Компьютерное моделирование аллостерических ингибиторов бета-лактамазы TEM-1

Сулимов В.Б., Ильин И.С., Сулимов А.В., Кутов Д.К., Лебедев Г.В., Рубцова М.Ю., Григоренко В.Г., Упоров И.В., Егоров А.М.

XXVII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»
Разработка и создание новых лекарственных препаратов
Сулимов Владимир Борисович: vladimir.sulimov@gmail.com

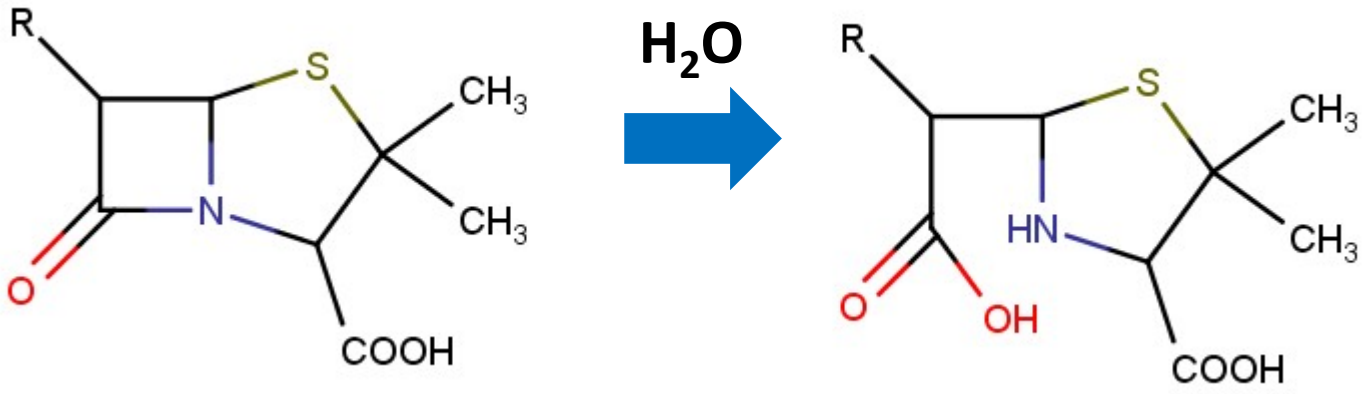
Устойчивость бактерий к антибиотикам

- ВОЗ: устойчивость к антибиотикам является сегодня одной из наиболее серьезных угроз для здоровья человечества
- Основные факторы резистентности:

1. Изменение пространственной структуры мишени
2. Модификация антибиотика (роль **бета-лактамазы**)
3. Изменение кинетики действия антибиотика

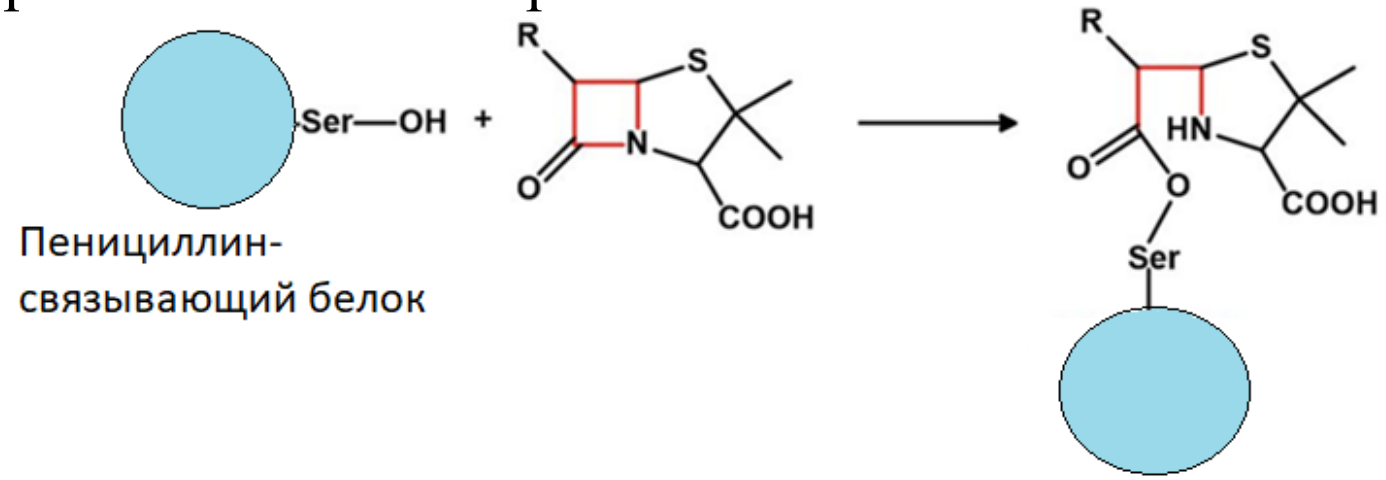
Бета-лактамазы

- Один из основных ферментов – факторов резистентности грамотрицательных бактерий
- 1300 различных β-лактамаз, делящихся на 4 класса
- Высокая скорость появления новых вариантов
- Гидролизуют амидную связь в β-лактамном кольце – центральном ядре всех β-лактамных антибиотиков:



Роль β-лактамаз в резистентности

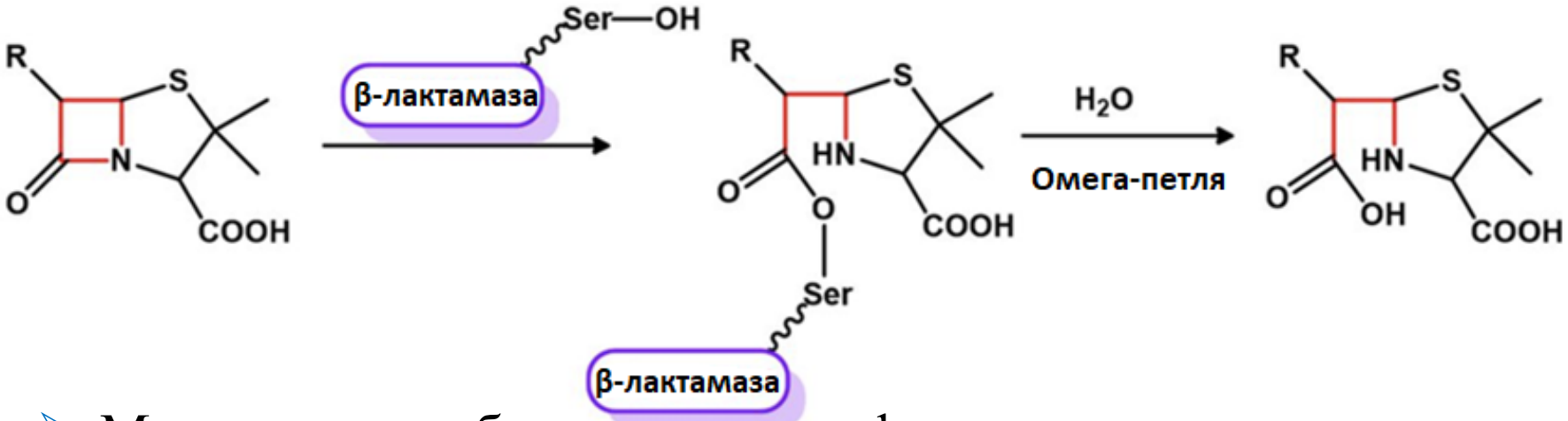
- β-лактамные антибиотики необратимо связываются с пенициллин-связывающими белками (ПСБ) бактерий, тем самым нарушают синтез клеточной стенки и блокируют размножение бактерий



- β-лактамазы имеют структурную схожесть с ПСБ и общее эволюционное происхождение. Они также способны связываться с β-лактамными антибиотиками

β-лактамазы защищают бактерии от антибиотиков

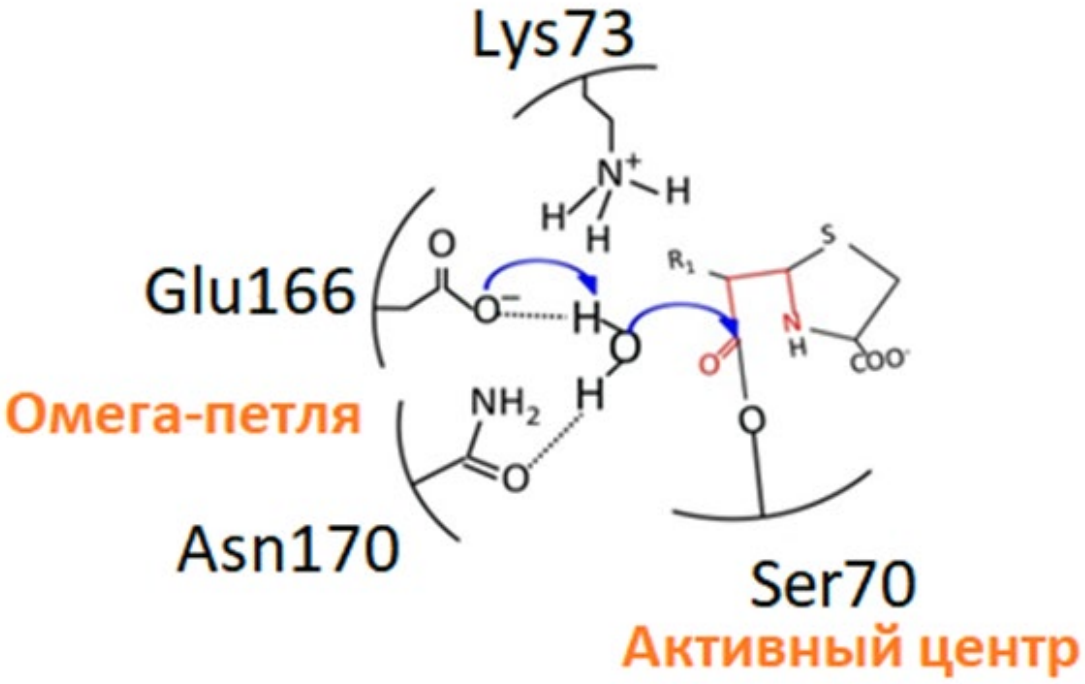
- Однако в отличие от ПСБ, β-лактамазы не участвуют в синтезе клеточной стенке. Их основная функция – разрушение антибиотиков

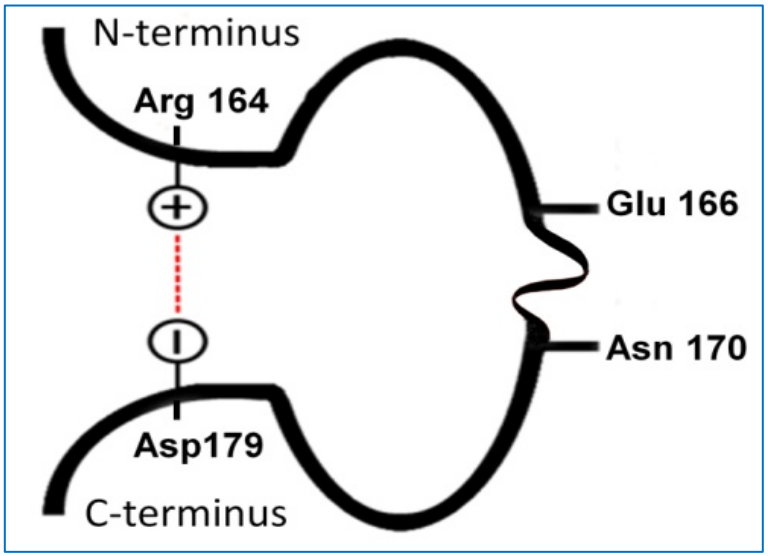


- Молекулы антибиотиков также формируют ковалентную связь с β-лактамазами, но это связывание – обратимо. За счет наличия специфических структурных элементов β-лактамазы гидролизуют и высвобождают остаток антибиотика, который становится инактивированным

Омега-петля – структурный элемент β-лактамазы

- Остатки β-лактамазы Glu166 и Asn170 участвуют в активации молекулы воды → обеспечивают процесс отщепления остатка антибиотика





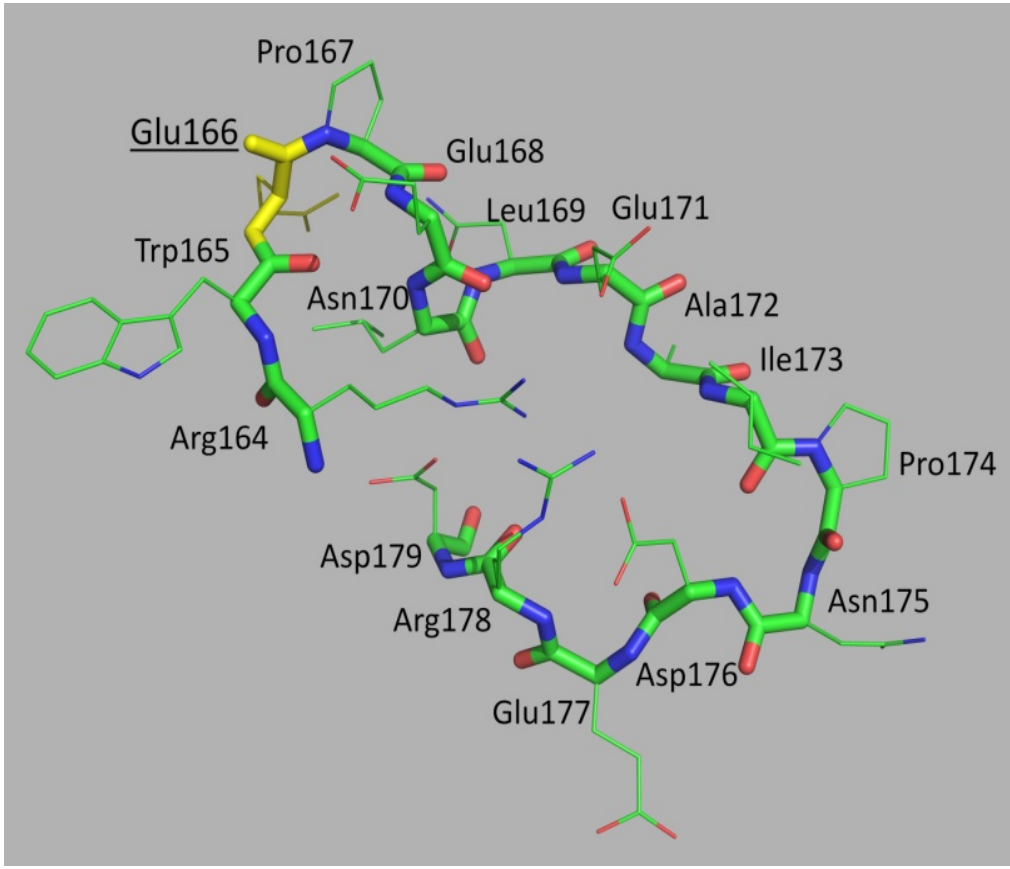
Бета-лактамазы ТЕМ-типа

- Класс А – сериновые гидролазы
- Разрушают пенициллины и цефалоспорины
- 288 аминокислотных остатков
- Значительное разнообразие мутантных форм – мутируют чаще бета-лактамаз других типов

- Исходный представитель ТЕМ-типа – бета-лактамаза ТЕМ-1

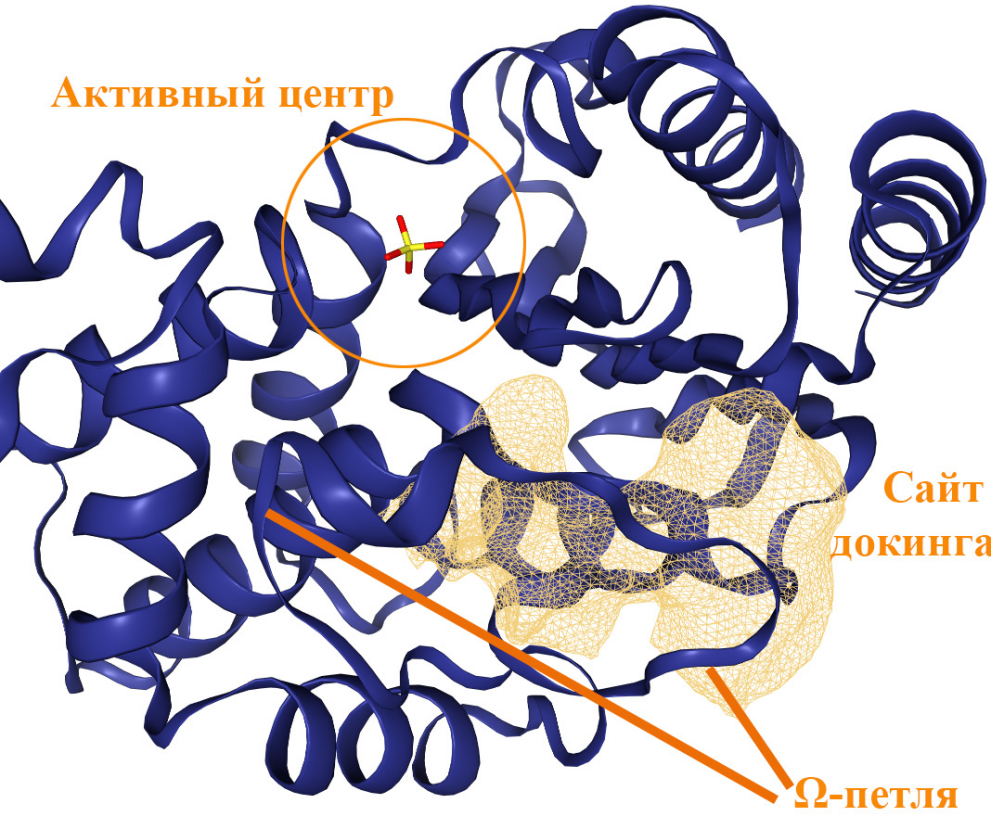
Модель ингибирования

- Аллостерическое воздействие на положение Ω-петли за счет связывания в её С-концевой части ингибитора
- Поиск лиганда, который при связывании с белком изменил бы конформацию Ω-петли, что вызвало бы смещение ключевых остатков
- Замедление стадии гидролиза – β-лактамаза остается инактивированной связанным антибиотиком



Подход

- Виртуальный скрининг на основе докинга и квантовохимического постпроцессинга
- Постпроцессинг на основе МД для лучших соединений



Докинг

↓ **Программа SOL**

Отбор по скоринг-функции
Визуальный анализ

↓ **Метод PM7/mopac**

Локальная оптимизация
Расчет *ΔH* связывания

Программа докинга SOL

- Модель жесткого белка в виде сетки потенциалов
- Потенциалы взаимодействия с пробным атомом лиганда:
  - Электростатическое взаимодействие – силовое поле MMFF94
  - Взаимодействие Ван-дер-Ваальса – силовое поле MMFF94
  - Энергия напряжения лиганда – силовое поле MMFF94
  - Энергия десольватации – обобщенная модель Борна
- Сетка потенциалов – набор сеток потенциалов, описывающих взаимодействие пробных атомов лиганда разных типов с белком
- Область докинга – куб, покрывающий активный центр белка:

  - 101 X 101 X 101 узлов

  - Ребро куба = 22 Å, шаг сетки = 0.22 Å
- Конформационный поиск на основе генетического алгоритма

Постпроцессинг

- Для соединений с лучшими значениями скоринг-функции
- Локальная оптимизация лучшей позы из программы SOL
- Расчет энтальпии связывания:

$$\Delta H_{bind} = \Delta H_{PL} - (\Delta H_P + \Delta H_L)$$

где

ΔH_{PL} – *энтальпия образования комплекса белок-лиганд, рассчитанная 1SCF+COSMO с предварительной оптимизацией положения лиганда по всем атомам методом PM7;*

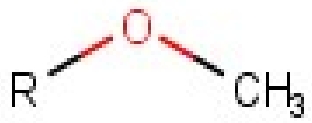
ΔH_L – *энтальпия образования свободного лиганда (1SCF+COSMO) с предварительной оптимизацией незадоченного положения методом PM7;*

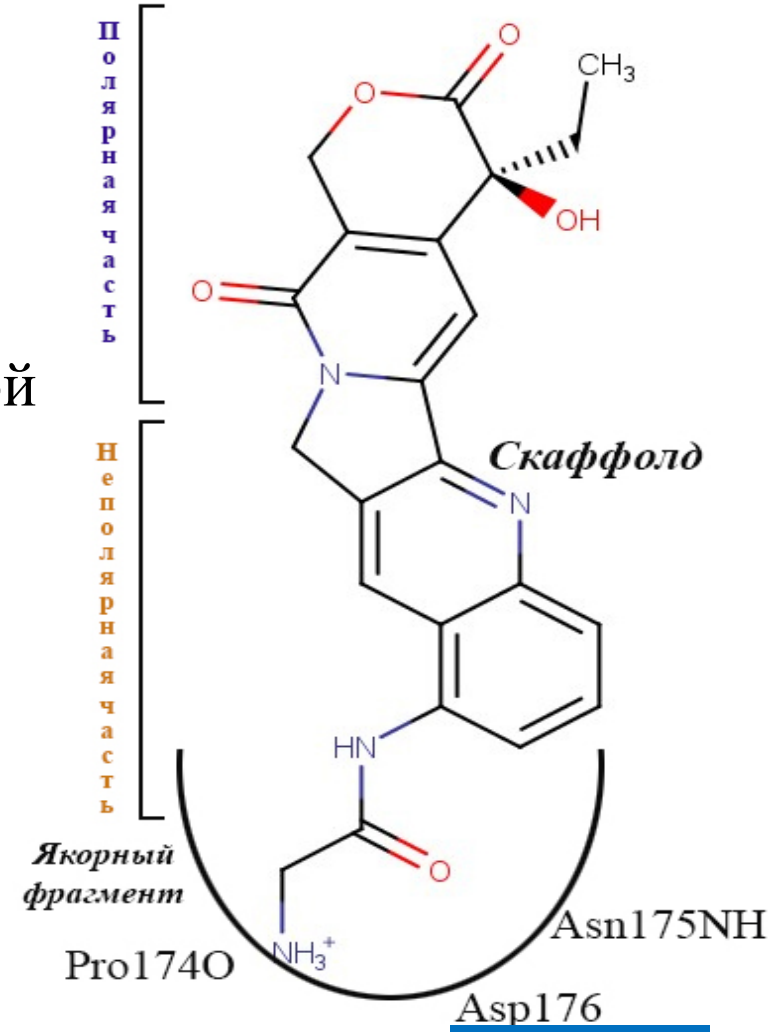
ΔH_P – *энтальпия образования свободного белка, рассчитанная 1SCF+COSMO без предварительной оптимизации*

Результаты

1) Предварительный скрининг NCI Diversity показал, что в выбранном аллостерическом сайте могут связываться лиганды с вытянутым концевым фрагментом (определенной якорной группой)

2) Скрининг ВГУ позволил обнаружить 10 потенциальных лигандов, содержащих в качестве якорного фрагмента метокси-группу

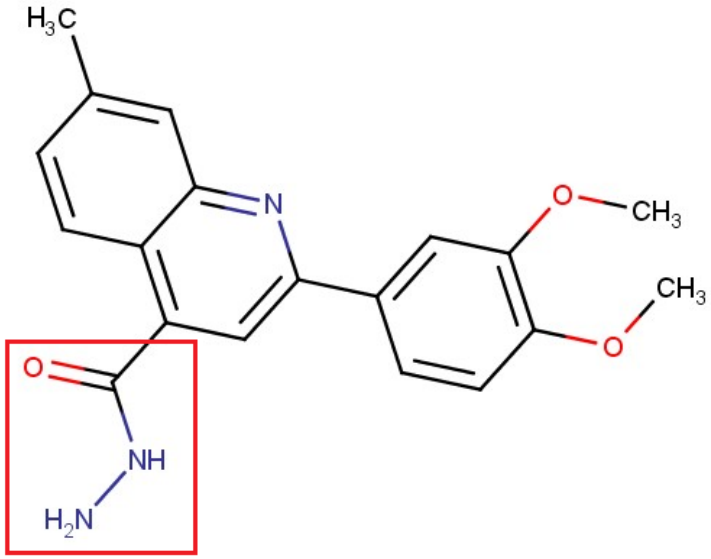




Результаты скрининга базы MayBridge: HitFinder и HitDiscover

3) Скрининг библиотеки **HitFinder** (14 000 соединений) привел к идентификации новой якорной группы – гидразидного фрагмента

4) Поиск по подструктуре в библиотеке **HitDiscover** (53 000 соединений) обнаружил 239 молекул с концевой гидразидной группой



Химический профиль гидразидной группы:

- Отсутствие заряда
- 3 донора водородной связи
- 1 акцептор водородной связи

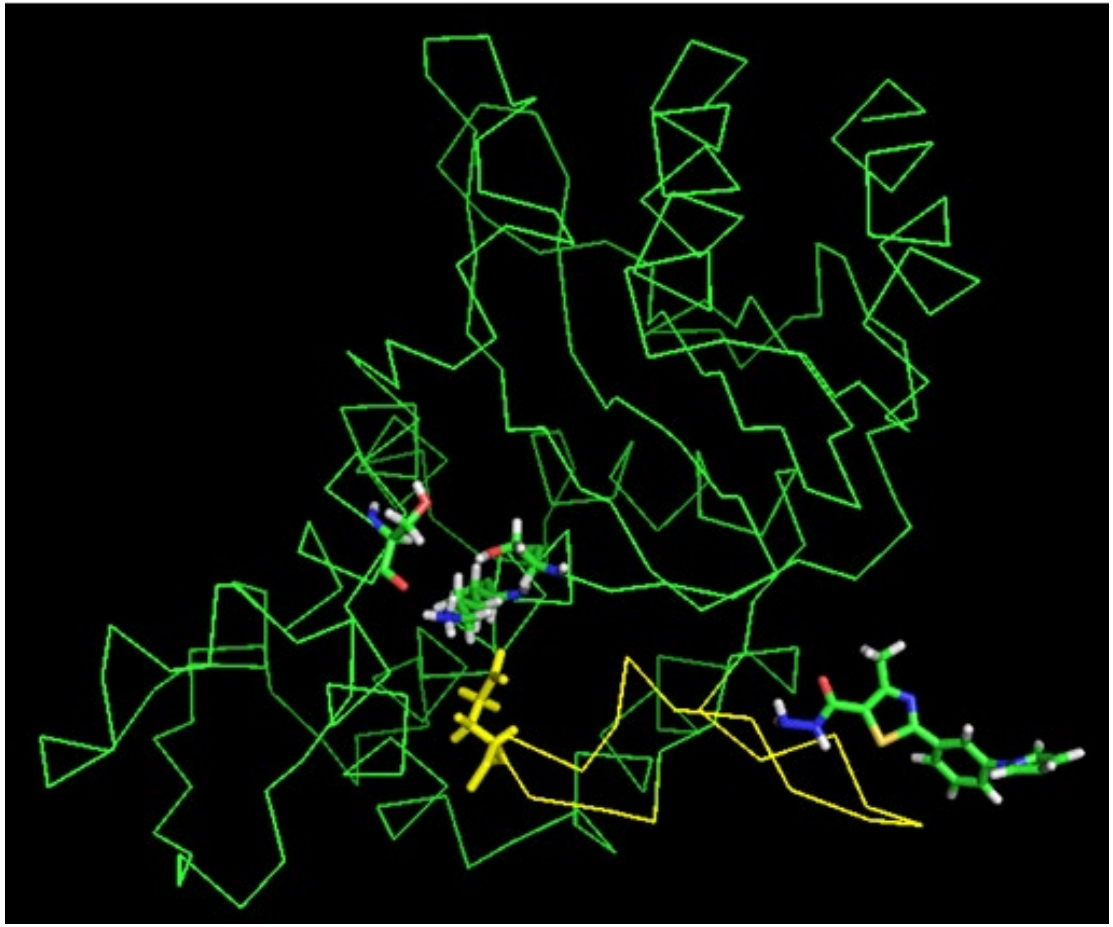
Результаты

5) Молекулярное моделирование показало, что три соединения из 239 гидразид-содержащих молекул библиотеки HitFinder являются потенциальными ингибиторами TEM-1

Код из базы HitDiscover	Скоринг-функция в SOL, ккал/моль	Энтальпия связывания в MOPAC, ккал/моль
HTS12665	-4.95	-50.09
JA00127	-5.61	-62.05
SPB02296	-4.77	-50.92

6) Молекулярно динамическое (МД) компьютерное исследование выявило, что SPB02296 способно отодвигать Ω-петлю белка TEM-1

Компьютерная молекулярная динамика



AMBER16, Длина траектории – 20 нс

1) HTS12665

ΔG (MM-GBSA) = -17.2 ккал/моль

Не изменило задоченного положения за 20 нс

2) JA00127

ΔG (MM-GBSA) = -25.8 ккал/моль

Не изменило задоченного положения за 20 нс

3) SPB02296

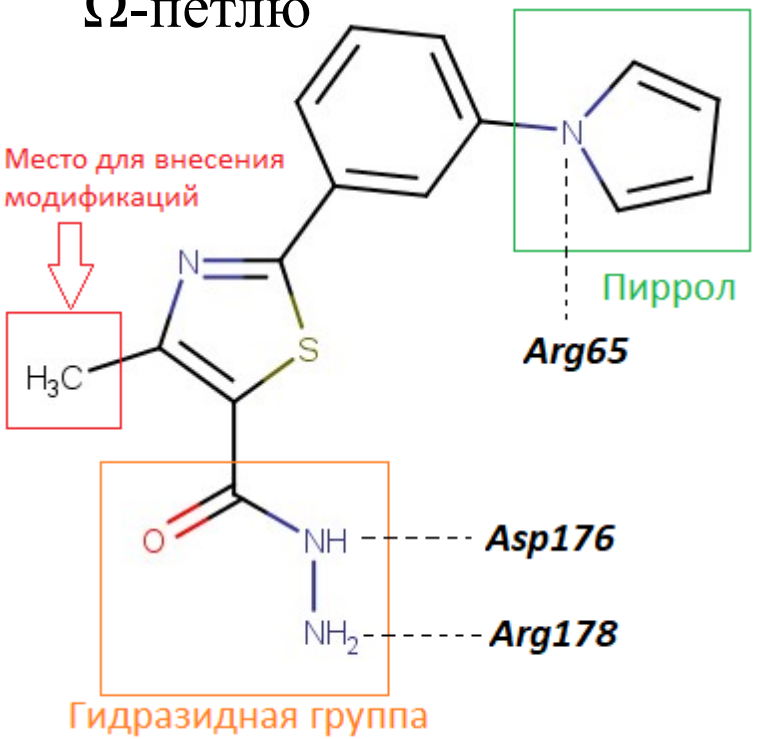
ΔG (MM-GBSA) = -18.2 ккал/моль

К концу 10 нс омега-петля сдвинулась и осталась в такой конформации

Положение Glu166 не изменилось

Результаты

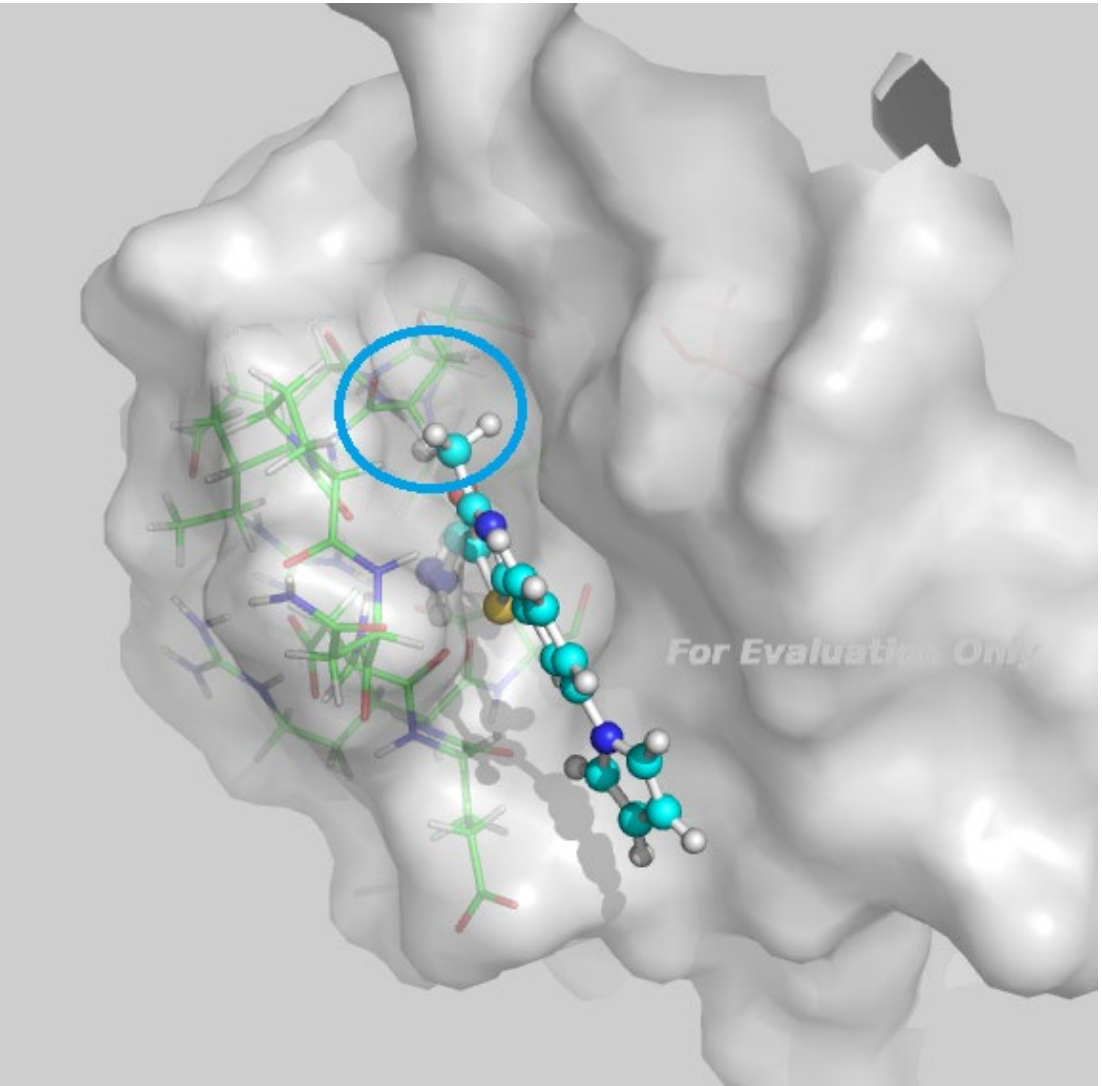
7) Был предпринят дизайн виртуальных производных соединения SPB02296, которые бы обладали более высоким сродством с белком TEM-1 по сравнению с исходной молекулой SPB02296 имели бы более выраженную способность сдвигать Ω-петлю



Отбор улучшенных производных – на основе того же протокола моделирования, что использовался для виртуального скрининга.
Критерии отбора:

- Скоринг-функция < -4.77 ккал/моль
- Энтальпия связывания < -50.9 ккал/моль
- Воспроизведение положения гидразидной группы, наблюдаемого для SPB02296

Цель оптимизации



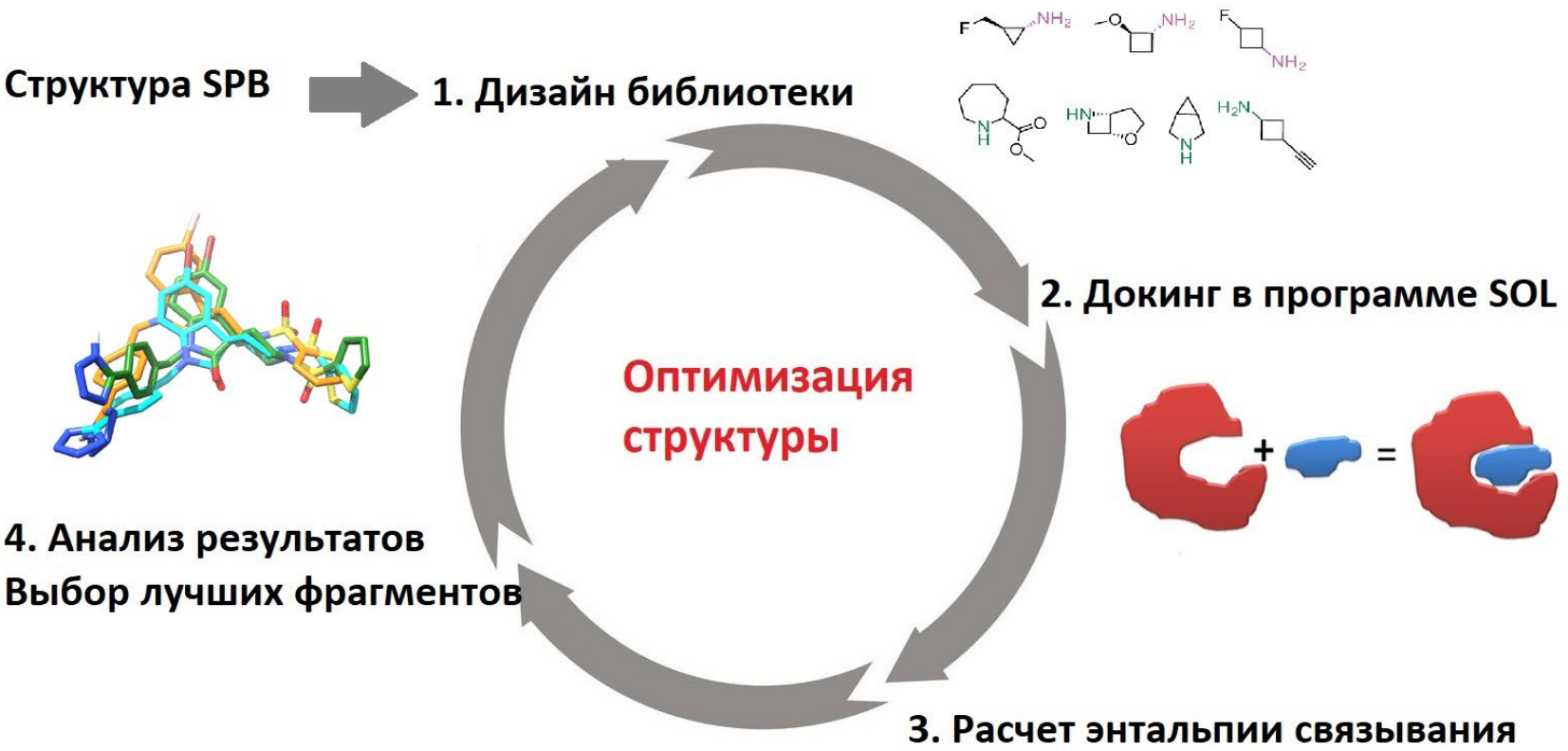
Удлинение молекулы в районе метильной группы в сторону Glu166

Профиль вводимых групп:

- незаряженные мотивы
- наличие доноров/акцепторов водородной связи
- малый размер

Подход оптимизации

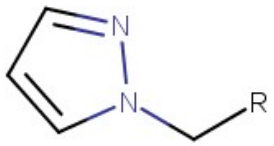
- Итеративная оптимизация:



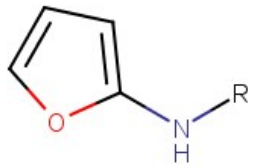
$$\Delta H_{bind} = \Delta H_{PL} - (\Delta H_P + \Delta H_L)$$

Первая итерация

Условный номер	Скоринг-функция в SOL, ккал/моль	Энтальпия связывания в MOPAC, ккал/моль
Исходная молекула SPB	-4.77	-50.9
1	-4.49	-55.91
2	-4.79	-54.47
3	-5.00	-50.26
4	-4.25	–
5	-5.55	-59.33
6	-4.40	–
7	-5.35	-63.35
8	-4.35	–
Sc1	-5.06	-54.83
Sc2	-4.97	-52.10



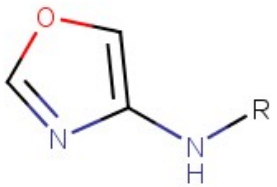
5



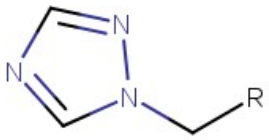
7

Вторая итерация

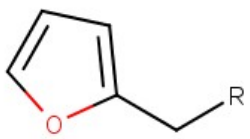
Условный номер	Скоринг-функция в SOL, ккал/моль	Энтальпия связывания в MOPAC, ккал/моль
Исходная молекула	-4.77	-50.9
9	-5.29	-53.496
10	-5.57	-50.371
11	-5.50	-53.606
12	-5.03	–
13	-5.50	-59.327
14	-4.35	–
15	-5.30	-60.843
16	-4.67	-50.869
17	-5.48	-59.337
18	-5.31	-53.138
Sc2_2	-5.38	-60.791
Sc2_3	-5.04	-58.952



13



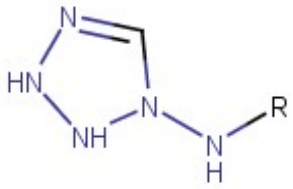
15



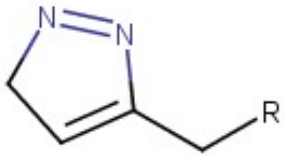
17

Третья итерация

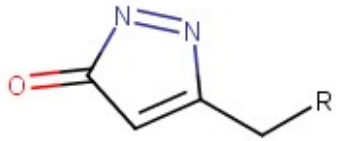
Условный номер	Скоринг-функция в SOL, ккал/моль	Энтальпия связывания в MOPAC, ккал/моль
Исходная молекула	-4.77	-50.9
10Cl	-6.07	-51.021
10e1	-5.03	-56.884
10e2	-5.90	-54.759
10N	-5.34	-54.506
15iso	-5.33	-53.210
19	-5.09	-64.805
20	-4.97	-55.651
21	-5.31	-58.453
22	-5.08	-62.630



19



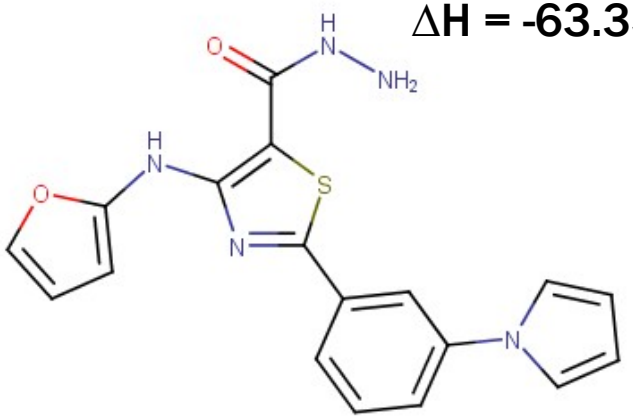
21



22

Лучшие производные

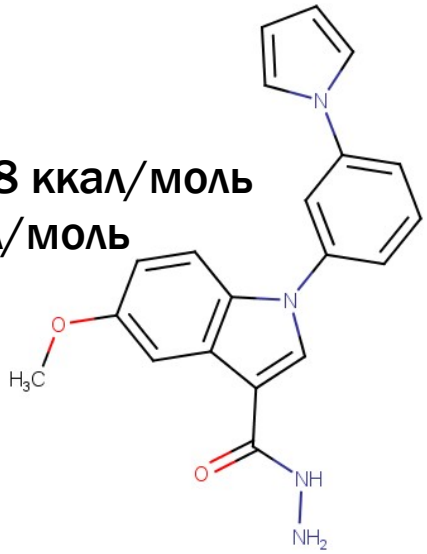
SOL Score = -5.35 ккал/моль
ΔH = -63.35 ккал/моль



7

Не смещает петлю в МД расчетах

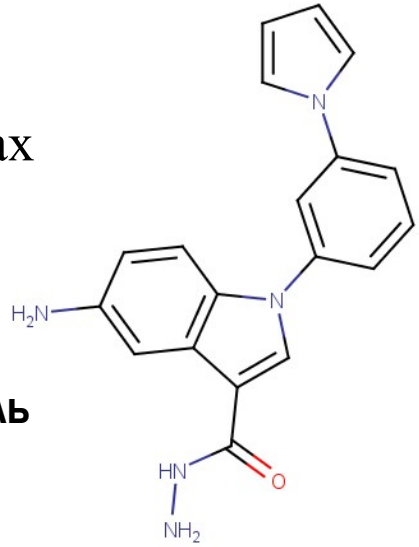
SOL Score = -5.38 ккал/моль
ΔH = -60.79 ккал/моль



Sc2_2

Показало способность влиять на Ω-петлю в МД расчетах

SOL Score = -5.04 ккал/моль
ΔH = -58.95 ккал/моль



Sc2_3

Не смещает петлю в МД расчетах

Спасибо за внимание

… Surely every medicine is an innovation; and he that will not apply new remedies, must expect new evils …

...Каждый медицинский метод есть инновация; а кто не хочет применять новые средства, должен ждать новых бед ...

Francis Bacon (1561-1626)
OF INNOVATIONS