): 81–115.
14. Mukhopadhyay I, Kulkarni A, Aranake S, Karnik P, Shetty M, Thorat S, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 receptor activation *in vitro* and *in vivo* by pro-tussive agents: GRC 17536 as a promising anti-tussive therapeutic. *PLoS One* 2014; 9(5): e97005.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». Российская Федерация, 308015, Белгород, ул. Победы, д. 85.

Бесхмельницина Евгения Александровна. Ассистент кафедры фармакологии.

Покровский Михаил Владимирович. Заведующий кафедрой фармакологии Медицинского института, д-р мед. наук, проф.

Корокин Михаил Викторович. Профессор кафедры фармакологии, д-р мед. наук, проф.

Пересыпкина Анна Александровна. Ассистент кафедры фармакологии, канд. фарм. наук.

Варавин Евгений Игоревич. Научный сотрудник Центра доклинических и клинических исследований.

Костина Дарья Александровна. Аспирант кафедры фармакологии.

Закрытое акционерное общество «Исследовательский институт химического разнообразия».

Российская Федерация, 141400, Химки, ул. Рабочая, д. 2а, корп. 1.

Кравченко Дмитрий Владимирович. Генеральный директор, д-р хим. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Бесхмельницина Евгения Александровна; evgeny_b89@mail.ru

MOLECULAR SCREENING FOR POTENTIAL SELECTIVE ANTAGONISTS OF TRPA₁ ION CHANNEL

E. A. Beskhmel'nitsyna¹, D. V. Kravchenko², M. V. Pokrovsky¹, M. V. Korokin¹,
A. A. Peresypkina¹, E. I. Varavin¹, D. A. Kostina¹

¹ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education
«Belgorod National Research University»
Pobedy street 85, Belgorod 308015, Russian Federation

² Private limited company «Chemical Diversity Research Institute»
Rabochaya street 2a, bld. 1, Khimki 141400, Russian Federation

Abstract: The article discusses the results of analysis a number of candidate molecules for TRPA₁ ion channel selective antagonists using molecular modeling methods of high throughput screening. The study determined their mechanisms of action and specific activity in cells with overexpression of TRPA₁ ion channel. It demonstrated antagonistic activity of test substances in relation to TRPA₁ ion channel based on the results of molecular screening of biologically active molecules and their comparison with the reference antagonist. The highest activity was demonstrated by the substance with the ZC02-0012 code which was regarded as the main candidate that could be recommended for use in further safety and selectivity studies using *in vitro* tests and subsequent *in vivo* experiments aimed at determining its activity and safety in relation to living systems.

Key words: TRPA₁ ion channel; pain; nociception; inflammation; high throughput screening; candidate molecules for selective antagonists of TRPA₁ ion channel.

For citation: Beskhnelnitsyna EA, Kravchenko DV, Pokrovsky MV, Korokin MV, Peresypkina AA, Varavin EI, Kostina DA. Molecular screening for potential selective antagonists of TRPA₁ ion channel. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2016; 7(3): 186–189.

REFERENCES

1. Tactics and emergency treatment of pain. Research and information material. Moscow: Association of Moscow universities; 2010 (in Russian).
2. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogenstatt ED, et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004; 427(6971): 260–5.
3. Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(33): 13519–24.
4. Shelukhina I, Mikhailov N, Abushik P, Nurulin L, Nikolsky EE, Giniatullin R. Cholinergic Nociceptive Mechanisms in Rat Meninges and Trigeminal Ganglia: Potential Implications for Migraine Pain. *Front Neurol* 2017; (8): 163.
5. Bohonyi N, Pohoczky K, Szalontai B, Perkecz A, Kovacs K, Kajtar B, et al. Local upregulation of transient receptor potential ankyrin 1 and transient receptor potential vanilloid 1 ion channels in rectosigmoid deep infiltrating endometriosis. *Mol Pain* 2017; (13): 1744806917705564.
6. Asai Y, Holt JR, Geleoc GS. A quantitative analysis of the spatiotemporal pattern of transient receptor potential gene expression in the developing mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 2010; 11(1): 27–37.
7. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(25): 8784–9.
8. Beskhnelnitsyna EA, Pokrovsky MV, Korokin MV, Yakushev VI, Gudyrev OS. The biological role of ion channel TRPA₁ in various pathological conditions. *Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine. Pharmacy* 2012; 20(22–3): 30–5 (in Russian).
9. Nie Y, Huang C, Zhong C, Wortley MA, Luo Y, Luo W, et al. Cigarette smoke extract (CSE) induces transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) expression via activation of HIF1 α in A549 cells. *Free Radic Biol Med* 2016; (99): 498–507.
10. Nakao S, Mabuchi M, Wang S, Koqure Y, Shimizu T, Noguchi K, et al. Synthesis of resveratrol derivatives as new analgesic drugs through desensitization of the TRPA1 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2017; 27(14): 3167–72.
11. Pryde DC, Marron BE, West CW, Reister S, Amato G, Yoger K, et al. Discovery of a Series of Indazole TRPA1 Antagonists. *ACS Med Chem Lett* 2017; 8(6): 666–71.
12. Kravchenko DV, Beskhnelnitsyna EA, Korokin MV, Avtina TV, Serenov LN, Tishin AN, Kostina DA. Molecular screening of prospective candidates for TRPA1 ion channel selective antagonists. *Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology* 2016; 2(1): 63–6.
13. Skerratt S. Recent Progress in the Discovery and Development of TRPA1 Modulators. *Prog Med Chem* 2017; (56): 81–115.
14. Mukhopadhyay I, Kulkarni A, Aranake S, Karnik P, Shetty M, Thorat S, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 receptor activation in vitro and in vivo by pro-tussive agents: GRC 17536 as a promising anti-tussive therapeutic. *PLoS One* 2014; 9(5): e97005.

AUTHORS

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod National Research University», Pobedy street 85, Belgorod 308015, Russian Federation.

Beskhnelnitsyna EA. Assistant professor of the Department of Pharmacology.

Pokrovsky MV. Head of the Department of Pharmacology of the Medical Institute. Doctor of Medical Sciences, professor.

Korokin MV. Professor of the Department of Pharmacology. Doctor of Medical Sciences, professor.

Peresypkina AA. Assistant professor of the Department of Pharmacology. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Varavin EI. Research associate of the Centre of Preclinical and Clinical Research.

Kostina DA. Postgraduate student of the Department of Pharmacology.

Private limited company «Chemical Diversity Research Institute», Rabochaya street 2a, bld. 1, Khimki 141400, Russian Federation.

Kravchenko DV. Director General. Doctor of Chemical Sciences.

CONTACT E-MAIL

Beskhnelnitsyna Evgeniya Aleksandrovna; evgeny_b89@mail.ru