

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2023.03.096>

УДК 577.152.11:615.547

В.Б. Ларіонов¹, <https://orcid.org/0000-0003-2678-4264>

М.Я. Головенко¹, <https://orcid.org/0000-0003-1485-128X>

В.Є. Кузьмін¹, <https://orcid.org/0000-0002-2753-0453>

І.П. Валіводзь¹, <https://orcid.org/0000-0001-7465-7089>

О.О. Нефьодов², <https://orcid.org/0000-0002-5796-1852>

¹Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса

²Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Одеса

E-mail: vitaliy.larionov@gmail.com, n.golovenko@gmail.com

Взаємодія пропоксазепаму з ізоформами цитохрому P450 за результатами молекулярного докінг-аналізу

Представлено членом-кореспондентом НАН України В.Є. Кузьмінім

Методи комп'ютерного моделювання дають можливість оптимізувати процес попередньої оцінки потенціалу взаємодії майбутніх лікарських засобів. Авторами використано моделювання *in silico* для прогнозування та пояснення можливої взаємодії пропоксазепаму з ізоферментами CYP на молекулярному рівні. Для розрахунку вільної енергії взаємодії та визначення амінокислотних залишків процедурою молекулярного докінгу було застосовано програму iGEMDOCK v2.1, досліджувані ензими — комплекси ізоформ CYP із референтними лігандами (1A2 (2hi4), 2B6 (5uda), 2C8 (2npj), 2C9 (1og5), 2C19 (4gqs), 2D6 (4wpi) та 3A4 (5te8), молекулами-субстратами для кожного ізоензиму вибрано відповідно фенацетин, бупропіон, амодіахін, диклофенак, S-мефенітоїн, буфуралол та мідазолам з тестостероном відповідно.

Пропоксазепам має досить високі показники вільної енергії взаємодії з усіма ізоформами CYP (8,15—9,8 ккал/моль), однак є різниця в кількості спільних амінокислотних залишків, що беруть участь у взаємодії зі специфічними субстратами. За різницею енергії зв'язків можна припустити, що найменший конкурентний (інгібувальний) ефект пропоксазепам може мати відповідно на ізоформи 3A4 (із субстратом тестостероном) та 2D6. Аналіз взаємодій пропоксазепаму з різними ізоформами CYP з урахуванням їх індивідуальних субстратів дає підставу припустити можливість конкурентної взаємодії для 1A2, 2C19 та 2C8 і, меншою мірою, для 2C9, 3A4 та 2B6. Також можна очікувати, що пропоксазепам може бути субстратом для досліджуваних ізоформ цитохрому.

Ключові слова: пропоксазепам, ізоформи CYP, докінг, амінокислотні залишки, взаємодія.

Ц и т у в а н н я: Ларіонов В.Б., Головенко М.Я., Кузьмін В.Є., Валіводзь І.П., Нефьодов О.О. Взаємодія пропоксазепаму з ізоформами цитохрому P450 за результатами молекулярного докінг-аналізу. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2023. № 3. С. 96—104. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2023.03.096>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2023. Стаття опублікована за умовами відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Успішно проведено першу фазу клінічних випробувань інноваційного анальгетичного засобу пропоксазепам, який розроблено сумісно Фізико-хімічним інститутом ім. О.В. Богатського НАН України та ТДВ «ІнтерХім». Основною мішенню для знеболання сполуки є $\alpha 2$ і $\alpha 3$ субодиниці рецепторів ГАМК [1] та інші біологічні мішені, які відповідають за перебіг болювого синдрому: гліцинові рецептори, потенціалзалежні калієві канали, дофамінергічна система, NMDA-рецептори, альфа-1 адренорецептори [2, 3]. Сполука має фармакодинамічний профіль, відмінний від усіх анальгетиків, оскільки одночасно гальмує і гострий, і хронічний біль з компонентами протизапальної та протисудомної дії [3]. За технологічними й терапевтичними показниками пропоксазепам є інноваційним засобом [4, 5].

Новий препарат повинен не лише виявляти відповідну фармакологічну дію і бути достатньо безпечним, але й мінімізувати ризик взаємодії з іншими лікарськими засобами (ВЛЗ), яка може серйозно вплинути на ефективність препаратів, що одночасно вводяться. Причина більшості ВЛЗ пов'язана з ферментами цитохрому P450 (CYP), які відіграють важливу роль у метаболізмі значної кількості ксенобіотиків, у тому числі й лікарських засобів [6]. На сьогодні у людей ідентифіковано 57 генів CYP, однак переважна більшість відомих препаратів метаболізуються лише декількома ізоформами CYP: 1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 та 3A4 [7]. Основними причинами ВЛЗ, спричиненими лікарськими засобами, які метаболізуються CYP, є інгібування (70 %) або індукція CYP (23 %), що може призвести до небажаних побічних ефектів, пов'язаних з підвищенням або зниженням їх концентрації в плазмі, а отже, і послаблення ефективності лікування. Тому більшість фармацевтичних компаній проводять скринінгові тести для нових препаратів, щоб уникнути або послабити можливі ВЛЗ. Для цього застосовують методи *in vitro* з використанням мікросом або гепатоцитів печінки людини. Проте вони є громіздкими і мають обмежене застосування у вивченні співвідношення структура—активність (інгібування або індукції CYP). Навпаки, підходи *in silico* є привабливими з огляду на їх низьку вартість і можливість оцінювати за їх допомогою значну кількість сполук та використовувати на ранніх етапах розроблення препарату.

Оцінка потенціалу нового анальгетичного засобу пропоксазепаму щодо пригнічення або активації CYP залишається важливою частиною програми його відкриття та розроблення [8]. Ця робота є першим звітом про використання моделювання *in silico* для прогнозування та пояснення можливої взаємодії пропоксазепаму з ізоензимами CYP на молекулярному рівні, що й становило мету дослідження.

Матеріали та методи. Для процедури молекулярного докінгу використано програму iGEMDOCK v2.1 [9, 10]. Молекулярні структури CYP отримано з бази даних біологічних макромолекул [<http://www.rcsb.org/>]. Дослідження проведено з ізоформами CYP, які містили відповідні референтні ліганди, необхідні для утворення сталих комплексів і подальшої ідентифікації активного центру ензиму, а саме: 1A2 (код 2hi4, у комплексі з α -нафтолом, тобто 2hi4 + α -нафтол), 2B6 (5uda + борнан), 2C8 (2nnj + фелодипін), 2C9 (1og5 + S-варфарин), 2C19 (4gqs + 4-гідрокси-3,5-диметилфеніл)(2-метил-1-бензофуран-3-іл)метанон, 0XV), 2D6 (4wnu + хінідин) та 3A4 (5te8 + мідазолам).

Ферментативну активність ізоформ CYP визначали за допомогою селективного субстрату («маркера»), тобто препарату (або речовини), який ідеально метаболізується єдиним ферментом CYP [11]. Такий маркер зареєстровано як терапевтичний препарат, який оцінюється в біологічних рідинах разом з його основним(и) метаболітом(ами). Нами було вибрано субстрат як зонд для кожного CYP, що рекомендовано Керівництвом для промис-

ловості [12]. Специфічними субстратами зазначених ізоформ СУР були: 1А2 (фенацетин), 2В6 (бупропіон), 2С8 (амодіахін), 2С9 (диклофенак), 2С19 (S-мефенітоїн), 2D6 (буфуралол) та 3А4 (мідазолам і тестостерон).

Молекулу пропоксазепаму було оптимізовано за величиною внутрішньої енергії у програмі Avogadro (v 1.2.0) відповідно до алгоритму молекулярних силових полів Merck (MMFF94, 10000 ітерацій) і збережено у форматі *.pdb.

Параметри докінгу (вільна енергія зв'язку, внесок окремих типів взаємодій) визначали на підставі даних силового поля з використанням 80 генерацій (generations) гнучких конформацій ліганду (аналіз 300 станів у кожній генерації, population size). Детекцію центру зв'язування визначали за параметрами локалізації референтного ліганду; радіус центру зв'язування 10 Å.

Результати. Методом молекулярного докінгу розраховано вільну енергію зв'язку пропоксазепаму та відповідних субстратів із зазначеними ізофомами СУР (табл. 1). Відносна різниця вільної енергії ($(E_{\text{prop}} - E_{\text{substr}})/E_{\text{prop}} \cdot 100\%$) є показником характеристики енергій зв'язку пропоксазепаму і субстрату з ензимом та їх можливої конкуренції. Аналогічний показник ($((E_{\text{lig}} - E_{\text{substr}})/E_{\text{substr}} \cdot 100\%)$) розраховано для кожного окремого ліганду, що дало можливість оцінити ступінь взаємодії субстрату з ензимом порівняно з відомим лігандом. Від'ємні значення показника свідчать про те, що енергія взаємодії досліджуваної сполуки є більшою за енергію взаємодії зіставної сполуки (пропоксазепам, або ліганд).

Аналізом результатів докінгу було визначено спільні амінокислотні залишки кожної з ізоформ СУР, що беруть значну (з тих, що сумарно зумовлюють більш ніж 50 % загальної

Таблиця 1. Розрахована енергія зв'язку (ккал/моль) сполук з ізоформами СУР (ліганд — сполука в активному центрі ензиму, субстрат — сполука в дослідженнях *in vitro*, ΔE — різниця енергій взаємодії)

Ізоформа СУР	Субстрат / ліганд	Пропоксазепам, E_{prop} , ккал/моль	Субстрат, E_{substr} , ккал/моль	Відносна різниця вільної енергії, $\Delta E/E_{\text{prop}} \cdot 100\%$	Ліганд, E_{lig} , ккал/моль	Відносна різниця вільної енергії, $\Delta E/E_{\text{substr}} \cdot 100\%$
1А2	Фенацетин α -нафтол	9,82	7,31	25,56	10,81	32,38
2В6	Бупропіон борнан	8,89	6,19	30,37	4,39	-41,00
2С8	Амодіахін фелодипін	9,37	8,73	6,83	7,99	-9,26
2С9	Диклофенак S-варфарин	8,79	7,62	13,31	8,74	12,81
2С19	S-мефенітоїн OXV ¹	8,7	7	19,54	8,57	18,32
2D6	Буфуралол хінідин	8,15	9,38	-15,09	10,24	8,40
3А4	Тестостерон ²	8,93	8,94	-0,11	8,32	-7,45
	Мідазолам ²		8,32	6,83	8,94	6,94

¹ 4-Гідрокси-3,5-диметилфеніл(2-метил-1-бензофуран-3-іл)метанон. ² Збігається з лігандом.

енергії взаємодії) участь в утворенні зв'язків як з пропоксазепамом, так і з певним субстратом чи лігандом (табл. 2). Доведено, що лише ізоформи 2C8 та 2C19 мають три або два таких спільних амінокислотних залишки, здатних до певної стеричної взаємодії з субстратами, лігандами та пропоксазепамом. Натомість, у інших ізоформ CYP є значно більша кількість амінокислотних залишків, що беруть участь у зазначеному процесі.

З урахуванням встановлених спільних амінокислотних залишків, що беруть участь у формуванні зв'язків з ізоформами CYP, було розраховано сумарну енергію зв'язків, що визначаються цими амінокислотами, а також їх внесок у загальну енергію зв'язку з кожною зі сполук (табл. 3). Встановлено різний внесок спільних амінокислотних залишків у загальну енергію зв'язку кожної зі сполук. Так, для пропоксазепаму цей показник менший за 10 % у випадку 1A2 та 2C19 (див. табл. 3), тоді як у разі взаємодії з 2B6, 2C9, 2D6 та 3A4 (мідазолам/тестостерон відповідно) він перевищує 50 %. Маркерні субстрати мають загальний відсоток внеску більший за 50 %, лише для ізоформ 2C9, 2D6 та 3A4 (субстрат — мідазолам), а для референтних лігандів спостерігається значна різниця загальної величини внеску в енергію взаємодії з ензимом.

Таблиця 2. Спільні амінокислотні залишки, що беруть участь у взаємодії індивідуальних ізоформ цитохрому CYP з пропоксазепамом, субстратом та лігандом

CYP	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	3A4
Амінокислотні залишки	THR-124	ARG-98	ALA-297	PHE-100	ILE-362	GLN-244	ARG-105
	ASP-313	VAL-113	THR-301	LEU-102	HEM-501	PHE-120	ASP-214
	ALA-317	ILE-114	LEU-361	ALA-103		ALA-209	PHE-215
	ASP-320	ALA-298		PHE-114		GLY-212	LEU-216
	LEU-497	VAL-367		ASN-217		LEU-213	ASP-217
		ARG-434		LEU-366		GLU-216	PRO-218
		CYS-436		PRO-367		GLN-244	ALA-370
		LEU-437		PHE-476		PHE-247	GLU-374
						SER-304	GLY-481
						PHE-483	LEU-482

Таблиця 3. Внесок енергії зв'язку у взаємодію сполук із спільними амінокислотними залишками ізоформ CYP

CYP	Пропоксазепам	Субстрат	Ліганд
1A2	7,8	27,9	23,9
2B6	54,8	44,3	10,9
2C8	20,9	1,8	3,0
2C9	59,0	59,2	48,7
C19	5,7	20,1	3,0
2D6	57,8	63,9	54,6
3A4 (мідазолам)	58,2	62,2	40,4
3A4 (тестостерон)	58,2	40,4	62,2

Обговорення результатів. Ферментативна активність ізоформ СУР має вирішальне значення в ефективності та безпечності лікарського засобу, залежного від його метаболізму. Більшість ліків піддається дезактивації СУР, але деякі речовини біоактивуються СУР з утворенням фармакологічно активних сполук. Також низка препаратів можуть підвищувати або знижувати активність різних СУР завдяки здатності зв'язуватися з ними. Тому важливим є визначення взаємодії новаторського препарату з найбільш клінічно значущими ізоферментами СУР. Відомо [13], що зі 110 лікарських засобів, які широко використовуються в медичній практиці, більш ніж 60 % метаболізуються одним або декількома СУР: 3А4 (44 %), 2D6 (41 %), 2С19 (26 %), 1А2 (9 %) та 2С9 (4 %). Тому зазначені ізоформи СУР було використано нами у дослідженні.

Вільна енергія зв'язку є мірою здатності взаємодії сполуки та ензиму і вона відбиває її специфіку, оскільки у разі збільшення цього показника зростає вірогідність контакту двох молекул із подальшою відповідною реакцією. Методом молекулярного докінгу встановлено, що пропоксазепам має досить високі показники вільної енергії взаємодії з усіма ізоформами СУР (див. табл. 1). Також досить високі показники вільної енергії взаємодії мають більшість лігандів (крім борнану, ліганду ізоформи СУР2В6), як наслідок утворення найбільш сталої взаємної конформації молекули ліганду та ферменту. Однак щодо субстратів, то їх енергія взаємодії переважно є меншою за аналогічні показники зв'язування референтних лігандів (див. табл. 1), втім, це пояснюється тим, що ці субстрати також піддаються трансформації в активному центрі, тому повинна зберігатися певна рухомість комплексу, яка досягається внаслідок зменшення енергії зв'язку. Для кількісної оцінки цієї рухомості було використано показник відносної різниці між енергіями взаємодії референтного ліганду та субстрату. Показово, що для п'яти досліджуваних ізоформ це значення є позитивним, тобто зв'язок референтних лігандів міцніший, ніж відповідних молекул субстратів. Для ізоформ 2В6 та 2С8 отримані значення від'ємні, що вказує на меншу (для 2В6 істотно) енергію зв'язку ліганду, ніж відповідного субстрату. Поясненням високої енергії зв'язку з лігандами є те, що комплекси ензимів з лігандами використовують для отримання статичної кристалічної структури протейнової молекули, тоді як взаємодія субстрату з активним центром є процесом динамічним, коли перебіг реакції потребує певної рухомості молекули субстрату. Також зазначене обумовлює необхідність використання у порівняльному аналізі результатів докінг-аналізу саме показників зв'язування субстратів, а не референтних лігандів, хоча останні дають величини енергії зв'язування, що максимально відповідають використаній структурі ензиму. На підставі цього подальший аналіз взаємодії пропоксазепаму з ізоформами СУР було проведено з урахуванням енергії зв'язування саме відповідних субстратів.

Відносна різниця енергій зв'язування пропоксазепаму та субстратів лише для двох ізоформ СУР (2D6 та 3A4) має від'ємні значення (див. табл. 1), при цьому для ізоформи 3A4 це виявляється лише в разі використання як субстрату тестостерону (реакція β-гідроксилування) [14]. Втім, слід відзначити, що у випадку 3A4/тестостерон це значення наближається майже до 0, що свідчить про порівняно близькі величини енергій взаємодії сполук з ензимом. За спаданням величини відносної різниці енергій взаємодій з пропоксазепамом ізоформи СУР можуть бути розташовані таким чином: 2В6 > 1А2 > 2С19 > 2С9 > 2С8 ≈ 3А4 (мідазолам) > 3А4 (тестостерон) > 2D6. Виходячи з припущення, що ефективність конкурентної взаємодії з ензимом обумовлена різницею між енергіями утворення

зв'язків, можна припустити, що пропоксазепам має найменшу конкурентну (гальмівну) дію на CYP3A4 (із субстратом тестостероном) та CYP2D6. Натомість, ізоформи, для яких відносна різниця енергії взаємодії між пропоксазепамом та субстратом є позитивною, очікувано можуть зазнавати інгібіторного впливу пропоксазепаму.

Хоча величина енергії взаємодії є інтегральною характеристикою можливості утворення комплексу з ензимом та потенційного інгібування його активності, більш важливими є стеричні можливості взаємодії, зокрема залученість до утворення зв'язків однакових амінокислотних залишків і той внесок у загальну енергію взаємодії, який вони зумовлюють. Тому для кожної з ізоформ CYP було визначено ті амінокислотні залишки, що, за результатами молекулярного докінгу, найбільш задіяні в утворенні зв'язків з референтним лігандом, відповідним субстратом та пропоксазепамом (див. табл. 2), а також розраховано відносний внесок взаємодії з цими залишками у загальну енергію зв'язування (див. табл. 3).

Встановлено, що ізоформи CYP відрізняються за кількістю спільних амінокислотних залишків, що впливають на конформаційний стан ензиму і взаємодіють з досліджуваними сполуками. Так, найменша кількість спільних амінокислотних залишків притаманна ізоформам 2C8 та 2C19, при цьому в останньому спільним для субстрату, ліганду та пропоксазепаму є навіть залишок гему (див. табл. 2). Ізоформи 1A2, 2B6 та 2C9 мають по п'ять спільних амінокислотних залишків, тоді як 2D6 та 3A4 — по 10 залишків, що беруть участь в утворенні зв'язків. Зазначене свідчить про певну специфічність деяких ізоформ до потенційних субстратів, тобто чим більша кількість спільних амінокислотних залишків, тим меншою є вимоги до просторової відповідності певної молекули активному центру ензиму. З цієї позиції можна вважати, що ізоформи 2D6 та 3A4 є найменш специфічними (з урахуванням референтного ліганду) до визначення конкурентних властивостей пропоксазепаму у відношенні до індивідуального субстрату, тоді як ізоформи 2C8 та 2C19 — найбільш специфічними (оскільки додаткова взаємодія молекул здійснюється за рахунок амінокислотних залишків, за які немає конкуренції між пропоксазепамом та субстратом). Тож за конкурентною специфічністю ізоформи можуть бути розташовані таким чином за зменшенням специфічності активного центру ензиму до потенційного субстрату: $2C19 > 2C8 > 1A2 > 2B6 = 2C9 > 2D6 = 3A4$. Відповідно, слід очікувати, що 2C19 найбільш, а 3A4 найменш вразливі щодо гальмівної дії пропоксазепаму.

Залежно від своєї хімічної будови амінокислотні залишки здатні утворювати зв'язки, що різняться за своєю енергією. Тому слід очікувати різної сумарної енергії зв'язку для відповідних спільних амінокислотних залишків і, відповідно, різного їх внеску в загальну енергію взаємодії з досліджуваними ізоформами. Дійсно, відсотковий внесок сумарної енергії зв'язку спільних амінокислотних залишків значно відрізняється залежно від ізоформи цитохрому та досліджуваної сполуки. Так, для пропоксазепаму для ізоформ 2B6, 2C9, 2D6 та 3A4 це значення перевищує 50 % загальної енергії зв'язку (див. табл. 3). Проте порівняно з відносним внеском у загальну енергію зв'язку із субстратом істотне перевищення спостерігається лише для 2C8 і помірне для 3A4 (з субстратом тестостероном). Відсотковий внесок у загальну енергію взаємодії референтних лігандів також досить різниться, що загалом вказує на те, що спільні амінокислотні залишки, хоч і беруть участь у орієнтації та фіксації цих сполук в активному центрі, але все ж значний внесок визначають й окремі амінокислотні залишки, що є специфічними для кожної з досліджуваних сполук. Тож з урахуванням відносного внеску енергій взаємодії із спільними амінокислотними за-

лишками у загальну енергію взаємодії ймовірно є конкуренція між пропоксазепамом і відповідними субстратами у разі ізоформ 2В6, 2С8 та 3А4 (у реакції 6 β -гідроксилювання тестостерону). Крім того, слід враховувати, що у формуванні міжмолекулярних зв'язків беруть участь також інші амінокислотні залишки, що є більш унікальними для кожного з ізоферментів та відповідного субстрату.

Загалом аналіз взаємодій пропоксазепаму з різними ізоформами СYP з урахуванням їх індивідуальних субстратів дає підставу припустити можливість конкурентної взаємодії для 1А2, 2С19 та 2С8 і, меншою мірою, для 2С9, 3А4 та 2В6.

Дослідження виконано в межах фінансування дослідницького проєкту «Визначення безпечності новаторського анальгетичного засобу пропоксазепаму при його хімічній та біологічній взаємодії з іншими препаратами в умовах політерапії» у Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України за бюджетною програмою КПКВК 6541230 (постанова НАН України № 414 від 28.12.2022, № держреєстрації 0123U100824).

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Reder A., Larionov V., Golovenko M. Subunit-dependent interaction of propoxazepam and its metabolite with the γ -aminobutyric acid type A receptor. *EUREKA: Health Sci.* 2022. № 5. P. 10—18. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2022.002649>
2. Golovenko N.Ya., Larionov V.B., Reder A.S., Valivodz I.P. An effector analysis of the interaction of propoxazepam with antagonists of GABA and glycine receptors. *Neurochem. J.* 2017. **11**, № 4. P. 302—308. <https://doi.org/10.1134/S1819712417040043>
3. Волощук Н. І., Редер А. С., Головенко М. Я., Таран І. В., Пашинська О. С. Фармакологічний аналіз нейрохімічних антиноцицептивних механізмів дії пропоксазепаму. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2017. № 1. С. 3—11.
4. Застосування 7-бром-5-(*o*-хлорфеніл)-3-пропокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону для гальмування больового синдрому при діабетичній полінейропатії без нейротоксичної дії: пат. 119018 Україна. МПК C07D 243/24, A61K 31/5513, A61P 25/04; заявл. 16.02.2018. Опубл. 10.04.2019.
5. Use of 7-bromo-5-(*o*-chlorophenyl)-3-propoxy-1,2-dihydro-3*H*-1,4-benzodiazepin-2-one for inhibition of neuropathic pain and seizures of different etiology: pat. 11,304,956 B2 US. IPC A61K 31/5513, A61P 23/00, A61P 25/08, A61P 29/00, A61K 9/00; Publ. 19.04.2022.
6. Wilkinson G.R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N. Engl. J. Med.* 2005. **352**. P. 2211—2221. <https://doi.org/10.1056/NEJMra032424>
7. Sim S.C., Ingelman-Sundberg M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum. Genom.* 2010. **4**, № 4. P. 278—281. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-4-278>
8. Головенко М. Я. Пропоксазепам — новаторський анальгетичний засіб, що гальмує гострий та хронічний біль і має полімодальний механізм дії. *Вісн. НАН України.* 2021. № 4. С. 76—90. <https://doi.org/10.15407/visn2021.04.076>
9. Yang J.-M., Chen C.-C. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.* 2004. **55**. P. 288—304. <https://doi.org/10.1002/prot.20035>
10. Yang J.-M., Chen Y.-F., Shen T.-W., Kristal B. S., Hsu D. F. Consensus scoring criteria for improving enrichment in virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* 2005. **45**, № 4. P. 1134—1146. <https://doi.org/10.1021/ci050034w>
11. Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.* 2008. **82**, № 10. P. 667—715. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0332-8>
12. Guidance for industry: drug interaction studies — study design, data analysis, implications for dosing, and labeling. Recommendations. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2012.

13. Stringer R.A., Strain-Damerell C., Nicklin P., Houston J.B. Evaluation of recombinant cytochrome P450 enzymes as an in vitro system for metabolic clearance predictions. *Drug Metab. Dispos.* 2009. **37**, № 5. P. 1025—1034. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024810>
14. Niwa T., Narita K., Okamoto A., Murayama N., Yamazaki H. Comparison of steroid Hormone hydroxylations by and docking to human cytochromes P450 3A4 and 3A5. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2019. **22**, № 1. P. 332—339. <https://doi.org/10.18433/jpps30558>

Надійшло до редакції 27.02.2023

REFERENCES

1. Reder, A., Larionov, V. & Golovenko, M. (2022). Subunit-dependent interaction of propoxazepam and its metabolite with the γ -aminobutyric acid type A receptor. *EUREKA: Health Sci.*, 5, pp. 10-18. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2022.002649>
2. Golovenko, N. Ya., Larionov, V. B., Reder, A. S. & Valivodz, I. P. (2017). An effector analysis of the interaction of propoxazepam with antagonists of GABA and glycine receptors. *Neurochem. J.*, 11, No. 4, pp. 302-308. <https://doi.org/10.1134/S1819712417040043>
3. Voloshchuk, N. I., Reder, A. S., Golovenko, M. Y., Taran, I. V. & Pashinska, O. S. (2017). Pharmacological analysis of neurochemical antinociceptive mechanisms of propoxazepam action. *Pharmacology and Drug Toxicology*, No. 1, pp. 3-11 (in Ukrainian).
4. Pat. 119018 UA, IPC C07D 243/24, A61K 31/5513, A61P 25/04, The use of 7-brom-5-(*o*-chlorophenyl)-3-propoxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one for inhibition of pain syndrome on diabetichicpolyneuropathy without neurotoxic action, Reder, A. S., Andronati, S. A., Golovenko, M. Ya., Larionov, V. B. & Voloshchuk, N. I., Publ. 10.04.2019 (in Ukrainian).
5. Pat. 11,304,956 B2 US, IPC A61K 31/5513, A61P 23/00, A61P 25/08, A61P 29/00, A61K 9/00, Use of 7-bromo-5-(*o*-chlorophenyl)-3-propoxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one for inhibition of neuropathic pain and seizures of different etiology, Reder, A. S., Adronati, S. A., Golovenko, M. Ya., Pavlovski, V. I., Kabanova, T. A., Khalimova, O. I., Larionov, V. B. & Voloshchuk, N. I., Publ. 19.04.2022.
6. Wilkinson, G. R. (2005). Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N. Engl. J. Med.*, 352, pp.2211-2221. <https://doi.org/10.1056/NEJMr032424>
7. Sim, S. C. & Ingelman-Sundberg, M. (2010). The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum. Genomics*, 4, No. 4, pp. 278-281. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-4-278>
8. Golovenko, M. Ya. (2021). Propoxazepam is an innovative analgesic that inhibits acute and chronic pain and has polymodal mechanism of action. *Visn. Nac. Acad. Nauk Ukr.*, No. 4, pp. 76-90 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/visn2021.04.076>
9. Yang, J.-M. & Chen, C.-C. (2004). GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 55, pp. 288-304. <https://doi.org/10.1002/prot.20035>
10. Yang, J.-M., Chen, Y.-F., Shen, T.-W., Kristal, B. S. & Hsu, D. F. (2005). Consensus scoring criteria for improving enrichment in virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.*, 45, No. 4, pp.1134-1146. <https://doi.org/10.1021/ci050034w>
11. Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J. & Raunio, H. (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.*, 82, No. 10, pp. 667-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0332-8>
12. Guidance for industry: drug interaction studies — study design, data analysis, implications for dosing, and labeling. Recommendations. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2012.
13. Stringer, R. A., Strain-Damerell, C., Nicklin, P. & Houston, J. B. (2009). Evaluation of recombinant cytochrome P450 enzymes as an in vitro system for metabolic clearance predictions. *Drug Metab. Dispos.*, 37, No. 5, pp. 1025-1034. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024810>
14. Niwa, T., Narita, K., Okamoto, A., Murayama, N. & Yamazaki, H. (2019). Comparison of steroid hormone hydroxylations by and docking to human cytochromes P450 3A4 and 3A5. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 22, No. 1, pp.332-339. <https://doi.org/10.18433/jpps30558>

Received 27.02.2023

V.B. Larionov¹, <https://orcid.org/0000-0003-2678-4264>
M.Ya. Golovenko¹, <https://orcid.org/0000-0003-1485-128X>
V.E. Kyz'min¹, <https://orcid.org/0000-0002-2753-0453>
I.P. Valivodz¹, <https://orcid.org/0000-0001-7465-7089>
O.O. Nefedov², <https://orcid.org/0000-0002-5796-1852>

¹ A.V. Bogatsky Physical-Chemical Institute of the NAS of Ukraine, Odessa

² I.I. Mechnikov Odessa National University, Odessa

E-mail: vitaliy.larionov@gmail.com, n.golovenko@gmail.com

PROPOXAZEPAM INTERACTION WITH CYTOCHROMES P450 ISOFORMS BASED ON MOLECULAR DOCKING ANALYSIS

Computer modeling methods allow for the optimization of the preliminary evaluation of potential drug interactions. The aim of this study was to utilize in silico modeling to predict and explain the possible interactions of propoxazepam with CYP isoenzymes at the molecular level. The iGEMDOCK v2.1 program was used to calculate the free energy of interaction and determine the amino acid residues through the molecular docking procedure. The enzymes studied were complexes of CYP isoforms with reference ligands: 1A2 (2hi4), 2B6 (5uda), 2C8 (2nnj), 2C9 (1og5), 2C19 (4gqs), 2D6 (4wnu), and 3A4 (5te8). The respective substrate molecules for each isoenzyme were phenacetin, bupropion, amodiaquine, diclofenac, S-mephenytoin, bufuralol, and midazolam with testosterone.

Propoxazepam exhibited high values of free energy of interaction with all the studied CYP isoenzymes (8.15-9.8 kcal/mole), although there were differences in the quantity of common amino acid residues participating in the interaction with individual substrates. Based on the binding energy values, it can be assumed that propoxazepam has the lowest competitive (inhibitory) effect on isoform 3A4 (with testosterone as the substrate) and on 2D6. The results of the analysis of propoxazepam interaction with different CYP isoenzymes suggest the possibility of competitive interactions with 1A2, 2C19, and 2C8, and to a lesser degree, with 2C9, 3A4, and 2B6. Additionally, propoxazepam is expected to be a substrate for these CYP isoforms.

Keywords: propoxazepam, CYP isoforms, docking, amino acid residues, interaction.