

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов

### ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРНОГО ОСТОВА ЛИГАНДОВ ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ $\beta$ -ЛАКТАМАЗ

Д.А. Бешнова<sup>1#</sup>, К. Каролан<sup>1§</sup>, В.Г. Григоренко<sup>2</sup>, М.Ю. Рубцова<sup>2</sup>,  
Ю. Гбевор<sup>3</sup>, Д. Льюис<sup>3</sup>, В.С. Ламзин<sup>1</sup>, А.М. Егоров<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Европейская лаборатория молекулярной биологии, Гамбург, Германия

<sup>#</sup>(в настоящее время) УТ Юго-западный медицинский центр, Даллас, Техас, США

<sup>§</sup>(в настоящее время) Международная организация гражданской авиации, Монреаль, Квебек, НЗС 5Н7 Канада

<sup>2</sup>Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,

119991, Москва, Ленинские Горы, 1, стр. 3; \* эл. почта: alex.m.egorov@gmail.com

<sup>3</sup>Европейская лаборатория молекулярной биологии, Гейдельберг, Германия

Для поиска новых ингибиторов  $\beta$ -лактамаз, обуславливающих устойчивость бактерий к  $\beta$ -лактамным антибиотикам, осуществлен виртуальный скрининг, в основу которого положено изменение структурного остова лигандов. В качестве стартовых молекул были заданы структуры известных ингибиторов  $\beta$ -лактамаз и был выполнен поиск их структурных аналогов, имеющих похожую форму. Для этого использовали набор дескрипторов, включающий описание общих характеристик молекулы, её хиральности, моментов одномерного распределения расстояний между атомами молекулы и моментов более высокого порядка, которые применяются в методах распознавания образов, но не использовались ранее для поиска структур лигандов. Данный подход был использован для поиска аналогов четырёх описанных в литературе аллостерических ингибиторов сериновых  $\beta$ -лактамаз. После виртуального скрининга *in silico* было экспериментально исследовано влияние двух выбранных лигандов на активность рекомбинантных  $\beta$ -лактамаз ТЕМ типа. Это позволило обнаружить новые ингибиторы не  $\beta$ -лактамной природы, показавшие более высокую эффективность ингибирования  $\beta$ -лактамаз по сравнению со стартовыми молекулами.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -лактамаза; виртуальный скрининг; структурный остов; лиганды; ингибиторы; антибиотикорезистентность

**DOI:** 10.18097/PBMC20196506468

## ВВЕДЕНИЕ

Методы высокопроизводительного виртуального скрининга активно используются для поиска новых лекарственных средств, действующих на определённые белковые мишени. Однако многие лиганды, обнаруженные таким способом, могут иметь ограниченное практическое применение из-за неподходящих метаболических и/или физико-химических свойств, высокой токсичности или низкой пероральной биодоступности [1]. При этом их структурные аналоги могут иметь сходную биологическую активность в отношении тех же мишеней, даже если их молекулярный скелет (остов) относится к другому химическому классу. Поиск соединений, имеющих разные структурные элементы молекулярного остова, но характеризующихся похожей биологической активностью, известен в литературе как изменение структурного остова (scaffold hopping) [2, 3]. В последнее десятилетие этот подход стал широко применяться для поиска новых потенциальных лекарств [4, 5].

Одной из нерешённых проблем виртуального скрининга является разработка быстрого и надёжного алгоритма поиска химических соединений в базах данных, содержащих огромное количество молекулярных структур, и идентификация соединений с желаемой биологической активностью.

Созданные до настоящего времени методы скрининга на основе изменения структурного остова лигандов разделяются на методы без выравнивания, основанные на использовании векторных дескрипторов, сопоставлении фрагментов и сокращённых графов и замене фрагментов, и выравнивании лигандов в трёхмерном (3D) пространстве [1]. Также существуют методы быстрого распознавания 3D форм [6], методы с использованием сферических гармоник [7] и методы без выравнивания с использованием векторных дескрипторов на основе “отпечатков пальцев” (fingerprints) и дескрипторов формы [8-11].

Наиболее широко используемые методы на основе “отпечатков пальцев” характеризуют элементы структуры лигандов в двумерном пространстве [8]. Структурные элементы могут быть определены на основе словарей (BCI) [1], диаграмм межатомных связей, систематически дробящих молекулярные структуры на подструктурные фрагменты [1, 11], и циклических структур, таких как расширенные диаграммы, включающие описание молекулярной стереохимии и позволяющие лучше описать структурно-функциональные соответствия (extended connectivity fingerprints, ECFP) [1, 9]. Сходство между двумя молекулами рассчитывается по количеству идентичных структурных фрагментов [1]. Несмотря на небольшие вычислительные затраты, методы отпечатков имеют ограниченные возможности

применения, плохо масштабируются при увеличении сложности структуры соединения, существенно зависят от набора предопределённых функций и плохо подходят для поиска изменений остова структуры [8, 12].

Поскольку родство лиганда к белку определяется взаимодействиями в трёхмерном (3D) пространстве, были разработаны различные методы, учитывающие пространственные особенности молекул [13-15]. Многие методы 3D соответствия осуществляют скрининг посредством выравнивания пространственных структур лигандов. Основопологающим принципом методов трёхмерного соответствия является представление, что биологически активное соединение является комплементарным по форме и молекулярным признакам распознавания к своему рецептору. Это подразумевает, что соединения с наилучшим соответствием 3D структур должны распознаваться одними и теми же макромолекулами-мишенями. В отличие от дескрипторных векторных методов, 3D методы учитывают конформационную гибкость лигандов, их форму и функциональные особенности, необходимые для межмолекулярного взаимодействия. Особый интерес представляет использование этих методов для осуществления изменений структурного остова – идентификации молекул, имеющих другое строение, но способных взаимодействовать с той же белковой мишенью [16]. Многие методы оценки 3D соответствия осуществляют скрининг посредством выравнивания структур лигандов в 3D пространстве. Эти подходы описывают молекулы с помощью набора дескрипторов, среди которых наиболее распространёнными являются полевые (GRID) [17], основанные на форме (ROCS) [14, 15], и фармакофоры (FEPOPS) [18]. Для определения наилучшего пространственного соответствия молекулярных структур применяют методы оптимизации [19].

Доступные методы 3D соответствия требуют высоких вычислительных мощностей из-за сложности, связанных с гибкостью лигандов и выявлением оптимального пространственного выравнивания [19]. Было установлено, что для описания всех биологически активных конформаций одного лиганда необходим анализ нескольких сотен его конформеров [19, 20]. Разработка эффективных вычислительных подходов, применимых к базам, содержащим данные о миллионах низкомолекулярных соединений, представляется особенно актуальной.

Одним из первых примеров успешного применения метода изменения структурного остова лиганда является открытие трамадола – сильнодействующего анальгетика, являющегося аналогом морфина и при этом характеризующегося существенно меньшими побочными эффектами [3, 21]. Возможность обнаружения новых структурных аналогов известных фармакологических веществ представляет большой интерес для лечения растущего числа бактериальных инфекций и для борьбы с устойчивостью их возбудителей к антибиотикам [22].

Резистентность бактерий к антибактериальным препаратам представляет собой глобальную угрозу

и серьёзную проблему для современной медицины [23, 24], распространённым механизмом которой является модификация молекул антибиотиков [25, 26]. Наиболее широко используемые β-лактамы антибиотиков, такие как пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы, теряют свою эффективность из-за синтеза бактериями β-лактамаз, которые гидролизуют и таким образом инактивируют молекулы β-лактамов [27]. Одним из основных способов борьбы с устойчивостью бактерий к антибиотикам остаётся разработка новых ингибиторов β-лактамаз и их использование в сочетании с антибиотиками [28]. Первые ингибиторы β-лактамаз (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам) имеют в структуре β-лактамное кольцо, и механизм их ингибиторного действия основан на образовании стабильного ацил-ферментного комплекса лиганда с остатком серина активного центра β-лактамаз [29, 30]. Эти ингибиторы активно используются в клинической практике, однако их число ограничено и они имеют узкую специфичность в отношении β-лактамаз [31].

Широкое использование ингибиторов привело также к появлению мутантных форм β-лактамаз, способных деацилировать комплексы ферментов с ингибитором, и вследствие этого становящихся устойчивыми к их действию. В настоящее время развивается новая стратегия поиска ингибиторов, действующих на активный центр ферментов, но не содержащих β-лактамное кольцо [32]. Наиболее эффективными оказались соединения класса диазобициклооктанов (авибактам и релебактам), образующие карбамил-ферментные комплексы с каталитическим остатком серина, которые далее подвергаются медленной обратимой рециклизации с высвобождением молекулы ингибитора [33, 34]. В качестве новых ингибиторов β-лактамаз также активно исследуются производные бороновых кислот (ваборбактам), являющиеся ингибиторами переходного состояния комплекса фермента с антибиотиком [35-37]. Однако строение этих соединений по-прежнему основано на структуре известных антибиотиков, и резистентность к этим ингибиторам уже обнаружена [38, 39].

Существует явная необходимость в поиске новых ингибиторов бактериальных β-лактамаз, действующих по принципу аллостерического ингибирования. До настоящего времени было обнаружено лишь небольшое количество таких ингибиторов [40, 41].

Целью данной работы был поиск аналогов известных аллостерических ингибиторов при помощи нового метода виртуального скрининга. При разработке метода скрининга мы попытались имитировать *in silico* процесс, обратный используемому природой *in vivo* при развитии резистентности бактерий к антибиотикам. Учитывая тот факт, что бактерии мутируют β-лактамазные ферменты для более эффективного расщепления β-лактамовых антибиотиков, нашей целью было “мутировать” ингибиторы так, чтобы их каркас изменялся, но форма молекулы оставалась относительно неизменной. Метод изменения структурного остова лиганда использован для поиска новых

## ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ИНГИБИТОРОВ $\beta$ -ЛАКТАМАЗ

ингибиторов  $\beta$ -лактамаз, в качестве стартовых молекул исследованы известные аллостерические ингибиторы  $\beta$ -лактамаз класса А. Отобранные на основе виртуального скрининга лиганды были исследованы экспериментально с использованием рекомбинантных  $\beta$ -лактамаз TEM типа, относящихся к молекулярному классу А.

### МЕТОДИКА

#### База молекулярных структур потенциальных лигандов для виртуального скрининга

База данных содержит 8 млн. коммерчески доступных лекарственных соединений от различных поставщиков химических веществ ("Amri", "Asinex", "Bionet", "Chemblock", "Chembridge", "ChemDiv", "Chemti", "Enamine", "Florida", "Fluorochem", "Matrix", "Maybridge", "Nanosyn", "Oakwood", "Otava", "Specs", "TimTec", "Ukrorgsynth"). Размер молекул варьируется от 5 до 100 неводородных атомов. База данных была создана в "Chemical Biology Core Facility" (Европейская лаборатория молекулярной биологии (ЕМБЛ), Гейдельберг, Германия).

#### Метод изменения структурного остова лигандов

Для лигандов, содержащихся в базе данных, были рассчитаны числовые значения дескрипторов,

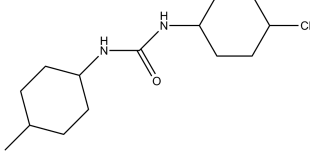
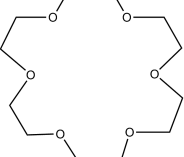
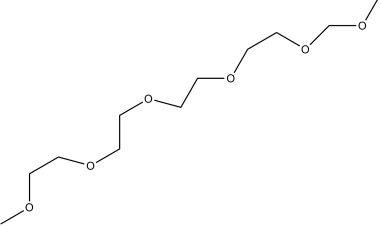
для каждой структуры было рассмотрено до 200 различных конформаций. Набор числовых дескрипторов, приведенных в таблице 1, включал описание общих характеристик молекулы, хиральности, моментов одномерного распределения расстояний между атомами и моментов более высокого порядка, которые ранее не применялись для поиска структур лигандов.

Схема метода изменения структурного остова лигандов представлена на рисунке 1. Входные данные представляют собой набор численных значений дескрипторов стартового лиганда. Затем проводится сравнение этого набора с соответствующими дескрипторами лигандов в базе данных и вычисление параметра сходства формы (shape similarity score) для каждого соединения. Выбор потенциального аналога производили следующим образом: если лиганд из базы данных обладает характеристиками, сопоставимыми с характеристиками стартового соединения, то считается, что их структуры и формы являются аналогами. Для лигандов, характеризующихся максимальными значениями параметра сходства формы, проводили пространственное выравнивание структур со структурой стартового лиганда с использованием специально разработанного алгоритма Ligaline. На основании лучших показателей сходства выбирали лиганды для экспериментального скрининга.



Рисунок 1. Схема алгоритма метода изменения структурного остова лигандов.

Таблица 1. Описание молекулярных дескрипторов

Дескриптор	Структура лиганда/значение дескриптора		
	Лиганд 1	Лиганд 2	Лиганд 3
			
F1, Радиус инерции, нормированный на количество атомов в молекуле [56]	0,225	0,184	0,301
F2, Количество атомов	18	18	18
F3, Индекс хиральности [43]	1,150	0,000	4,689
F4-F5, Третий (коэффициент асимметрии) и четвертый (коэффициент эксцесса) центральные моменты расстояний между атомами и центром молекулы [47]	1,250 1,679	1,022 1,056	1,256 1,685
F6, Собственные значения матрицы связности [48, 49]			
1-st eigenvalue	$1,399 \cdot 10^{-3}$	$3,350 \cdot 10^{-3}$	$8,937 \cdot 10^{-4}$
2-nd eigenvalue	$7,0513 \cdot 10^{-3}$	$3,350 \cdot 10^{-3}$	$3,547 \cdot 10^{-3}$
3-rd eigenvalue	$1,666 \cdot 10^{-2}$	$1,299 \cdot 10^{-2}$	$7,881 \cdot 10^{-3}$
4-th eigenvalue	$1,835 \cdot 10^{-2}$	$1,299 \cdot 10^{-2}$	$1,376 \cdot 10^{-2}$
5-th eigenvalue	$2,632 \cdot 10^{-2}$	$2,778 \cdot 10^{-2}$	$2,101 \cdot 10^{-2}$
6-th eigenvalue	$2,632 \cdot 10^{-2}$	$2,778 \cdot 10^{-2}$	$2,941 \cdot 10^{-2}$
7-th eigenvalue	$3,337 \cdot 10^{-2}$	$4,591 \cdot 10^{-2}$	$3,870 \cdot 10^{-2}$
8-th eigenvalue	$3,741 \cdot 10^{-2}$	$4,591 \cdot 10^{-2}$	$4,861 \cdot 10^{-2}$
9-th eigenvalue	$5,263 \cdot 10^{-2}$	$6,520 \cdot 10^{-2}$	$5,882 \cdot 10^{-2}$
10-th eigenvalue	$5,905 \cdot 10^{-2}$	$6,520 \cdot 10^{-2}$	$6,904 \cdot 10^{-2}$
11-th eigenvalue	$7,895 \cdot 10^{-2}$	$8,333 \cdot 10^{-2}$	$7,894 \cdot 10^{-2}$
12-th eigenvalue	$7,895 \cdot 10^{-2}$	$8,333 \cdot 10^{-2}$	$8,824 \cdot 10^{-2}$
13-th eigenvalue	$9,821 \cdot 10^{-2}$	$9,811 \cdot 10^{-2}$	$9,663 \cdot 10^{-2}$
14-th eigenvalue	0,107	$9,811 \cdot 10^{-2}$	0,104
15-th eigenvalue	0,113	0,108	0,110
16-th eigenvalue	0,121	0,108	0,114
17-th eigenvalue	0,125	0,111	0,117
F7-F16 Инварианты момента третьего порядка [52, 43]			
F7	0,301	$8,944 \cdot 10^{-2}$	0,314
F8	-0,294	$4,789 \cdot 10^{-2}$	-0,314
F9	$-1,531 \cdot 10^{-3}$	$-2,395 \cdot 10^{-10}$	$-6,151 \cdot 10^{-3}$
F10	$-1,717 \cdot 10^{-3}$	$-1,745 \cdot 10^{-9}$	$-8,243 \cdot 10^{-3}$
F11	$4,148 \cdot 10^{-4}$	$2,705 \cdot 10^{-11}$	$2,046 \cdot 10^{-3}$
F12	$-1,214 \cdot 10^{-4}$	$-1,771 \cdot 10^{-11}$	$-5,979 \cdot 10^{-4}$
F13	$-6,814 \cdot 10^{-5}$	$4,753 \cdot 10^{-11}$	$-4,109 \cdot 10^{-4}$
F14	$1,631 \cdot 10^{-6}$	$3,192 \cdot 10^{-20}$	$2,966 \cdot 10^{-5}$
F15	$-1,689 \cdot 10^{-7}$	$-1,843 \cdot 10^{-20}$	$-2,564 \cdot 10^{-6}$
F16	$6,552 \cdot 10^{-8}$	$1,369 \cdot 10^{-20}$	$1,289 \cdot 10^{-6}$
F17	$3,962 \cdot 10^{-8}$	$-3,424 \cdot 10^{-20}$	$1,215 \cdot 10^{-6}$

### Дескрипторы

Описание дескрипторов представлено в таблице 1, в которую также включены примеры значений дескрипторов для трёх химических соединений (лиганды 1, 2, 3) с равным количеством атомов и разной структурой молекулярного скелета (линейная, плоская и циклическая). Некоторые из дескрипторов ранее использовались в программах распознавания образов при построении макромолекулярных структур на картах плотности на основе данных кристаллографической и криоэлектронной микроскопии, реализованных в программном обеспечении ARP/wARP [43-46]. Они были адаптированы для описания формы молекул лигандов. Также в этой работе были разработаны и использованы дескрипторы, основанные на матрице межатомных связей (connectivity matrix).

Первые два дескриптора (F1 и F2) описывают общие характеристики молекулы – количество атомов и радиус вращения, значение которого отражает распределение атомов относительно центра масс молекулы и может рассматриваться как фактор компактности молекулярной структуры. Индекс хиральности F3 указывает на различия между молекулой и её зеркальным отображением [44]. Индекс хиральности равен 0, если объект неотличим от его зеркального отображения (лиганд 2), и увеличивается с увеличением различий между объектом и его зеркальным отображением (лиганды 1 и 3). Дескрипторы F4 (коэффициент асимметрии) и F5 (коэффициент эксцесса) являются третьим и четвёртым центральными моментами одномерного распределения евклидовых расстояний между атомами и центром молекулы [47]. Дескриптор F6 отражает информацию о связях между атомами лиганда, которые определяют топологию молекулы [16, 48, 49]. Топология межатомных связей может быть представлена в виде простого неориентированного и невзвешенного графа. Граф, в свою очередь, может быть математически представлен набором матриц с информацией о структуре. Для определения отличий молекулярного графа в одной вершине от его значений в близлежащих вершинах использовали матрицу связности Лапласа. Число ненулевых собственных значений матрицы связности равно числу атомов минус число несвязных кластеров [50]. Например, граф для 10 атомов, все из которых связаны, будет иметь девять ненулевых собственных значений, в то время как для 10 несвязанных атомов все собственные значения будут равны нулю.

Изменения в форме объектов могут быть рассмотрены с помощью моментов, поскольку функция плотности вероятности может быть уникально описана ровно одним бесконечным набором пространственных моментов. Трёхмерные центральные моменты второго и третьего порядка могут быть преобразованы в инварианты моментов [51] с использованием методов теории групп [52]. 11 моментных инвариантов третьего порядка (дескрипторы F7-F17) были ранее эффективно применены для выявления формы объектов в 3D картах

электронной плотности [43, 52]. В данном методе они использовались для сравнения взаимного расположения атомов молекул лигандов.

### Ранжирование молекул

Оценку параметра сходства формы для стартового лиганда и лиганда-кандидата из базы данных проводили по формуле:

$$\text{Shape Similarity Score} = \sum_i^N w_i (F_i^q - F_i^c)^2,$$

где  $i$  принимает значение всех  $N$  дескрипторов,  $F_i^q$  –  $i$ -ая характеристика стартового лиганда,  $F_i^c$  –  $i$ -ая характеристика лиганда-кандидата из базы данных. После скрининга всей базы данных и расчёта показателей сходства форм был составлен ранжированный список кандидатов лигандов. Далее проводили сравнение сходства соседних атомов выровненных молекул, рассчитанного как значения RMSD по их атомным координатам.

### Экспериментальное тестирование выбранных лигандов

Химические соединения, выбранные в качестве потенциальных ингибиторов  $\beta$ -лактамазы, были приобретены у “Asinex” (США), “Chembridge” (США), “ChemDiv” (США) и “Bionet” (Великобритания). Тестирование ингибиторной активности проводили с использованием рекомбинантной  $\beta$ -лактамазы TEM-171. Она была экспрессирована и очищена, как описано в [53]. Рекомбинантный фермент выделяли из периплазмы бактерий с использованием процедуры осмотического шока и очищали далее с помощью анионообменной и эксклюзионной хроматографии.

Ингибирование  $\beta$ -лактамазы TEM-171 изучаемыми лигандами определяли по снижению скорости ферментативного гидролиза хромогенного субстрата бета-лактамаз (CENTA,  $\beta$ -Lactamase Substrate – CAS 9073-60-3 – “Calbiochem”, США [54]). Готовили стоковые растворы соединений – потенциальных ингибиторов (10 мМ в 100% диметилсульфоксиде (ДМСО)). Реакционная среда содержала фосфатный буфер (50 мМ) pH 7,0 с 0,05% плуронином F-127, концентрации реагентов: фермент (6,25 нМ), субстрат CENTA (100 мкМ) и тестируемое соединение (100 мкМ). Реакцию начинали добавлением раствора субстрата к смеси фермента и лиганда в буфере. Регистрировали увеличение оптической плотности продукта ферментативного гидролиза при длине волны 405 нм. Степень ингибирования оценивали по наклону кривой накопления окрашенного продукта реакции, а также по значениям поглощения продукта через 30 мин. Данные были нормализованы к положительному (10 мкМ тазобактам) и отрицательному (ДМСО) контролю. Для соединений, которые ингибировали активность  $\beta$ -лактамазы на 20 % и более по сравнению с исходной активностью, определяли далее значение  $IC_{50}$ . Для лучших лигандов были определены равновесные константы ингибирования  $K_i$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Виртуальный отбор аналогов ингибиторов  $\beta$ -лактамаз методом изменения структурного остова лиганда*

В качестве стартовых молекул для виртуального скрининга были выбраны четыре низкоаффинных не  $\beta$ -лактамных ингибиторов  $\beta$ -лактамаз класса А:

FTA (3-(4-фениламино-фениламино)-2-(1H-тетразол-5-ил)акрилонитрил) – ингибитор  $\beta$ -лактамазы TEM-1 [40];

CBT (N,N-бис(4-хлорбензил)-1H-1,2,3,4-тетраазол-5-амин) – ингибитор  $\beta$ -лактамазы TEM-1 [40];

1CE (3-(1H-тетразол-5-илметил)-5,6,7,8-тетрагидро[1]бензотиено-[2,3-d] пиримидин-4(3H)-он) – ингибитор  $\beta$ -лактамазы CTX-M-9 [41];

F13 (3-фтор-N-[3-(1H-тетразол-5-ил)фенил]бензамид) – ингибитор  $\beta$ -лактамазы CTX-M-9 [41].

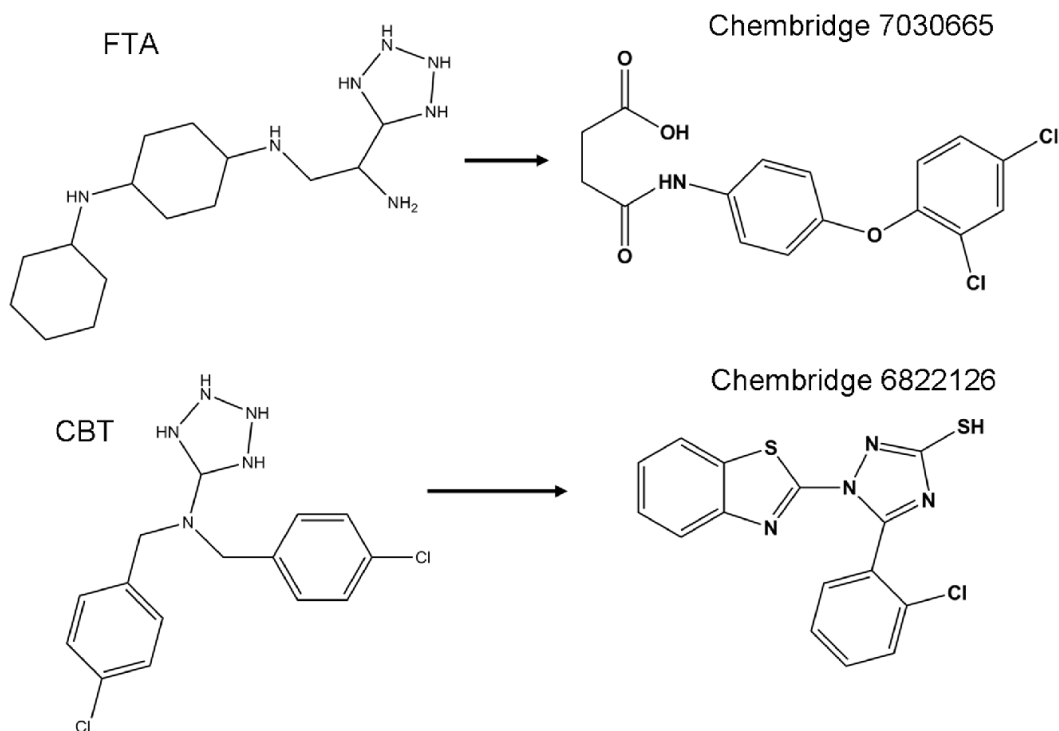
Структуры этих молекул (стартовые лиганды) были взяты из их кристаллографических комплексов с  $\beta$ -лактамазами (PDB ID: 1p3p, 1p3o, 3g34, 3g35).

Для стартовых лигандов были рассчитаны наборы дескрипторов, выполнено их сравнение с набором дескрипторов лигандов из базы данных, содержащей 8 млн. соединений, и вычислены параметры сходства формы для каждого соединения базы данных в оптимальной конформации. В результате скрининга было отобрано около 10000 соединений с максимальным значением параметра сходства формы. Затем проводили выравнивание в 3D пространстве набора выбранных структур со структурой каждого стартового лиганда. На основании лучших показателей сходства выбрали 1000 соединений.

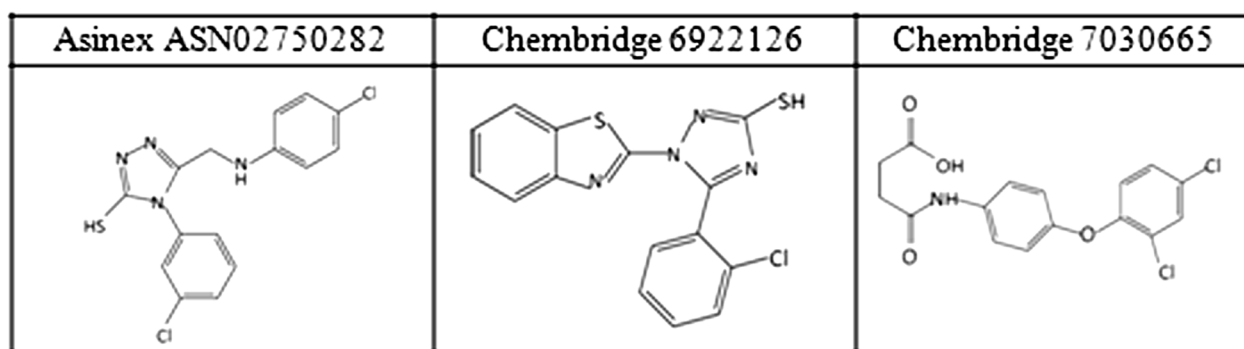
*Тестирование лигандов-потенциальных ингибиторов  $\beta$ -лактамаз с использованием рекомбинантной  $\beta$ -лактамазы TEM типа*

Для экспериментального подтверждения результатов виртуального скрининга исследовали эффективность ингибирования рекомбинантной  $\beta$ -лактамазы TEM-171 отобранными соединениями. В качестве контрольной реакции использовали гидролиз хромогенного субстрата CENTA  $\beta$ -лактамазой. Для увеличения производительности анализа реакцию проводили в 96-луночных планшетах. Концентрации реагентов подбирали таким образом, чтобы линейность начального участка кривой накопления продукта гидролиза сохранялась не менее 30 мин при комнатной температуре. Действие потенциальных ингибиторов оценивали по изменению наклона начального участка кривой накопления продукта реакции, а также по изменениям значений поглощения продукта через 30 мин после начала реакции. В качестве положительного контроля ингибирования использовали ингибирование  $\beta$ -лактамазы тазобактамом. Для лигандов с ингибирующей способностью, приводящей к снижению активности  $\beta$ -лактамазы более чем на 20%, определяли значение  $IC_{50}$ . Тестирование по изменению наклона начального участка кинетических кривых накопления продукта гидролиза CENTA позволило отобрать большее количество лигандов для дальнейшего исследования.

На основе сравнения значений  $IC_{50}$  были отобраны три ингибитора: два для бета-лактамаз TEM типа (Chembridge 6922126 и Chembridge 7030665) (рис. 2) и один для бета-лактамаз CTX-M типа (ASN02750282).



**Рисунок 2.** Химические структуры стартовых лигандов и найденных в результате виртуального скрининга потенциальных ингибиторов  $\beta$ -лактамаз TEM типа.



**Рисунок 3.** Структуры трёх лигандов-ингибиторов  $\beta$ -лактамаз, выбранных по способности ингибировать гидролиз  $\beta$ -лактамов.

**Таблица 2.** Значения  $IC_{50}$  для выбранных ингибиторов  $\beta$ -лактамаз ТЕМ типа

Компания-производитель, № по каталогу	$IC_{50}$ (мкМ)
«Asinex», ASN02750282	36
«Chembridge», 6922126	58
«Chembridge», 7030665	88

Их структурные формулы и значения  $IC_{50}$  приведены на рисунке 3 и в таблице 2. Далее проводили более подробное исследование ингибирующей активности двух лигандов (Chembridge 6922126 и Chembridge 7030665).

При детальном исследовании соединения Chembridge 6922126 было установлено, что оно склонно к димеризации, причем димер характеризуется более низкой растворимостью в водных растворах. Мономерная форма лиганда не ингибировала активность  $\beta$ -лактамаз.

Для лиганда Chembridge 7030665, найденного на основе стартового лиганда FTA, было определено значение равновесной константы ингибирования ( $K_i = 88$  мкМ) реакции гидролиза субстрата СЕНТА рекомбинантной бета-лактамазой ТЕМ-171. Это соединение продемонстрировало более эффективное ингибирование рекомбинантной  $\beta$ -лактамазы ТЕМ типа по сравнению с аналогом FTA, для которого значения  $K_i$  примерно в пять раз хуже ( $K_i = 490$  мкМ [40]).

Ингибитор Chembridge 7030665 представляет собой новый тип нековалентного ингибитора не- $\beta$ -лактамой природы на основе ацилированного феноксианилина. Он был дополнительно охарактеризован с использованием инфракрасной спектроскопии и тушения флуоресценции [53]. Анализ аминокислотных остатков, участвующих в координации ингибитора в активном сайте фермента, методом молекулярного докинга показал, что некоторые из них являются консервативными для  $\beta$ -лактамаз молекулярного класса А. Это даёт основание для вывода о возможной широкой специфичности этого ингибитора по отношению к клинически значимым ферментам класса А.

Мы также провели дополнительную химическую модификацию ингибитора Chembridge 7030665 с целью улучшения его способности ингибировать

$\beta$ -лактамазы. Было исследовано влияние различных заместителей бензольного кольца и длины углеводородных цепочек на эффективность подавления гидролиза. В результате был получен новый ингибитор не- $\beta$ -лактамой природы на основе тиомочевины, характеризующийся константой ингибирования  $K_i = 48$  мкМ [55].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы использовали разработанный нами оригинальный подход компьютерного анализа для поиска лигандов на основе изменения их структурного остова с целью обнаружения новых ингибиторов  $\beta$ -лактамаз не- $\beta$ -лактамой природы. Используя несколько стартовых лигандов, проявляющих определённую биологическую активность, использованный подход позволяет находить новые химические соединения иной структуры, но выполняющих ту же функцию. В отличие от методов основанных на сравнении “отпечатков пальцев”, представленный нами метод не требует наличия структурной информации о белке-мишени. Простота и высокая скорость расчёта дескрипторов позволяют быстро и эффективно сканировать большие молекулярные базы данных. В результате поиска новых ингибиторов бактериальных ферментов  $\beta$ -лактамаз, обуславливающих устойчивость к  $\beta$ -лактамам антибиотикам, были найдены три новых лиганда не- $\beta$ -лактамой природы, которые имеют более высокую ингибирующую способность по сравнению со стартовыми лигандами. Сочетание метода виртуального скрининга с последующим химическим дизайном молекулы лиганда позволяет получить ещё более эффективные ингибиторы.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Получение рекомбинантных  $\beta$ -лактамаз и экспериментальное изучение ингибиторов выполнено при финансовой поддержке РФ (Проект № 15-14-00014-П). Виртуальный скрининг ингибиторов осуществлен при финансовой поддержке программы стипендий ЕМБЛ для проектов на стыке научных дисциплин и гранта Европейской Комиссии № 291772 (совместное финансирование имени М. Склодовской-Кюри).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Schuffenhauer A. (2012) WIREs Comput. Mol. Sci., **2**, 842-867.
- Schneider G, Neidhart W, Giller T, Schmid G. (1999) Angew Chem. Int. Ed. Engl., **38**, 2894-2896.
- Sun H., Tawa G, Wallqvist A. (2012) Drug Discov. Today, **17**, 310-324.
- Brown N., Jacoby E. (2006) Mini-Rev. Med. Chem., **6**, 1217-1229.
- Mauser H., Guba W. (2008) Curr. Opin. Drug Discov. Devel., **11**, 365-374.
- Ballester P.J., Richards W.G. (2007) J. Comput. Chem., **28**, 1711-1723.
- Wang Q., Birod K., Angioni C., Grösch S., Geppert T., Schneider P., Rupp M., Schneider G. (2011) PLoS One, **6**, e21554. DOI: 10.1371/journal.pone.0021554.
- Willett P. (2011) Methods Mol. Biol., **672**, 133-158.
- Rogers D., Hahn M. (2010) J. Chem. Inf. Model, **50**, 742-754.
- Hofmann B., Franke F., Proschak E., Tanrikulu Y., Schneider P., Steinhilber D., Schneider G. (2008) Chem. Med. Chem., **3**, 1535-1538.
- Daylight Chemical Information Systems. Available at: <https://www.daylight.com> (Accessed October 10, 2019).
- Eckert H., Bajorath J. (2007) Drug Discov. Today, **12**, 225-233.
- Grant J.A., Gallardo M.A., Pickup B.T. (1996) J. Comp. Chem., **17**, 1653-1666.
- Rush T.S., Grant J.A., Mosyak L., Nicholls A. (2005) J. Med. Chem., **48**, 1489-1495.
- OpenEye Scientific. Available at: <http://www.eyesopen.com> (Accessed October 10, 2019).
- Yan X., Li J., Liu Z., Zheng M., Ge H., Xu J. (2013) J. Chem. Inf. Model., **53**, 1967-1978.
- Carosati E., Sciabola S., Cruciani G. (2004) J. Med. Chem., **47**, 5114-5125.
- Jenkins J.L., Glick M., Davies J.W. (2004) J. Med. Chem., **47**, 6144-6159.
- Roy A., Skolnick J. (2015) Bioinformatics, **31**, 539-544.
- Kirchmair J., Wolber G., Laggner C., Langer T. (2006) J. Chem. Inf. Model., **46**, 1848-1861.
- Sneader W. (1996) in: Drug prototypes and their exploitation. Wiley in Chichester, New York, pp. 800.
- Wavhale R.D., Martis E.A.F., Ambre P.K., Wan B., Franzblau S.G., Iyer K.R., Raikuvar K., Macegoniuk K., Berlicki L., Nandan S.R., Coutinho E.C. (2017) Bioorg. Med. Chem., **25**, 4835-4844.
- Naylor N.R., Atun R., Zhu N., Kulasabanathan K., Silva S., Chatterjee A., Knight G.M., Robotham J.V. (2018) Antimicrob. Resist. Infect. Control, **7**, 58.
- Fair R.J., Tor Y. (2014) Perspect. Medicin. Chem., **6**, 25-64.
- Eichenberger E.M., Thaden J.T. (2019) Antibiotics, **8**, 37.
- Munita J.M., Arias C.A. (2016) Microbiol. Spectr., **4**, 1-37.
- Bush K. (2018) Antimicrob. Agents Chemother., **62**, pii: e01076-18. DOI: 10.1128/AAC.01076-18.
- Bush K., Bradford P.A. (2019) Nat. Rev. Microbiol., **17**, 295-306.
- King D.T., Sobhanifar S., Strynadka N.C.J. (2016) Protein Sci., **25**, 787-803.
- Drawz S.M., Bonomo R.A. (2010) Clin. Microbiol. Rev., **23**, 160-201.
- Wright H., Bonomo R.A., Paterson D.L. (2017) Clin. Microbiol. Infect., **23**, 704-712.
- Docquier J.D., Mangani S. (2018) Drug Resist. Updat., **36**, 13-29.
- Tuon F.F., Rocha J.L., Formigoni-Pinto M.R. (2018) Infection, **46**, 165-181.
- Blizzard T.A., Chen H., Kim S., Wu J., Bodner R., Gude C., Imbriglio J., Young K., Park Y.W., Ogawa A., Raghoobar S., Hairston N., Painter R.E., Wisniewski D., Scapin G., Fitzgerald P., Sharma N., Lu J., Ha S., Hermes J., Hammond M.L. (2014) Bioorg. Med. Chem. Lett., **24**, 780-785.
- Bush K., Page M.G.P. (2017) J. Pharmacokinet. Pharmacodyn., **44**, 113-132.
- Wu G., Cheon E. (2018) Expert Opin. Pharmacother., **19**, 1495-1502.
- Krajnc A., Lang P.A., Panduwawala T.D., Brem J., Schofield S.J. (2019) Curr. Opin. Chem. Biol., **50**, 101-110.
- Giddins M.J., Macesic N., Annavajhala M.K., Stump S., Khan S., McConville T.H., Mehta M., Gomez-Simmonds A., Uhlemann A.C. (2018) Antimicrob. Agents Chemother., **62**, pii: e02101-17. DOI: 10.1128/AAC.02101-17.
- Both A., Buttner H., Huang J., Perbandt M., Belmar Campos C., Christner M. et al. (2017) J. Antimicrob. Chemother., **72**, 2483-2488.
- Horn J.R., Schoichet B.K. (2004) J. Mol. Biol., **336**, 1283-1291.
- Chen Y., Schoichet B.K. (2009) Nat. Chem. Biol., **5**, 358-364.
- Langer G.G., Evrard G.X., Carolan C.G., Lamzin V.S. (2012) J. Mol. Biol., **419**, 211-222.
- Hattne J., Lamzin V.S. (2008) Acta Cryst. D, **64**, 834-842.
- Hattne J., Lamzin V.S. (2011) J. R. Soc. Interface, **8**, 144-151.
- Heuser P., Langer G.G., Lamzin V.S. (2009) Acta Cryst. D, **65**, 690-696.
- Carolan C.G., Lamzin V.S. (2014) Acta Cryst. D, **70**, 1844-1853.
- Tabachnick B.G., Fidell L.S. (1996) in: Using Multivariate Statistics, 3rd ed, New York: Harper Collins.
- Burden F.R. (1989) J. Chem. Inf. Comput. Sci., **29**, 225-227.
- Burden F.R. (1997) Quant. Struct.-Act. Relat., **16**, 309-314.
- Marcus M., Smith T.R. (1989) Linear Multilinear Algebra, **25**, 219-230.
- Sadjadi F.A., Hall E.L. (1980) IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell., **2**, 127-136.
- Lo C.H., Don H.S. (1989) IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell., **11**, 1053-1064.
- Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Rubtsova M.Y., Deygen I.M., Antipin R.L., Majouga A.G., Egorov A.M., Beshnova D.A., Kallio J., Hackenberg C., Lamzin V.S. (2017) Biochimie, **132**, 45-53.
- Bebrone C., Moali C., Mahy F., Rival S., Docquier J.D., Rossolini G.M., Fastrez J., Pratt R.F., Frère J.M., Galleni M. (2001) Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 1868-1871.
- Antipin R.L., Beshnova D.A., Petrov R.A., Shiryayeva A.S., Andreeva I.P., Grigorenko V.G., Rubtsova M.Yu., Majouga A.G., Lamzin V.S., Egorov A.M. (2017) BMC Lett., **27**, 1588-1592.
- Stepto R., Chang T., Kratochvil P., Hess M., Horie K., Sato T., Vohlidal J. (2015) Pure Appl. Chem., **87**, 71-120.

Поступила в редакцию: 20.11.2019.

После доработки: 10.12.2019.

Принята к печати: 11.12.2019.



SCAFFOLD HOPPING COMPUTATIONAL APPROACH FOR SEARCHING  
NOVEL  $\beta$ -LACTAMASE INHIBITORS

*D.A. Beshnova<sup>1,1a</sup>, C. Carolan<sup>1,1b</sup>, V.G. Grigorenko<sup>2</sup>, M.Yu. Rubtsova<sup>2</sup>,  
E. Gbekor<sup>3</sup>, J. Lewis<sup>3</sup>, V.S. Lamzin<sup>1</sup>, A.M. Egorov<sup>2\*</sup>*

<sup>1</sup>European Molecular Biology Laboratory, c/o DESY, 85 Notkestraße, Hamburg, 22607 Germany

<sup>1a</sup>(present address) UT Southwestern Medical Center, 6000 Harry Hines Blvd, 75235, Dallas, TX, United States

<sup>1b</sup>(present address) International Civil Aviation Organization (ICAO), 999 Robert-Bourassa Boulevard,  
Montreal, Quebec H3C 5H7, Canada

<sup>2</sup>Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University,

1 Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: alex.m.egorov@gmail.com

<sup>3</sup>European Molecular Biology Laboratory, 1 Meyerhofstraße, Heidelberg, 69117 Germany

We present a novel computational ligand-based virtual screening approach with scaffold hopping capabilities for the identification of novel inhibitors of  $\beta$ -lactamases which confer bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. The structures of known  $\beta$ -lactamase inhibitors were used as query ligands, and a virtual *in silico* screening a database of 8 million drug-like compounds was performed in order to select the ligands with similar shape and charge distribution. A set of numerical descriptors was used such as chirality, eigen spectrum of matrices of interatomic distances and connectivity together with higher order moment invariants that showed their efficiency in the field of pattern recognition but have not yet been employed in drug discovery. The developed scaffold-hopping approach was applied for the discovery of analogues of four allosteric inhibitors of serine  $\beta$ -lactamases. After a virtual *in silico* screening, the effect of two selected ligands on the activity of TEM type  $\beta$ -lactamase was studied experimentally. New non- $\beta$ -lactam inhibitors were found that showed more effective inhibition of  $\beta$ -lactamases compared to query ligands.

**Key words:** beta-lactamases; virtual screening; scaffold hopping; ligands; inhibitors; antibiotic resistance

**Funding.** A.E., V.G., M.R. acknowledge the funding from the Russian Science Foundation (Project 15-14-00014-C, work on production of recombinant  $\beta$ -lactamase TEM-171 and inhibitory analysis). D.B. and C.C. acknowledge the funding from the EMBL Interdisciplinary Postdocs (EIPOD) fellowship programme under Marie Skłodowska-Curie COFUND (grant No. 291772) from the European Commission for the postdoctoral fellowship.

Received: 20.11.2019, revised: 10.12.2019, accepted: 11.12.2019.