



## MS HASTALIĞININ TEDAVİSİNE YÖNELİK YENİ SFİNGOSİN-1-FOSFAT RESEPTÖR MODÜLATÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

<sup>1</sup>Birsen HUYLU , <sup>2</sup>Gozde YALCIN OZKAT 

<sup>1</sup>Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Rize, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Rize,  
TÜRKİYE

<sup>1</sup>birsen\_huylu20@erdogan.edu.tr, <sup>2</sup>gozde.yalcin@erdogan.edu.tr

(Geliş/Received: 24.09.2021; Kabul/Accepted in Revised Form: 10.01.2022)

**ÖZ:** Hesaplamalı ilaç tasarımı; ilaç geliştirme prosesini hızlandırmakla birlikte maliyeti de düşürerek tıp mühendisliğinin önde gelen alanlarından birine dönüşmüştür. MS hastalığı ölümle sonuçlanmasının yanı sıra, hastalarda yaşam kalitesini düşürmesi nedeniyle de ilaç geliştirme çalışmaları için büyük bir hedef olmayı sürdürmektedir. Sfingosin-1-fosfat reseptörü 1 (S1P1) bir G protein kapılı reseptördür ve MS hastalığının semptomlarının ekspresyonuna ve ilerlemesine yol açan önemli bir mekanizmada etkindir. Bu durum S1P1'i ilaç geliştirme çalışmaları için önemli bir hedef haline getirmektedir. Literatürde S1P1 modülasyonu hakkında ön klinik ve klinik çalışmalar tespit edilmiş olmasına rağmen seçiciliği yüksek modülatörlere rastlanmamıştır. Çalışmamız kapsamında BindingDB veri tabanı vasıtasıyla ulaşılan S1P1 modülatörlerine PharmaGist Web sunucusu vasıtasıyla farmakofor modelleme çalışmasına uygulanmıştır. Bu yöntem ligandların esnek bir biçimde üst üste çakıştırılması prosesi temeline dayanmaktadır. Ardından Autodock Vina programıyla moleküler kenetleme işlemi gerçekleştirilmiş, sonuçlar literatürdeki S1P1 antagonisti ile kıyaslanmıştır. PharmaGist'den alınan en iyi farmakofor modellerine göre ZINCPharmer veri tabanı üzerinden 80 molekül elde edilmiş bu moleküllere *in silico* ADME/Toksikoloji işlemi uygulanmıştır. ADME/toksikoloji incelemesi ile elde edilen 4 molekül ZINC00390492, ZINC67740009, ZINC19847253 ve ZINC19847241'dir. Bütün moleküllerin bağlanma profili literatüre ve ML5 antagonistine benzer olarak belirlenmiştir ancak özellikle ZINC00390492 molekülünün bağlanma afinitesi (-8.6 kcal/mol) ML5 antagonistinin bağlanma afinitesinden (-8.4 kcal/mol) düşük bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışma ile ZINC00390492 molekülünün MS Hastalığının tedavisi için önder bir bileşik olabileceği hesaplamalı çalışmalar ile ortaya konulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Farmakofor Modelleme, Hesaplamalı İlaç Tasarımı, MS Hastalığı, Moleküler kenetleme, Sfingosin-1-fosfat reseptörü 1 (S1P1)

### Development of New Sphingosine-1-Phosphate Receptor Modulators for the Treatment of MS Disease

**ABSTRACT:** Computational drug design; has turned into one of the leading fields of medical engineering by speeding up the drug development process and reducing the cost. MS Disease continues to be a major target for drug development studies, as it results in death and reduces the quality of life in patients. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) is a G protein-coupled receptor and is active in an important mechanism that leads to the expression and progression of the symptoms of MS. This makes S1P1 an important target for drug development studies. Although preclinical and clinical studies on S1P1 modulation have been identified in the literature, modulators with high selectivity have not been found. Within the scope of our study, pharmacophore modeling was applied via the PharmaGist Web server to S1P1 modulators accessed through the BindingDB database. This method is based on the process of flexible

superposition of ligands. Then, molecular docking was performed with the Autodock Vina program, and the results were compared with the S1P1 antagonist in the literature. According to the best pharmacophore models of PharmaGist, 80 molecules were obtained from the ZINCPharmer database, and *in silico*, ADME/Toxicology was implemented to these molecules. The 4 molecules obtained by ADME/toxicology examination are ZINC00390492, ZINC67740009, ZINC19847253, and ZINC19847241. The binding profiles of all molecules were determined to be similar to the literature and the ML5 antagonist, but the binding affinity (-8.6 kcal/mol) of the ZINC00390492 molecule was found to be less than the binding affinity of the ML5 antagonist (-8.4 kcal/mol). As a result, with this study, it has been demonstrated by computational studies that the ZINC00390492 molecule can be a promising therapeutic agent for the treatment of MS Disease.

**Keywords:** *Pharmacophore Modeling, Computational Drug Design, MS Disease, Molecular Docking, Sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1)*

## GİRİŞ (INTRODUCTION)

Multipl Skleroz (MS), merkezi sinir sistemini etkileyen, kronik, inflamatuvar, demiyelinizan ve nörodejeneratif bir hastalıktır. MS, genetik olarak duyarlı bireylerde merkezi sinir sisteminde kendi antijenlerini hedefleyen T hücreleri tarafından başlatılan bir otoimmün hastalık olarak kabul edilmektedir (Wan, 2020). MS patolojisinin karakteristik özellikleri: demiyelinize kortikal plaklar ve kesilmiş aksonlar, apoptotik nöronlar ve atrofi ile azalmış nöronal yoğunluk, yaygın gri madde patolojisi ve nörodejenerasyondur (Friese ve diğ.,2014; Hauser ve Cree, 2020).

MS patogenezi, hastalığın birçok klinik ve patolojik özelliğini taklit eden deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) model hayvanların son yıllarda klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmasıyla elde edilen bilgiler sayesinde çoğunlukla aydınlatılmıştır. MS/EAE ile yapılan çalışmalar sayesinde, patojenik Th17 hücrelerinin, miyeloid hücrelerin ve B hücrelerinin rollerinin anlaşılmasının yanı sıra nöroinflamasyonu kontrol eden sitokin ve kemokin sinyalleşmelerinin belirlenmesi (Moser ve diğ., 2020), potansiyel ve klinik olarak onaylanmış hastalık modifiye edici ajanların geliştirilmesini sağlamıştır. Nörodejenerasyona yol açtığı ve MS’de etkin olduğu bilinen bir diğer husus ise kronik inflamasyondur. Kronik inflamasyon, reaktif oksijen türlerine ve reaktif nitrojen türlerine yol açarak mitokondriyal hasar riskini artırmaktadır (Matthews, 2019). Reaktif oksijen ve nitrojen türleri, özellikle peroksinitrit, mitokondriyal solunum zincirinin işlevini de bozarak elektron sızıntısına ve oksidatif hasarın daha da yayılmasına yol açar (Murphy, 2009). Hem ortaya çıkan enerji dengesizliği hem de demiyelinizasyon, birçok iyon kanalının aktivasyonuna, işlev bozukluğuna ve yanlış dağılımına yol açarak nörotoksisteye neden olmaktadır. Bunun yanında, MS hastalığının seyrinin henüz aydınlatılmamış birçok yönü vardır (Wan, 2020).

MS Hastalığının yönetimi, antiinflamatuvar ve antidejeneratif bileşiklerin kullanımına dayanmaktadır. Tedaviler, bağışıklık fonksiyonunun baskılanması veya modülasyonu yoluyla MS’in seyrini değiştirmektedir. Yapılan çalışmalar, T hücrelerinin deneysel otoimmün ensefalomyelitte kritik bir rol oynadığını göstermiştir; Birincil lenfoid organlarda (sfingosin-1-fosfat [S1P] reseptör modülatörleri (fingolimod, siponimod ve ozanimod) adezyonu bloke ederek (natalizumab) MSS’ne lenfosit erişimini engellemek suretiyle etki göstermektedir (Massacesi ve diğ.,1995).

Anti-CD20 aracılı B hücrelerinin yok edilmesi, MS’ de sessiz ilerlemeyi sınırlamış ve sakatlık ilerlemesini azaltmada yüksek başarı göstermiştir. Ocrelizumab, olgun B hücrelerinin yüzeyindeki CD20 molekülüne karşı bir monoklonal antikordur, 2017 yılında onaylanmıştır ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Ocrelizumab, MS hastalarında nüklere ve sessiz ilerlemeye karşı oldukça etkilidir ve yeni hücrelerin gelişimini durdurmada önemli faydalara sahip olduğu belirlenmiştir (Hauser ve diğ., 2017). Bir monoklonal antikor olan Natalizumab, lenfositlerin yüzeyinde eksprese edilen ve endotelden MSS’ne geçişte rol oynayan bir yapışma molekülü olan a4b1 integrinin bir inhibitörüdür (Rudick ve diğ., 2006). Natalizumab, MS hastalarında nüksleri azaltmada ve hastalık ilerlemesini yavaşlatmada oldukça

etkilidir (Brandstadter and Katz Sand, 2017). *In vitro* çalışmalarda, dimetil fumaratın sitokin üretimi üzerinden immün modülatör özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir, ayrıca, anti-oksidatif stres hücre mekanizmasını etkilediği keşfedilmiştir.

Sfingosin-1-fosfat reseptörü 1 (S1P1), bağışıklık sistemi modülasyonu için önemli bir tıbbi hedefdir; reseptörün agonizmi, lenfosit trafiği, endotel gelişimi ve bütünlüğünü, vasküler düzenleme, kemotaksis gibi birçok süreci modüle etmektedir (Marciniak ve diğ., 2020).), S1P1, sfingosin-1'e bağlanan ve sfingosin-1 tarafından aktive edilen 5 G protein kapılı reseptörden (GPCR) biridir. Literatürde, otoimmün hastalıklarda semptomların giderilmesi için S1P ile indüklenen S1P1 agonizmini kullanılmıştır (Lee ve diğ., 1998; Toman ve Spiegel, 2002; Brinkmann, 2007). S1P1 reseptörünün hem fizyolojik hem de farmakolojik eksojen ligandlar yoluyla aktivasyonu, lenfosit re sirkülasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır. Bu fizyolojik etki, tekrarlayan-düzelen multipl sklerozun (RRMS) klinik tedavisi için onaylanan seçici olmayan S1P agonist ön ilacı FTY720'nin (fingolimod) geliştirilmesinde kullanılmıştır (Hanson ve diğ., 2012). Fingolimod, RMS için onaylanan ilk oral tedavidir. Sekonder lenfoid organlardan lenfositlerin çıkışını önleyen, otoreaktif lenfositlerin MSS'ne sızmasını engelleyen bir S1P1 modülatörüdür (Calabresi ve diğ., 2014). Siponimod, tekrarlayan MS formları için onaylanmış seçici bir S1P modülatörüdür (Kappos ve diğ., 2018). Ozanimod, aktif sekonder progresif MS (SPMS) tedavisi için onaylanmış bir sfingozin-1-fosfat (S1P1 ve S1P5) reseptör agonistidir (Wan, 2020). EAE ile yapılan çalışmalarda ozanimodun enflamatuvar markör iNOS, IL-1 $\beta$  ve TNF'nin ekspresyonunu azalttığı ve lenfositleri modüle ederek EAE sırasında sinaptotoksik etkiyi azalttığı bulunmuştur.

Çalışmada *in siliko* farmakofor modelleme, sanal tarama ve moleküler kenetleme yöntemleri kullanılarak; S1P1 reseptörünü modüle eden, yüksek selektiviteye sahip yeni bir ilaç molekülünün tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## YÖNTEM (METHOD)

### Farmakofor Modelleme (Pharmacophore Modeling)

Çalışmada kullanılacak ligandların belirlenmesi için BindingDB (Chen ve diğ., 2001) veri tabanı kullanılmıştır. BindingDB veri tabanında sfingozin 1-fosfat reseptörü 1'i inhibe eden moleküller tespit edilmiştir. Burada 5512 tane molekül tespit edilmiş, bu moleküllerden IC50 değeri belli olmayanlar silinerek 408 molekül kalmıştır. Moleküller PharmaGist (Dror ve diğ., 2009) Web aracına yüklenerek farmakofor analizi yapılmıştır.

### Sanal Tarama (Virtual Screening)

Hipotezler ZINCPharmer (Koes ve Camacho, 2012) web aracına yüklenerek benzer ortak özelliklere sahip yeni moleküller bulunmuştur. 18.3 milyon bileşiğin 176 milyon konformeri bu web aracı vasıtasıyla taranmaktadır. Çalışmamız kapsamında hipotezlere uygun moleküller taranıp düşük Kök Ortalama Kare Hatası (RMSD) değeri, düşük moleküler ağırlık ve yüksek döndürülebilir bağ sayısı (Rbnds) gözetilerek moleküller seçilmiştir.

### *In siliko* ADME/Toksikoloji Analizi (*In silico* ADME/Toxicology Analysis)

4 hipotezin 20'şer molekülü, toplamda 80 ligand molekül için SwissADME (Daina, ve diğ., 2017) kullanılarak Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Ekskresyon (ADME) ve Toksikoloji değerlendirmesi yapılmıştır. ADME-Toksikoloji değerlendirmesinde Lipinski kurallarına uygun olacak şekilde ligandlar belirlenerek; moleküler ağırlık, logP değerleri, H-bağı akseptör ve donör sayıları, CYP2D6 inhibisyonu ve kan beyin bariyerinden geçiş özellikleri araştırılmıştır.

### Reseptör ve Ligandların Hazırlanması (Preparation of Receptor and Ligands)

RCSB PDB protein veri bankası ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) kullanılarak sfingosin 1-fosfat reseptörünün en uygun 3 boyutlu protein yapısı seçilmiştir (PDB ID: 3V2Y (Hanson ve diğ., 2012)). 3 boyutlu yapıdaki reseptör protein *Homo sapiens* ve *Escherichia Virus T4*'ten izole edilmiştir, *Spodoptera frugiperda* ekspresyon sisteminde eksprese edilmiştir. Proteinin kristal yapısı, X-RAY Kırınım Kristalografi Metodu kullanılarak belirlenmiştir ve 2.80 Å çözünürlük değerine sahiptir. Protein Veri Bankasından indirilen reseptör protein monomer formdadır. Discovery Studio Visualizer 2020 (Dassault Systèmes, 2019) programı kullanılarak 3 boyutlu yapıdaki antagonist (ML5 ((3R)-3-amino-4-[(3-hexylphenyl) amino]-4-oxobutyl)phosphonic acid)) ayrılmış, ardından su ve diğer kalıntı moleküller silinerek, antagonist ayrıca kaydedilmiştir. Autodock Tools (Morris ve diğ., 2009) paketi kullanılarak polar hidrojenler ve Gasteiger yükleri eklenmiş, reseptör protein Autodock Vina için PDBQT formatında hazırlanmıştır. Ligandların 3 boyutlu yapısı Discovery Studio Visualizer programı kullanılarak çizilmiş ve konformasyonlar "clean geometry" seçeneği ile düzeltilerek, tüm ligandlara hidrojenler eklenmiştir. Daha sonra Autodock Tools ile ligandlar PDBQT formatında düzenlenmiştir.

### Moleküler Kenetleme (Molecular Docking)

Moleküler kenetleme çalışmaları Autodock Vina (Trott ve Olson, 2010) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bağlanma bölgesi için Autodock Tools ile Grid kutusu oluşturulmuştur. Grid kutusunun x, y, z değerleri sırasıyla 38, 32, 36 olarak; Grid kutusunun x, y, z merkezleri sırasıyla 7.466, 18.421, -9.774 olarak ayarlanmıştır. AutoDock Vina programı kullanılarak kenetleme gerçekleştirilmiştir. Reseptör protein ile 4 farklı ligand molekülünün moleküler kenetlemesi sonucunda elde edilen sonuç dosyaları AutoDock Tools'da incelenmiştir.

## SONUÇ ve TARTIŞMALAR (RESULTS and DISCUSSIONS)

### Farmakofor Modelleme (Pharmacophore Modelling)

Farmakofor analizinde yüksek skor sayısı ve yüksek özellik eşleşmesi (aromatiklik, hidrofobiklik, hidrojen bağı akseptörü, hidrojen bağı donörü, negatif iyonize olma) sayılarından yola çıkılarak 6 farklı hipotez seçilmiştir. Seçilen hipotezler ve özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir. En yüksek skora sahip hipotezler içerisinde 1. hipotez 6 molekül ile çakışmıştır. 2. Hipotez 8 molekül ile 3. Hipotez ise 10 molekül ile çakışmıştır.

**Çizelge 1.** Farmakofor modelleme sonucu elde edilen hipotezler ve özellikleri

*Table 1. Hypotheses obtained as a result of pharmacophore modeling and their properties*

Hipotez	Skor	Molekül Sayısı	Özellikler	Aromatik	Hidrofobik	H-donör	H-akseptör	Negatif
1	45.000	6	7	3	0	0	4	0
2	36.056	10	5	2	0	0	2	1
3	38.141	8	6	2	0	0	3	1
4	34.857	13	4	2	0	0	2	0
5	33.675	15	4	2	0	0	2	0
6	36.000	7	6	2	0	0	4	0

Hipotezler ve içerdikleri özellikler Şekil 1'de verilmiştir. Şekilde hidrojen bağı alıcısı özellik pembe rengi ile, negatif iyonize olma gri rengi ile, halkalı aromatik yapıya sahip olma özelliği mavi rengi ile ifade edilmektedir.

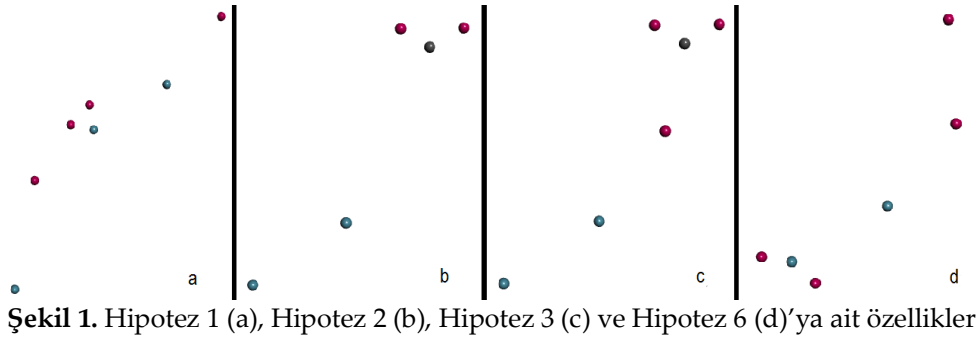


Figure 1. Features of Hypothesis 1 (a), Hypothesis 2 (b), Hypothesis 3 (c), and Hypothesis 6 (d)

### Sanal Tarama (Virtual Screening)

Farmakofor modelleme sonucu elde edilen 6 farmakofor ZincPharmer veri tabanına yüklendiğinde hipotez 4 ve hipotez 5 ile örtüşen hiçbir moleküle rastlanmamıştır. Diğer 4 hipotez için eşleşen pek çok molekül arasından 20'şer molekül seçilerek kaydedilmiştir (Çizelge 2).

### In silico ADME/Toksikoloji Analizi (In silico ADME/Toxicology Analysis)

4 hipotez ile çakışan 80 molekül için ADME/toksikoloji sonuçları Çizelge 3'te verilmiştir. Bu değerler incelendiğinde Hipotez 2 ile çakışan Zinc veri tabanı kodları sırasıyla 12639489 ve 00146845 olan moleküller ile hipotez 6'da çakışan Zinc veri tabanı kodları sırasıyla 19847253 ve 19847241 olan moleküllerinin uygun ADME/toksikite şartlarını sağladığı belirlenmiştir. Bir molekülün ilaç özelliği kazanabilmesi için öncelikle Lipinski kullarına uyması gerekmektedir. Lipinski kurallarına göre; moleküler ağırlık 500 Da'dan küçük, hidrojen bağı akseptörü sayısı 10'dan küçük, hidrojen bağı donörü sayısı 5'ten küçük, MLogP değeri 4.15'ten küçük olmalıdır. Bu şartları ZINC12639489, ZINC00146845, ZINC19847253 ve ZINC19847241 moleküllerinin sağladığı belirlenmiştir. Çalıştığımız moleküller merkezi sinir sistemi hastalığı olan MS'e yönelik olduğundan bu moleküllerin kan-beyin bariyerini aşabilmesi gerekmektedir, 4 molekül (ZINC12639489 (24), ZINC00146845 (40), ZINC19847253 (62), ZINC19847241 (79)) de bu özelliği sağlamaktadır. TPSA değerinin 30'dan küçük olması beklenir. Bu değer ZINC12639489 molekülünde 54.37, ZINC00146845 molekülünde 75.96, ZINC19847253 ve ZINC19847241 moleküllerinde 62.12'dir. Consensus LogPo/w değeri lipofilik davranışı temsil eder ve değer 5'ten küçük olması beklenir. Consensus LogPo/w değeri ZINC12639489 için 3.35, ZINC00146845 için 1.86, ZINC19847253 için 1.65 ve ZINC19847241 için 1.61'dir, bekleneni karşılamaktadır. Biyoyararlanım skorunun 0.1'den yüksek olması gerekir, bu dört molekül de 0.55'ten yüksek biyoyararlanım skoruna sahiptir. Bu dört ilaç molekülünün de gastrointestinal absorpsiyonları (GI) yüksektir. ZINC12639489, ZINC19847253 ve ZINC19847241 P-glikoprotein substrat (P-gp) özelliğine sahiptir, proteinlere tutunabilmektedirler ve bu gastrointestinal sistemde absorpsiyonlarının düşmesine yol açmaktadır; ZINC00146845 P-gp özelliğine sahip değildir. Sitokrom P (CYP) enzimleri karaciğer fonksiyonlarını etkilemektedir, inhibe olmamaları istenir. Bu dört molekülden hiçbiri CYP2D6 enzimini inhibe etmemektedir.

**Çizelge 2.** ZincPharmer veri tabanı taraması sonucu elde edilen 80 molekül*Table 2. 80 molecules obtained as a result of ZincPharmer database search*

Farmakofor		RMSD	Moleküler Ağırlık	RBnds	Zinc No		RMSD	Moleküler ağırlık	RBnds	Zinc No
Hipotez 1	1	0,217	417	9	36693346	11	0,268	416	9	36693376
	2	0,217	431	10	36694044	12	0,415	367	11	22835402
	3	0,217	403	8	36693219	13	0,415	369	11	22835395
	4	0,268	387	7	36693370	14	0,251	403	8	36693225
	5	0,270	373	6	05240658	15	0,218	432	10	36693222
	6	0,271	401	8	36694045	16	0,251	417	9	36693842
	7	0,214	444	11	38746706	17	0,251	436	8	09813947
	8	0,251	415	9	38746745	18	0,270	387	7	36693940
	9	0,255	432	10	36693228	19	0,415	395	13	12898424
	10	0,268	401	8	36694046	20	0,270	401	8	09814150
Hipotez 2	21	0,225	348	8	02661424	31	0,287	283	8	35324248
	22	0,233	281	7	02378750	32	0,317	284	7	67740009
	23	0,247	391	11	02581761	33	0,299	303	6	00390492
	24	0,271	396	12	12639489	34	0,320	320	8	00060919
	25	0,291	367	9	04025769	35	0,381	320	9	49453302
	26	0,289	283	8	34595016	36	0,352	324	9	08378891
	27	0,292	283	8	34595015	37	0,251	391	8	04728963
	28	0,234	340	6	13467135	38	0,267	354	8	16481292
	29	0,235	334	7	00152541	39	0,285	294	6	37464811
	30	0,308	267	7	35323954	40	0,294	331	8	00146845
Hipotez 3	41	0,388	331	8	00146845	51	0,429	332	7	00205156
	42	0,387	350	7	12581920	52	0,429	346	8	00078986
	43	0,390	350	7	12632234	53	0,429	422	9	02255531
	44	0,391	356	7	16482016	54	0,430	373	10	17076623
	45	0,399	309	5	04663261	55	0,443	324	6	03115825
	46	0,417	390	8	20029604	56	0,459	393	8	05297708
	47	0,424	374	10	06189797	57	0,468	340	9	00313207
	48	0,427	360	9	04103652	58	0,468	312	7	04593173
	49	0,429	341	7	17071532	59	0,468	298	6	00482174
	50	0,429	355	8	12794884	60	0,469	340	9	04525765
Hipotez 6	61	0,173	275	6	45961059	71	0,239	341	8	71285848
	62	0,282	280	6	19847253	72	0,238	314	6	61721800
	63	0,204	291	7	45961095	73	0,239	330	7	71286870
	64	0,254	309	6	53502192	74	0,240	344	7	69529194
	65	0,153	375	6	21715994	75	0,243	314	6	71285827
	66	0,168	375	6	55308676	76	0,259	332	9	58245261
	67	0,199	346	11	58429218	77	0,260	343	7	72098338
	68	0,202	364	6	46793950	78	0,292	346	9	69537291
	69	0,211	406	7	19715383	79	0,301	260	6	19847241
	70	0,237	323	6	33082316	80	0,403	327	8	40508516

Çizelge 3. SwissADME veritabanından elde edilen ADME/Toksikoloji Sonuçları

Table 3. ADME/Toxicology Results from the SwissADME database

Bileşik	Lipinski	TPSA (Å²)	Log P <sub>ow</sub>	Biyo yararlanım skoru	GI absorpsiyonu	Kan Beyin Bariyerini geçebilme	P-gp substrat özellik	CYP2D6 inhibitörü	Log K <sub>p</sub> (cm/s)
1	Evet	125.57	1.50	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-6.48
2	Evet	114.80	2.37	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-7.86
3	Evet	114.80	2.50	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-6.86
4	Evet	116.15	2.18	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-7.01
5	Evet	125.38	0.75	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-8.28
6	Evet	116.15	1.65	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.27
7	Evet	127.27	1.38	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-8.13
8	Evet	124.03	1.63	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.87
9	Evet	127.27	1.38	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-8.13
10	Evet	124.03	1.63	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.87
11	Evet	124.03	1.95	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-7.71
12	Evet	114.80	2.21	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.02
13	Evet	118.04	1.96	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-7.28
14	Evet	124.03	1.87	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-7.71
15	Evet	114.80	2.21	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.07
16	Evet	124.03	2.28	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-7.54
17	Evet	114.80	2.45	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-6.86
18	Evet	114.80	2.45	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-6.86
19	Evet	114.14	2.58	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-6.86
20	Evet	114.80	2.72	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-6.78
21	Evet	135.15	0.55	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-8.77
22	Evet	110.85	2.04	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.15
23	Evet	124.37	-0.02	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.57
24	<b>Evet</b>	<b>54.37</b>	<b>3.35</b>	<b>0.85</b>	<b>Yüksek</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Hayır</b>	<b>-5.70</b>
25	Evet	54.37	3.70	0.85	Yüksek	Evet	Evet	Evet	-4.91
26	Evet	145.96	0.90	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-8.68
27	Evet	124.37	0.38	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.37
28	Evet	104.54	-0.22	0.56	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-9.80
29	Evet	104.54	-0.22	0.56	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-9.80
30	Evet	74.60	4.20	0.85	Düşük	Hayır	Evet	Evet	-4.28
31	Evet	92.14	3.20	0.56	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-6.14
32	Evet	90.44	2.10	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.23
33	Evet	84.86	2.34	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Evet	-7.05
34	Evet	57.53	3.72	0.85	Yüksek	Evet	Hayır	Evet	-4.67
35	Evet	57.53	3.72	0.85	Yüksek	Evet	Hayır	Evet	-4.67
36	Evet;(MLOGP>4.15)	37.30	4.66	0.85	Düşük	Evet	Hayır	Evet	-3.23
37	Evet	63.32	3.20	0.55	Yüksek	Evet	Evet	Evet	-6.47
38	Evet	107.45	0.44	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.86
39	Evet	102.68	1.17	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-8.88
40	<b>Evet</b>	<b>75.96</b>	<b>1.86</b>	<b>0.56</b>	<b>Yüksek</b>	<b>Evet</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>-7.56</b>
41	Evet	124.79	1.72	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-6.98
42	Evet	110.52	1.06	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.64
43	Evet	124.79	1.39	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.14
44	Evet	75.63	3.07	0.56	Yüksek	Evet	Evet	Evet	-6.34
45	Evet	75.63	2.17	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-6.72
46	Evet	124.79	3.20	0.56	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-5.76
47	Evet	136.27	3.43	0.56	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-5.36
48	Evet	169.74	-0.19	0.55	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-8.65
49	Evet	124.79	1.93	0.56	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-7.15
50	Evet	75.63	3.06	0.56	Yüksek	Evet	Evet	Evet	-6.17

51	Evet	75.63	2.46	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-6.38
52	-	-	-	-	-	Hayır	-	Hayır	-
53	Evet	124.79	2.03	0.56	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-7.15
54	Evet	91.12	2.57	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Evet	-7.38
55	Evet	69.64	1.46	0.85	Yüksek	Hayır	Evet	Evet	-8.36
56	Evet	116.42	2.00	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.29
57	Evet	136.27	2.47	0.56	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-7.37
58	Evet	141.58	2.04	0.56	Düşük	Hayır	Evet	Hayır	-6.79
59	Evet	132.55	0.21	0.55	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-10.03
60	Evet	69.64	1.46	0.55	Yüksek	Evet	Evet	Evet	-8.50
61	Evet	99.00	0.97	0.55	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-7.03
62	<b>Evet</b>	<b>62.12</b>	<b>1.65</b>	<b>0.55</b>	<b>Yüksek</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Hayır</b>	<b>-6.67</b>
63	Evet	108.23	0.60	0.55	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-7.41
64	Evet	115.22	0.90	0.55	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-7.38
65	Evet	106.94	3.12	0.55	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-6.28
66	Evet	106.94	3.10	0.55	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-6.56
67	Evet	102.24	1.64	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.19
68	Evet	101.80	2.28	0.55	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-6.75
69	Evet	102.24	2.19	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.45
70	Evet	81.93	2.25	0.55	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-6.62
71	Evet	107.97	2.37	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-6.65
72	Evet	112.83	1.07	0.56	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-7.32
73	Evet	119.23	0.99	0.56	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.73
74	Evet	102.24	0.95	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-8.18
75	Evet	110.00	1.35	0.56	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-7.22
76	Evet	104.96	1.79	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.12
77	Evet	90.52	2.25	0.55	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-6.80
78	Evet	111.03	1.79	0.55	Yüksek	Hayır	Evet	Hayır	-7.06
79	<b>Evet</b>	<b>62.12</b>	<b>1.61</b>	<b>0.55</b>	<b>Yüksek</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Hayır</b>	<b>-6.68</b>
80	Evet	71.33	1.07	0.55	Yüksek	Hayır	Hayır	Hayır	-7.92

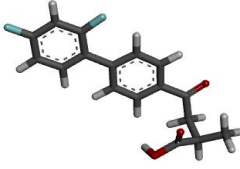
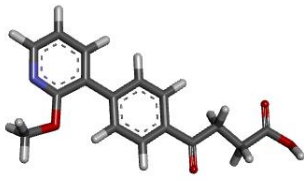
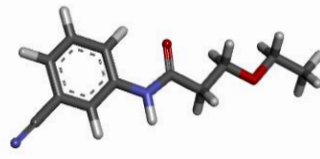
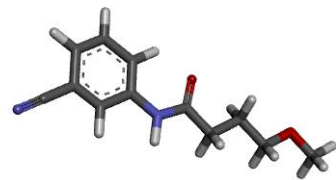
### Moleküler Kenetleme (Molecular Docking)

ADME/ Toksikoloji sonucuna göre seçilen 4 molekül (Çizelge 4) ile reseptörün bağlanma afinitesi değerleri Çizelge 5'te verilmiştir.

Bütün ligandlar için RMSD değerleri ve bağlanma afiniteleri incelenerek Çizelge 5'de verilen modlar için bağlanma afinitelerinin incelenmesine karar verilmiştir. ZINC00390492 bileşiğinin ilk bağlanma modu -8.6 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. ZINC67740009, ZINC19847253, ZINC19847241 moleküllerinin en yüksek skorları ise sırasıyla -7.6, -6.3, -6.8 kcal/mol olarak belirlenmiştir. Bağlanma afiniteleri incelendiğinde özellikle ZINC00390492 bileşiğinin sfingosin 1-fosfat reseptörünün orijinal antagonistten (-8.4 kcal/mol) yüksek bir skor verdiği görülmektedir.



**Çizelge 4.** Moleküler Kenetleme için seçilmiş moleküllere ait özellikler*Table 4. Properties of selected molecules for Molecular Docking*

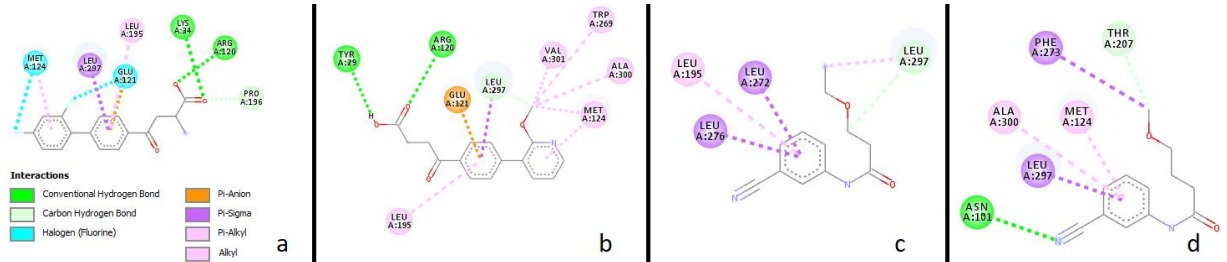
Bileşik Adı	IUPAC adlandırılması	3 Boyutlu (3D) yapı
ZINC00390492	3-[(2S)-1-[1-[4-(difluoromethoxy)phenyl]-2,5-dimethylpyrrol-3-yl]-1-oxopropan-2-yl]sulfanylpropanoic acid	
ZINC67740009	4-[4-(2-methoxypyridin-3-yl)phenyl]-4-oxobutanoic acid	
ZINC19847253	N-(3-cyanophenyl)-3-ethoxypropanamide	
ZINC19847241	N-(3-cyanophenyl)-4-methoxybutanamide	

Çizelge 5'te bağlanma skorları verilen ligandların bağlanma profilleri Şekil 2'de verilmiştir. Discovery Studio Visualizer programında ZINC00390492 molekülünün reseptör ile etkileşimleri incelendiğinde; ligandın Lys34 ve Arg120 aminoasit rezidüleriyle konvansiyonel hidrojen bağı etkileşimi, Leu297 ile pi-sigma etkileşimi, Leu195 ile pi-anyon etkileşimi, Met124 ve Glu121 ile halojen etkileşimi, Pro196 ile karbon hidrojen bağı etkileşimi yaptığı görülmektedir (Şekil 2-a). ZINC67740009 molekülü incelendiğinde ise Tyr29 ve Arg120 rezidüleriyle konvansiyonel hidrojen bağı, Leu297 ile karbon hidrojen bağı, Glu121 ile pi-anyon etkileşimi, Met124, Trp269, Ala300 ve Val301 ile pi-sigma etkileşimi, Leu195 ile pi-alkil etkileşimi yaptığı görülmektedir (Şekil 2-b). ZINC19847253 molekülünün ise Leu297 ile karbon hidrojen bağı, Leu195 ile pi-alkil etkileşimi, Leu272 ve Leu276 ile pi-sigma etkileşimi yaptığı görülmektedir (Şekil 2-c). Son olarak ZINC19847241 molekülü ise Thr207 ile karbon hidrojen bağı, Asn101 ile konvansiyonel hidrojen bağı, Met124 ve Ala300 ile pi-alkil etkileşimi, Phe273 ve Leu297 ile pi-sigma etkileşimi yapmaktadır (Şekil 2-d).

Çizelge 5. Bileşiklerin moleküler kenetlenme özellikleri

Table 5. Molecular docking properties of compounds)

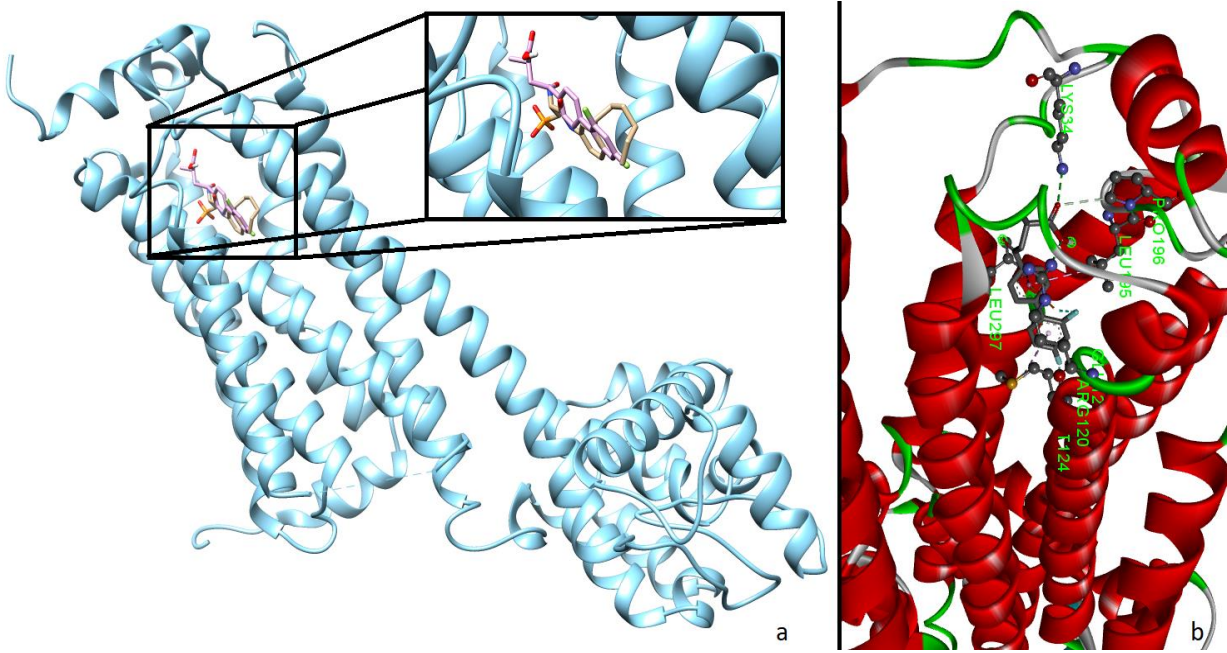
Bileşik	Bağlanma Modu	Bağlanma Afinitesi (kcal/mol)	En iyi moddan uzaklık (Å)	
			RMSD l.b.	RMSD l.b.
ZINC00390492	1	-8.6	0.000	0.000
	8	-7.6	1.598	2.219
	12	-7.1	0.942	1.440
ZINC67740009	1	-7.6	0.000	0.000
	3	-6.9	3.736	8.231
	4	-6.9	1.607	2.225
ZINC19847253	1	-6.3	0.000	0.000
	3	-6.3	3.388	4.842
	6	-6.2	1.820	2.904
ZINC19847241	1	-6.8	0.000	0.000
	5	-6.4	2.963	6.766
	6	-6.2	3.046	5.224
İnhibitör (ML5)	1	-8.4	0.000	0.000
	2	-8.2	2.203	2.657
	5	-7.3	2.777	4.994



Şekil 2. ZINC veri tabanından alınan moleküllerin bağlanma profilleri

Figure 2. Binding profiles of molecules from the ZINC database

Kristal yapıdaki antagonist ile en yüksek bağlanma afinitesi sonucuna sahip ZINC00390492 bileşiğinin reseptör yapısı içerisindeki konumları da incelenmiş, Şekil 3'te verilmiştir. Buna göre ZINC00390492 molekülünün antagonist ile aynı bölge içerisinde olduğu (Şekil 3-a) ve literatürde verilen bağlanma paketi ile uyumlu bir bağlanma profili verdiği (Şekil 3-b) ortaya konmuştur.



**Şekil 3.** Bağlanma profilinin 3 boyutlu gösterimi a) Reseptör içerisinde ML5 (açık kahve), ZINC00390492 (Pembe). b) ZINC00390492 molekülünün reseptör içerisindeki bağlanma profilinin detaylı gösterimi  
**Figure 3.** 3D representation of the binding profile a) ML5 (light brown), ZINC00390492 (Pink) in the receptor. b) Detailed display of the binding profile of the ZINC00390492 molecule in the receptor

S1P1 ve ML056 adlı ligand ile yapılan bir doking çalışmasında (Hanson ve diğ., 2012) reseptör ile ligandın afinite değeri 8.3 kcal/mol ve 11.8 kcal/mol olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda bu değer 8.6 kcal/mol olarak bulunmuştur. ML056'nın S1P1 reseptörüyle etkileşimlerine bakıldığında; ligandın Arg120, Ser105, Tyr29 ve Lys34 aminoasit rezidüleriyle hidrojen bağı yaptığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda ZINC00390492 molekülü Lys34 ve Arg120 rezidüleriyle, ZINC67740009 molekülü Tyr29 ve Arg120 rezidüleriyle hidrojen bağı yapmaktadır. Burada benzer sonuçlar elde ettiğimizi söyleyebiliriz. ML056 ile S1P1 etkileşimlerinde ligand ile Trp269 arasında disülfid bağı olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız hiçbir ligand molekülün disülfid bağı yapmadığı belirlenmiştir. ML056'nın, reseptörün Thr207, Leu195, Leu272, Leu276, Met124, Glu121 rezidüleriyle Van der Waals etkileşimleri yaptığı belirtilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız ZINC00390492 molekülünün Leu195, Leu297, Met124, Glu121 ile; ZINC67740009 molekülünün Glu121, Met124, Trp269, Ala300, Val301, Leu195 ile; ZINC19847253 molekülünün Leu297, Leu195, Leu272, Leu276 ile; ZINC19847241 molekülünün Thr207, Met124, Leu297 ve Phe273 rezidüleriyle etkileşimleri yaptığı belirlenmiştir. Burada Thr207, Leu195, Leu272, Leu276, Met124, Glu121 rezidülerinin hem bizim ligandlarımızla hem de ML056 ligandıyla ortak olarak etkileşime girdiği ve çalışmaların benzerlik gösterdiği söylenebilir.

Sonuç olarak ZINC12639489 (24), ZINC00146845 (40), ZINC19847253 (62), ZINC19847241 (79) bileşiklerinin yeni sfingosin-1-fosfat reseptör modülatörü olabileceği tespit edilmiştir. Moleküllerinin etkinliğinin belirlenmesi için *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

#### KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Brandstadter, R., Katz Sand, I., 2017, "The use of natalizumab for multiple sclerosis", *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, Cilt 13, ss. 1691–1702. doi:10.2147/NDT.S114636.
- Brinkmann, V., 2007, "Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology", *Pharmacol. Ther.*, Cilt 115, ss. 84–105.
- Calabresi, P. A., Radue, E. W., Goodin, D., et al., 2014, "Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial", *Lancet Neurol.*, Cilt 13, Sayı 6, ss. 545–56.

- Chen, X., Liu, M., Gilson, M. K., 2001, "BindingDB: A Web-Accessible Molecular Recognition Database", *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, Cilt 4, Sayı 8, ss. 719–25.
- Daina, A., Olivier, M., Vincent, Z., 2017, "SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules", *Scientific Reports*, Cilt 7, ss. 1–13.
- Dassault Systèmes. 2019. "Discovery Studio Visualizer."
- Dror, O., Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., Wolfson, H. J., 2009, "Novel Approach for Efficient Pharmacophore-Based Virtual Screening: Method and Applications." *Journal of Chemical Information and Modeling*, Cilt 49, Sayı 10, ss. 2333–43.
- Friese, M. A., Schattling, B., Fugger, L., 2014, "Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis", *Nature Reviews Neurology*, Nature Publishing Group.
- Hanson, M. A., Roth, C. B., Jo, E., Griffith, M. T., Scott, F. L., Reinhart, G., et al., 2012, "Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor", *Science*, Cilt 335, Sayı 6070, ss. 851–855.
- Hauser, S. L., Bar-Or, A., Comi, G., Giovannoni, G., Hartung, H.-P.; Hemmer, B., Lublin, F., Montalban, X., Rammohan, K. W., Selmaj, K., Traboulsee, A., Wolinsky, J. S., Arnold, D. L., Klingelschmitt, G., Masterman, D., Fontoura, P., Belachew, S., Chin, P., Mairon, N., Garren, H. & Kappos, L., 2017, "Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis", *New England Journal of Medicine*, Cilt 376, Sayı 3, ss. 221-234.
- Hauser, S. L., Cree, B. A. C., 2020, "Treatment of Multiple Sclerosis: A Review", *American Journal of Medicine*. Elsevier Inc.
- Kappos, L., Bar-Or, A., Cree, B. A. C., et al., 2018, "Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study", *Lancet*, Cilt 391, Sayı 10127, ss. 1263–73.
- Koes, D. R., and Camacho, C. J., 2012, "ZINCPharmer: Pharmacophore Search of the ZINC Database." *Nucleic Acids Research*, Cilt 40, ss. 409–14.
- Lee, M. J., Van Brockly, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., et al., 1998, "Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1", *Science*, Cilt 279, ss. 1552–1555.
- Marciniak, A., Camp, S.M., Garcia, J.G.N., Polt, R., 2020, "In silico Docking Studies of Fingolimod and S1P1 Agonists", *Front. Pharmacol.*, Cilt 11, Sayı 247.
- Massacesi, L., Genain, C.P., Lee-Parritz D., Letvin N.L., Canfield D., Hauser S.L., 1995, "Active and passively induced experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets: a new model for multiple sclerosis", *Ann. Neurol.*, Cilt 37, Sayı 4, ss. 519–30.
- Matthews, P. M., 2019, "Chronic inflammation in multiple sclerosis — seeing what was always there." *Nat. Rev. Neurol.*, Cilt 15, ss. 582–593. doi:10.1038/s41582-019-0240-y.
- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., and Olson, A. J., 2009, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility." *Journal of Computational Chemistry*, Cilt 30, Sayı 16, ss. 2785–91.
- Moser, T., Akgün, K., Proschmann, U., Sellner, J., and Ziemssen, T., 2020, "The role of TH17 cells in multiple sclerosis: Therapeutic implications." *Autoimmun. Rev.*, Cilt 19, ss. 102647. doi:https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102647.
- Murphy, M. P., 2009, "How mitochondria produce reactive oxygen species", *Biochemical Journal*.
- Rudick, R.A., Stuart, W.H., Calabresi, P.A., et al., 2006, "Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis", *N. Engl. J. Med.*, Cilt 354, Sayı 9, ss. 911–23.
- Toman, R. E., Spiegel, S., 2002, "Lysophospholipid receptors in the nervous system", *Neurochem. Res.*, Cilt 27, ss. 619–627.
- Trott, O., Olson, A., 2010, "AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading", *Journal of Computational Chemistry*, Cilt 31, Sayı 2, ss. 455–61.

Wan, E. C. K., 2020, "Cellular and Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis", *Cells*, Cilt 9, Sayı 10, 2223.