

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Гущина Ирина Владимировна**

**Разработка сульфозамещенных ингибиторов  
транскетолазы и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1  
с использованием методов биоинформатики  
и молекулярного моделирования**

Специальность 03.01.08 – Биоинженерия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на факультете биоинженерии и биоинформатики и в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Научные руководители:** ***Нилов Дмитрий Константинович,***  
кандидат химических наук, старший научный  
сотрудник НИИ физико-химической биологии  
имени А.Н. Белозерского  
МГУ имени М.В. Ломоносова

***Швядас Витаутас-Юозапас Каятоно,***  
доктор химических наук, профессор  
факультета биоинженерии и биоинформатики  
МГУ имени М.В. Ломоносова

**Официальные оппоненты:** ***Ходырева Светлана Николаевна,***  
доктор биологических наук, ведущий научный  
сотрудник Института химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН

***Шайтан Константин Вольдемарович,***  
доктор физико-математических наук, профессор  
кафедры биоинженерии биологического факультета  
МГУ имени М.В. Ломоносова

***Щербинин Дмитрий Сергеевич,***  
кандидат биологических наук, старший научный  
сотрудник Института трансляционной медицины  
РНИМУ имени Н.И. Пирогова

Защита диссертации состоится 30 июня 2021 года в 16:30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.  
E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/344127172/>

Автореферат разослан «\_\_\_» мая 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Шаповалова И.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Сульфонаты являются перспективным классом соединений для дизайна низкомолекулярных ингибиторов ферментов. Сульфозаместитель можно рассматривать в качестве изотерического аналога фосфатной группы, входящей в состав различных природных субстратов и коферментов. В базе данных Protein Data Bank представлены структуры уже более ста фермент-ингибиторных комплексов с сульфонатами, большая часть которых была получена недавно. В рамках представленной работы была исследована возможность создания эффективных сульфозамещенных ингибиторов, действующих в отношении двух терапевтически важных мишеней: транскетолазы *Mycobacterium tuberculosis* (ТК) и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека (ТДФ1).

ТК – ключевой фермент пентозофосфатного пути метаболизма углеводов у бактерий, его важность для жизнедеятельности возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis* была доказана путем подавления экспрессии. Несмотря на то, что ингибирование ТК представляет большой интерес для терапии туберкулеза, бактериальный фермент изучен слабо по сравнению с гомологичными белками дрожжей и человека. К настоящему времени для подавления его активности не было предложено ни одного ингибитора.

ТДФ1 – фермент репарации ДНК и перспективная мишень для лечения онкологических заболеваний. Ингибирование ферментов репарации, таких как ТДФ1, способно усиливать эффект ДНК-повреждающих химиотерапевтических препаратов и способствовать преодолению лекарственной устойчивости. Несмотря на обширные исследования в этой области, существующие ингибиторы ТДФ1 пока не удовлетворяют требованиям клинического применения, и необходим поиск новых эффективных и безопасных соединений.

Кофермент ТК (тиаминдифосфат) и субстрат ТДФ1 содержат фосфатные группы, которые образуют ключевые водородные связи с активным центром.

Данные взаимодействия гипотетически могут быть реализованы сульфогруппой в составе конкурентного ингибитора.

### **Степень разработанности темы исследования**

Наиболее подробно строение и механизм ТК исследованы для фермента из дрожжей, являющегося удобным модельным объектом, в то время как свойства ТК из *M. tuberculosis* на данный момент малоизучены, а ее единственная кристаллическая структура была получена в 2012 году. В литературе не описано ни одного ингибитора ТК из *M. tuberculosis*, однако известен ряд ингибиторов ТК человека (например, окситиамин). Вопросы селективности ингибиторов ТК в отношении различных организмов проработаны весьма слабо.

Для ТДФ1 человека получен набор кристаллических структур, что позволило подробно изучить каталитический механизм. Наиболее сильные ингибиторы ванадат- и вольфрамат-ионы токсичны для клеток и использовались в целях рентгеноструктурного анализа. Несколько классов ингибиторов ТДФ1 было обнаружено путем *in vitro* скрининга (например, производные усниновой кислоты), однако соответствующие структуры фермент-ингибиторных комплексов неизвестны, и не вполне понятна природа взаимодействий соединений с остатками активного центра.

### **Цель и задачи работы**

Целью проведенного исследования была разработка новых сульфозамещенных ингибиторов ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека, являющихся важными мишенями в терапии социально значимых заболеваний. Для этого был осуществлен компьютерный скрининг с использованием методов биоинформатики, молекулярного моделирования и алгоритмов структурной фильтрации. Для достижения данной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. На основе кристаллических структур построить молекулярные модели ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека, предназначенные для компьютерного

поиска ингибиторов.

2. Провести биоинформатический анализ ТК из разных организмов для выявления структурных особенностей активного центра, важных для поиска селективных ингибиторов ТК *M. tuberculosis*.
3. Проанализировать строение фермент-субстратного комплекса ТДФ1 для выявления участков связывания в активном центре, важных для поиска новых ингибиторов.
4. Разработать структурные критерии для отбора эффективных ингибиторов ТК и ТДФ1 в ходе компьютерного скрининга, а также необходимое для структурной фильтрации программное обеспечение.
5. Сконструировать библиотеки сульфозамещенных низкомолекулярных соединений и осуществить их компьютерный скрининг для отбора перспективных ингибиторов ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека.

### **Объект и предмет исследования**

Объектами исследования являлись белки ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека – важные мишени для терапии социально значимых заболеваний. Предметом исследования явилась способность белков-мишеней образовывать специфическое взаимодействие с низкомолекулярными сульфозамещенными соединениями, приводящее к подавлению ферментативной активности.

### **Научная новизна**

В ходе выполнения работы разработан уникальный алгоритм структурной фильтрации позиций, полученных методом докинга, для идентификации новых эффективных ингибиторов ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека. Выявлены структурные особенности активного центра ТК *M. tuberculosis*, важные для дизайна селективных ингибиторов; идентифицированы первые ингибиторы бактериального фермента из класса сульфонатов. Установлены участки активного центра ТДФ1 человека, наиболее важные для взаимодействия с

субстратом и ингибиторами; идентифицированы новые сульфозамещенные ингибиторы, связывающиеся на данных участках.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Установленные в результате работы особенности строения активных центров ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека позволяют лучше понять механизм взаимодействия данных белков с субстратами и ингибиторами. Поскольку ТК является перспективной мишенью в терапии туберкулеза, а ТДФ1 – в противоопухолевой терапии, предпринятая разработка ингибиторов будет способствовать появлению новых лекарственных средств борьбы с данными социально значимыми заболеваниями.

### **Методология и методы исследования**

Построение молекулярных моделей белков ТК и ТДФ1 для скрининга осуществляли на основе кристаллических структур в пакетах AmberTools и Amber (<https://ambermd.org>). Компьютерный скрининг ингибиторов осуществляли с использованием пакета ACD Labs ([www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com)), программы для докинга Lead Finder ([www.moltech.ru](http://www.moltech.ru)), а также с помощью web-сервера структурной фильтрации vsFilt (<https://biokinet3.belozersky.msu.ru/vsfilt>), разработанного автором для решения задач работы. Алгоритм vsFilt детектирует различные типы взаимодействий между тестируемой молекулой и белком-мишенью в смоделированном комплексе (водородные связи, ионные взаимодействия и др.) и позволяет отбирать лекарствовподобные соединения, способные к наиболее эффективному и специфическому связыванию. Экспериментальное исследование активности ингибиторов, предсказанных автором, осуществлялось в отношении очищенных белков в НИИ физико-химической биологии имени Белозерского МГУ и Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также в отношении штамма микобактерий в Центральном научно-исследовательском институте туберкулеза.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. В активном центре ТК *M. tuberculosis* идентифицирован гидрофобный кластер Ile211-Leu402-Phe464, отсутствующий в ТК человека, что обуславливает возможность разработки селективных ингибиторов.
2. Активный центр ТДФ1 содержит два обособленных участка, важных для связывания субстрата и ингибиторов: участок фосфотирозина и участок олигонуклеотида.
3. С помощью компьютерного скрининга и структурной фильтрации обнаружены ингибиторы ТК *M. tuberculosis*, содержащие сульфогруппу в качестве структурного аналога пиррофосфатной группы кофермента.
4. С помощью компьютерного скрининга и структурной фильтрации выявлены новые ингибиторы ТДФ1 человека, содержащие сульфогруппу в качестве аналога фосфатной группы субстрата.

## **Степень достоверности**

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных методик моделирования и компьютерного скрининга, а также публикацией результатов в рецензируемых научных журналах международного уровня.

## **Личный вклад автора в проведение исследования**

Основные результаты работы получены самим автором. Личный вклад заключается в следующем: анализ литературных данных, планирование и проведение компьютерных экспериментов, анализ полученных данных, представление результатов на конференциях, подготовка научных публикаций. Экспериментальное подтверждение активности предсказанных автором ингибиторов, дополняющее расчетные работы, было осуществлено специалистами НИИ физико-химической биологии имени Белозерского МГУ, Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и

Центрального научно-исследовательского института туберкулёза.

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базе данных WoS (в том числе 3 статьи в высокорейтинговых журналах квартиля Q1). Кроме того, получен патент на изобретение.

## **Апробация работы**

Часть материалов диссертации была защищена в 2019 году в рамках НКР, подготовленной во время обучения в аспирантуре факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты работы были представлены на международных конференциях: «Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB)» (Москва, 2015), «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS)» (Новосибирск, 2016), «Biocatalysis-2017: Fundamentals & Applications» (Истра, 2017), Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни (BIOTECH WORLD)» (Москва, 2018), 43-ий Конгресс FEBS (Прага, 2018), конференция «Chemical Biology» (Хайдельберг, 2018), IV Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике «МОБИ-ХимФарма» (Новый Свет, 2018), 4-ая Российская конференция по медицинской химии «МедХим-2019» (Екатеринбург, 2019), XXVI Симпозиум «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств» (Москва, 2020).

## **Структура и объем диссертации**

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 152 ссылки. Работа изложена на 110 страницах текста, содержит 15 таблиц и 34 рисунка.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Список сокращений

ТДФ1 – тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1; ТК – транскетолаза; КМ – квантово-механический; ММ – молекулярно-механический;  $\Delta G^{\text{calc}}$  – расчетная свободная энергия связывания;  $IC_{50}$  – концентрация ингибитора, уменьшающая активность фермента на 50%; Top1 – топоизомераза 1.

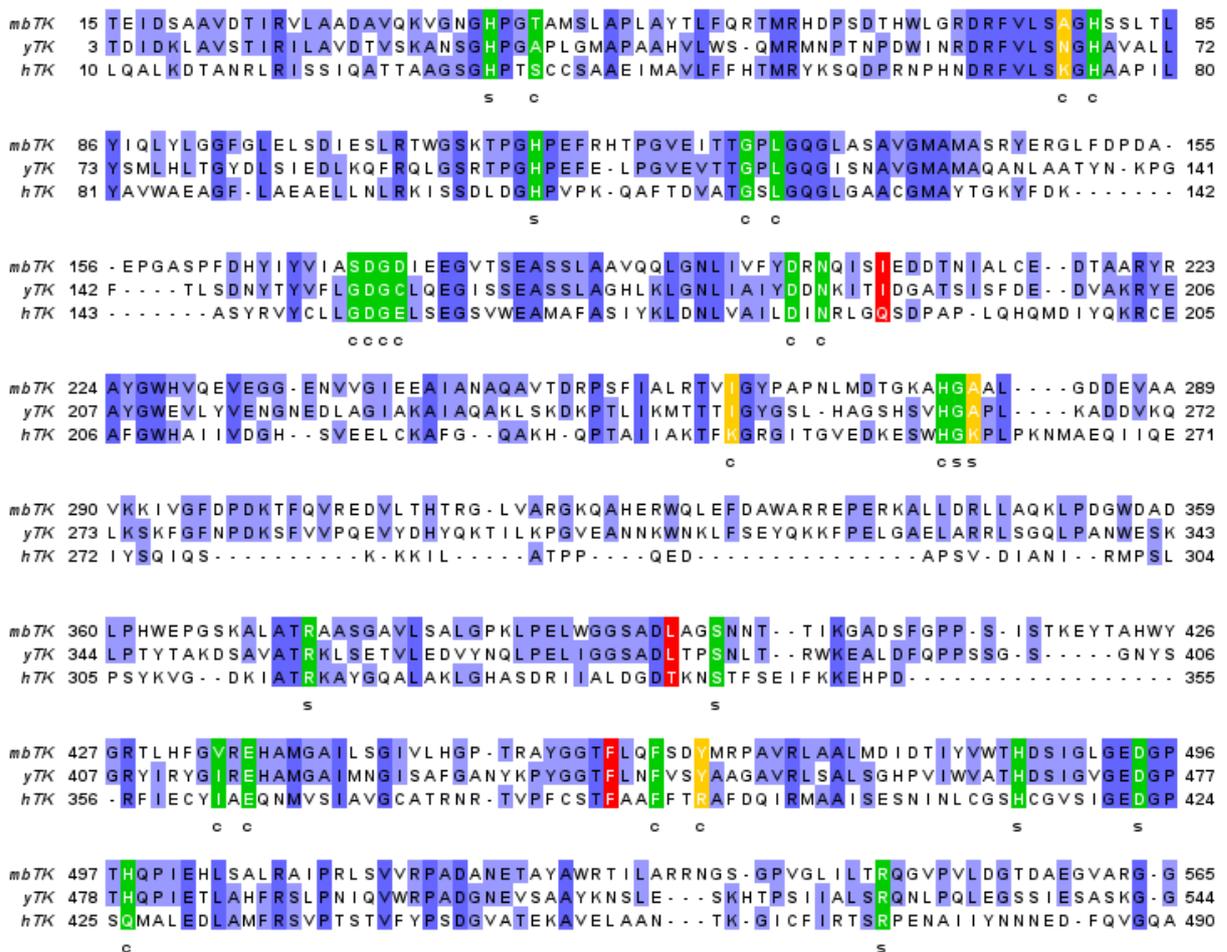
### Разработка ингибиторов транскетолазы

ТК катализирует двухстадийную реакцию переноса двухуглеродного фрагмента с кетосахаров (субстратов-доноров) на альдозы (субстраты-акцепторы) в пентозофосфатном пути метаболизма углеводов. Важность активности ТК для жизнедеятельности *M. tuberculosis* была продемонстрирована путем подавления экспрессии; данный фермент является перспективной мишенью для разработки новых лекарств против туберкулеза. В активном центре ТК располагается кофермент тиаминдифосфат и ион магния, в координировании которого принимает участие пирофосфатная группа кофермента. В ходе диссертационной работы была предпринята разработка ингибиторов ТК *M. tuberculosis*, содержащих сульфогруппу – структурный миметик пирофосфата, способную участвовать в координации магния и вступать во взаимодействия с донорами водородных связей в активном центре.

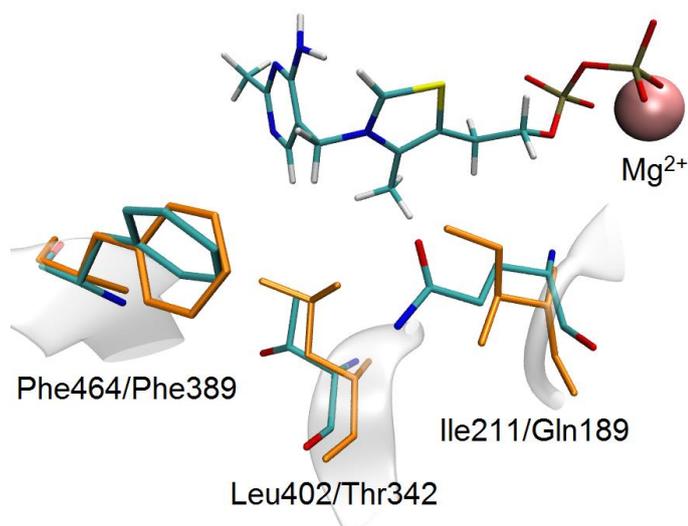
### Молекулярное моделирование и биоинформатический анализ транскетолаз

В результате пространственного наложения доступных структур ТК, а также построения структурно-опосредованного выравнивания последовательностей ТК микобактерий, дрожжей и человека были изучены остатки активного центра, взаимодействующие с коферментом тиаминдифосфатом и субстратом. Было установлено, что большинство из этих остатков консервативны по структуре или по функции во всех трех организмах (рис. 1). Несколько неконсервативных остатков формируют дополнительные взаимодействия с тиаминдифосфатом в ТК человека, что может обуславливать повышенное сродство к коферменту.

Важной особенностью структурной организации ТК из разных организмов оказалось наличие кластера из трех гидрофобных остатков (Phe-Leu-Phe) на границе участков связывания кофермента и субстрата в ТК дрожжей и бактерий, который отсутствует у ТК человека. Остатки Phe211 и Leu402 *M. tuberculosis* заменены на полярные остатки Gln189 и Thr342 в ТК человека. Остаток Phe464/442/389 (бактерия/дрожжи/человек) консервативен, однако структурное наложение выявило поворот плоскости бензольного кольца в ТК человека по сравнению с бактериальным ферментом (рис. 2).



**Рис. 1.** Выравнивание последовательностей ТК микобактерий (*M. tuberculosis*), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) и человека. Позиции остатков активного центра, взаимодействующих с коферментом (с) или субстратом (s) выделены зеленым (остатки, консервативные по структуре или функции) или желтым (неконсервативные остатки). Красным выделены позиции остатков гидрофобного кластера, характерного для *M. tuberculosis* и *S. cerevisiae*.



**Рис. 2.** Кластер гидрофобных остатков Ile211-Leu402-Phe464 на границе участков связывания кофермента и субстрата, характерный для ТК *M. tuberculosis*, но отсутствующий у человека. Остатки бактериальной ТК показаны оранжевым цветом, а ТК человека – раскрашены по типам атомов. Также показаны кофермент тиаминдифосфат и ион магния.

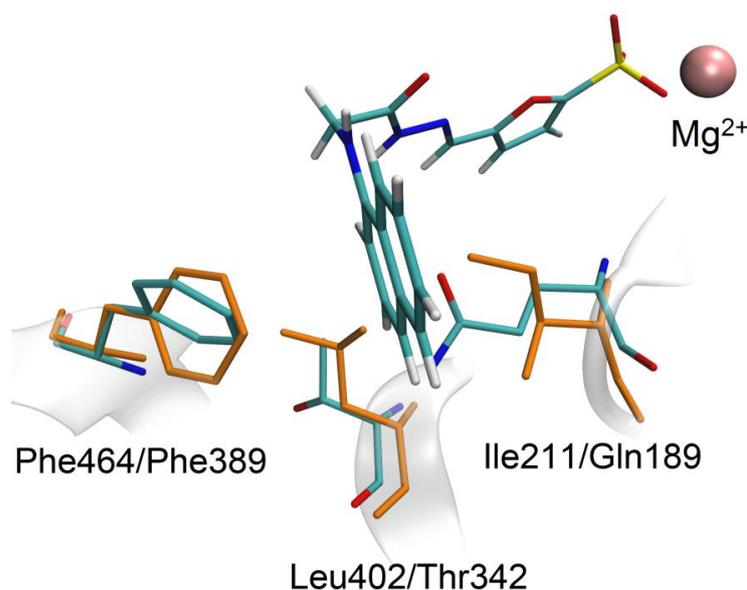
### Первичный скрининг ингибиторов транскетолазы

Для поиска ингибиторов использовали молекулярную модель ТК *M. tuberculosis*, сконструированную на основе кристаллической структуры 3rim. Для скрининга был выбран участок связывания кофермента тиаминдифосфата в активном центре ТК. Набор соединений для скрининга был сконструирован на основе коммерческой библиотеки Vitas-M (<https://vitasmlab.biz>). Библиотеку отфильтровали по правилу Липинского, после чего извлекли соединения, содержащие сульфогруппу (всего 320 веществ).

После докинга соединений в активный центр ТК осуществили структурную фильтрацию полученных позиций с помощью разработанной автором программы vsFilt. В качестве структурного критерия было выбрано взаимодействие сульфогруппы с ионом магния и водородные связи с остатками His85 и His283, участвующими в связывании пирофосфатной группы кофермента. Таким образом, отрицательно заряженная сульфогруппа рассматривалась в качестве миметика пирофосфата. В результате для экспериментальной проверки отобрали

несколько соединений, образующих наиболее выгодные взаимодействия. Исследование ингибиторной активности было осуществлено в отделе биокинетики НИИ ФХБ им. Белозерского с использованием модельного фермента из *S. cerevisiae*.

Наибольшую ингибиторную активность показало вещество STK045765. В данном соединении заряженная (фурансульфонатная) и гидрофобная группы соединены посредством линкера. Анализ модельной позиции STK045765, представленной на рис. 3, показал, что гидрофобная группа образует взаимодействие с кластером Ile211-Leu402-Phe464 на границе участков связывания кофермента и субстрата. Докинг в модель белка человека показал, что STK045765 занимает одинаковую позицию в активном центре ТК бактерии и человека. Однако в связи с аминокислотными заменами в белке человека утрачивается эффективное взаимодействие с гидрофобным кластером (в частности, остаток Gln189 обращен к ингибитору полярной группой). Таким образом, взаимодействие с кластером Ile211-Leu402-Phe464 в ТК *M. tuberculosis* не только повышает эффективность ингибирования, но и способно обуславливать селективность к бактериальному ферменту.



**Рис. 3.** Предсказанная позиция ингибитора STK045765 в активном центре ТК микобактерий и человека. Остатки ТК *M. tuberculosis* показаны оранжевым цветом, а ТК человека – раскрашены по типам атомов.

## Вторичный скрининг ингибиторов транскетолазы

Для проведения вторичного скрининга из библиотеки Vitas-M были извлечены аналоги STK045765 с различными вариантами гидрофобной части (всего 64 соединения) После их докинга в модель бактериальной ТК была проведена визуальная оценка наличия оптимального взаимодействия гидрофобной группы с остатками Pe211-Leu402-Phe464. В результате было отобрано несколько новых соединений, большинство из которых показало активность в отношении дрожжевого фермента. Это способствовало разработке более сложной экспериментальной системы на основе бактериальной ТК в НИИ ФХБ им. Белозерского.

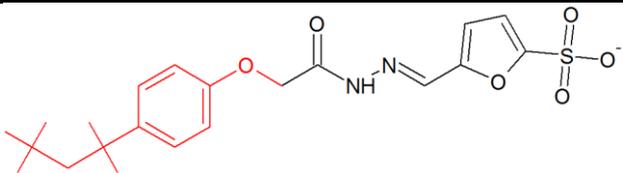
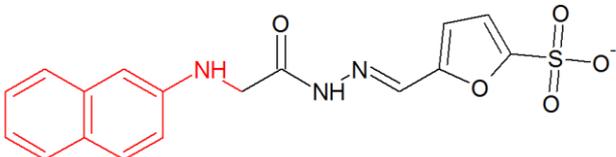
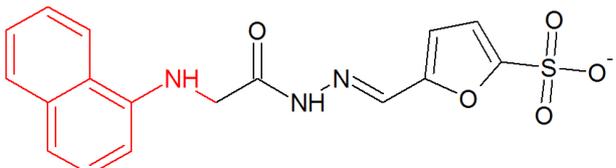
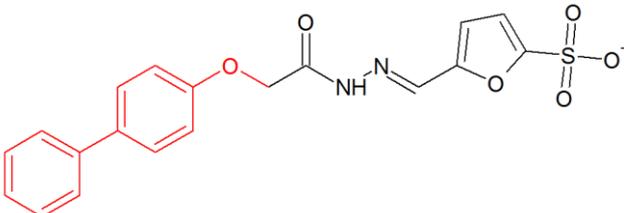
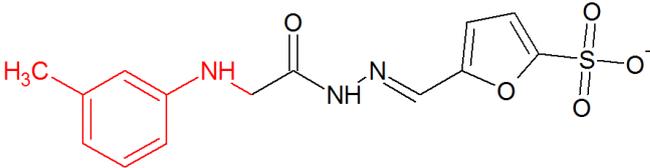
Экспериментальная проверка в отношении очищенного фермента из *M. tuberculosis* показала, что наиболее эффективным ингибитором является соединение STK106769, которое в концентрации 150 мкМ полностью подавляет ферментативную активность (табл. 1). Значение  $IC_{50}$  для данного ингибитора составило 7 мкМ. Наличие разветвленного заместителя  $-CH(CH_3)_2-CH_2Bu^t$  в структуре этого соединения обеспечивает эффективное связывания на участке Pe211-Leu402-Phe464 (рис. 4).

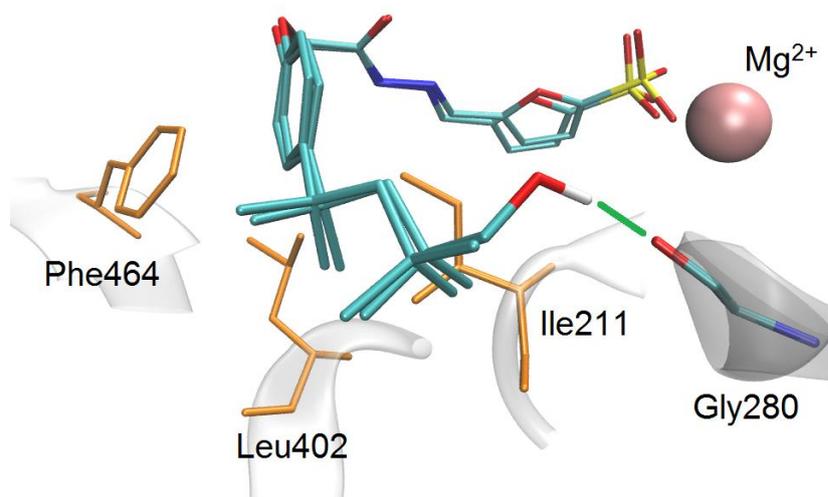
В ЦНИИ туберкулеза была исследована противотуберкулезная активность STK106769, STK394513 и STK045765 в отношении штамма H37Rv. Подавление роста *M. tuberculosis* в присутствии ингибитора в концентрации 5 мМ составило 92, 97 и 97% соответственно; по результатам исследований был получен патент.

Гидрофобная группа STK106769 обеспечивает селективность действия в отношении ТК *M. tuberculosis*, однако в то же время существенно ограничивает растворимость. Для исследования возможности улучшения растворимости осуществили моделирование соединений на основе структуры STK106769 путем присоединения гидрофильных заместителей к группе  $-CH(CH_3)_2-CH_2Bu^t$ , ориентированной в сторону растворителя (всего 26 соединений с дополнительными гидроксильными или аминогруппами). Докинг показал, что внесенные модификации не влияют на положение базовой структуры

ингибитора, а в некоторых случаях образуются дополнительные водородные связи с остатками на выходе из активного центра (рис. 4). Таким образом, предложенный путь оптимизации ингибиторов ТК может являться перспективным способом повышения их растворимости без снижения эффективности связывания.

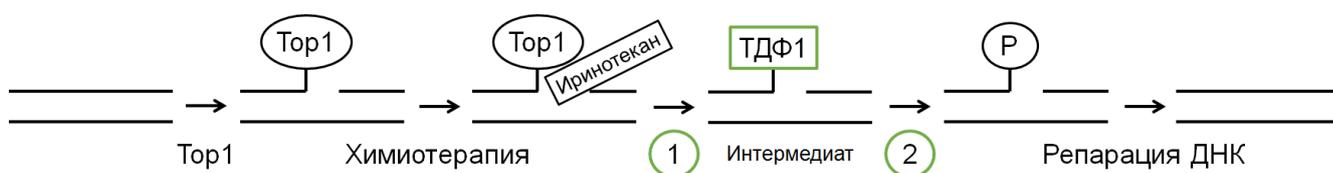
**Табл. 1.** Сульфозамещенные соединения, обнаруженные в результате скрининга и проявившие наибольший ингибиторный эффект в отношении очищенной ТК из *M. tuberculosis*. <sup>1</sup>Концентрация ингибитора – 150 мкМ.

ID	Структура	$\Delta G^{\text{calc}}$ , ккал/ моль	% ингиби- рования <sup>1</sup>
STK106769		-10,2	100
STK394513		-7,8	41
STK045765		-6,9	29
STK105664		-9,6	26
STK028127		-8,0	16



**Рис. 4.** Предсказанная позиция соединения STK106769 и его гидроксильного производного в активном центре ТК *M. tuberculosis*. Гидрофобный кластер Ile211-Leu402-Phe464 показан оранжевым цветом, зеленым показана дополнительная водородная связь солюбилизирующего заместителя.

### Разработка ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1



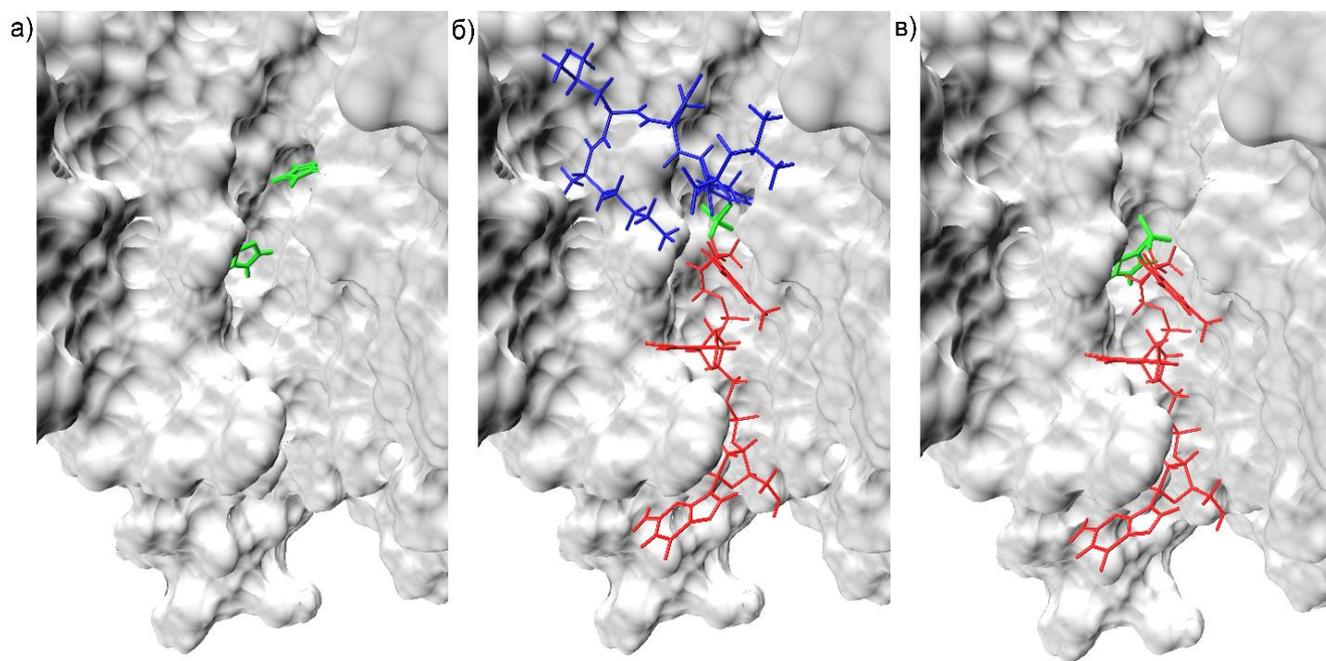
**Рис. 5.** Роль ТДФ1 в репарации ДНК и противоопухолевой химиотерапии с помощью препаратов типа иринотекан. Отмечены два возможных пути для ингибирования ТДФ1: 1 – конкурентное ингибирование путем связывания с апоферментом ТДФ1, 2 – бесконкурентное ингибирование путем связывания с интермедиатом ТДФ1.

ТДФ1 является ферментом репарации ДНК человека, который расщепляет комплексы ДНК с топоизомеразой (Top1) по ковалентной связи остатка тирозина с 3'-концевым фосфатом. Такие комплексы могут накапливаться в процессе репликации и транскрипции в результате различных повреждений ДНК, а также под действием ингибиторов Top1, таких как химиопрепарат иринотекан (рис. 5). Поэтому ТДФ1 рассматривается в качестве перспективной противоопухолевой мишени, ингибиторы которой могли бы усиливать эффект традиционной

химиотерапии и способствовать преодолению лекарственной устойчивости. Субстратом ТДФ1 служит предварительно подвергшийся протеолизу комплекс Top1-ДНК, в котором олигопептидный фрагмент Top1 соединен с ДНК через остаток фосфотирозина. В ходе работы была предпринята разработка ингибиторов ТДФ1, содержащих сульфогруппу – структурный миметик фосфатной группы фосфотирозина.

### Молекулярное моделирование тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1

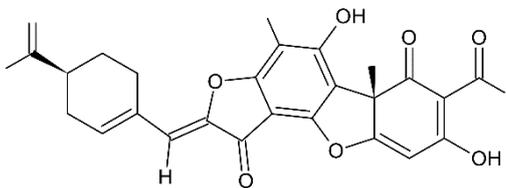
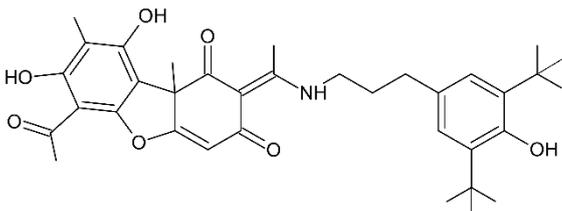
В литературе рассматривается два возможных пути подавления активности ТДФ1 человека: ингибирование связывания субстрата и ингибирование гидролиза интермедиата (рис. 5). В связи с этим, на основе кристаллической структуры 1por были построены следующие модели белка: апофермент, фермент-субстратный комплекс и ковалентный интермедиат (рис. 6). Для симуляции образования интермедиата постепенно уменьшали расстояние между 3'-фосфатной группой и имидазольным кольцом His263 (нуклеофил) в фермент-субстратном комплексе.



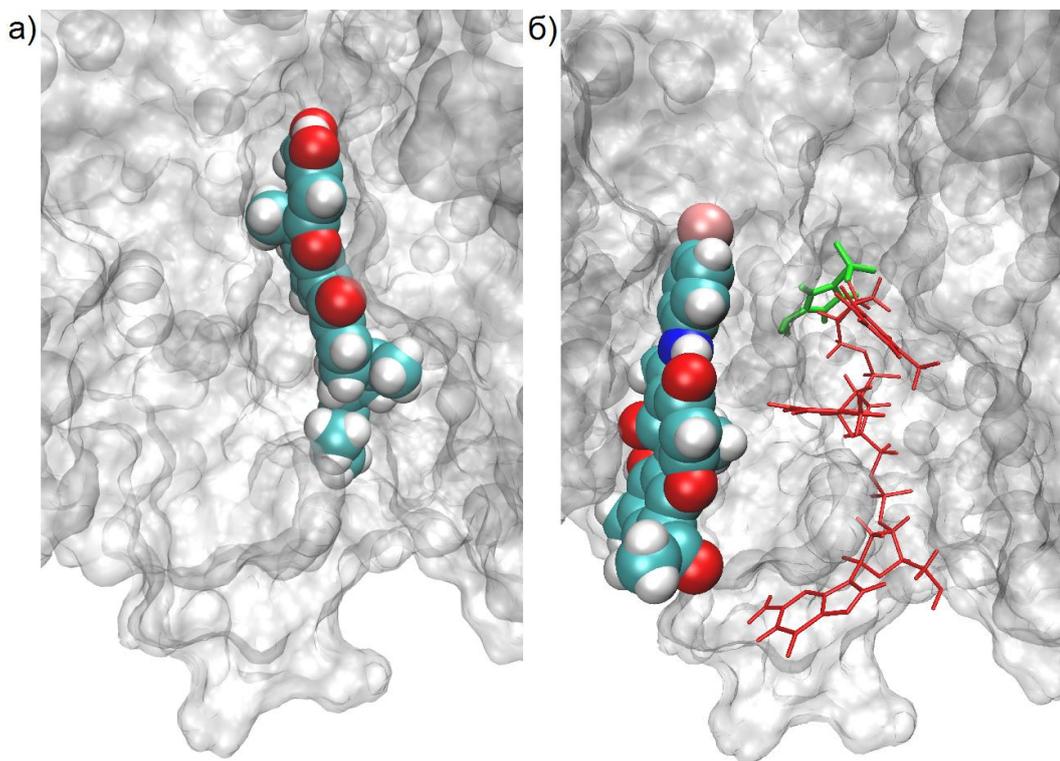
**Рис. 6.** Полученные молекулярные модели ТДФ1 человека: (а) апофермент, (б) фермент-субстратный комплекс, (в) ковалентный интермедиат. Синим показана олигопептидная часть субстрата, красным – олигонуклеотидная. Каталитические остатки гистидина и атакуемая 3'-фосфатная группа показаны зеленым.

Адекватность полученных моделей ТДФ1 оценивали путем докинга двух классов известных ингибиторов, разработанных при участии сотрудников ИХБФМ СО РАН: терпеноидные производные усниновой кислоты и енамины усниновой кислоты (табл. 2). Эти соединения докировали в модели апофермента и ковалентного интермедиата ТДФ1.

**Табл. 2.** Наиболее активные ингибиторы ТДФ1 среди производных усниновой кислоты.

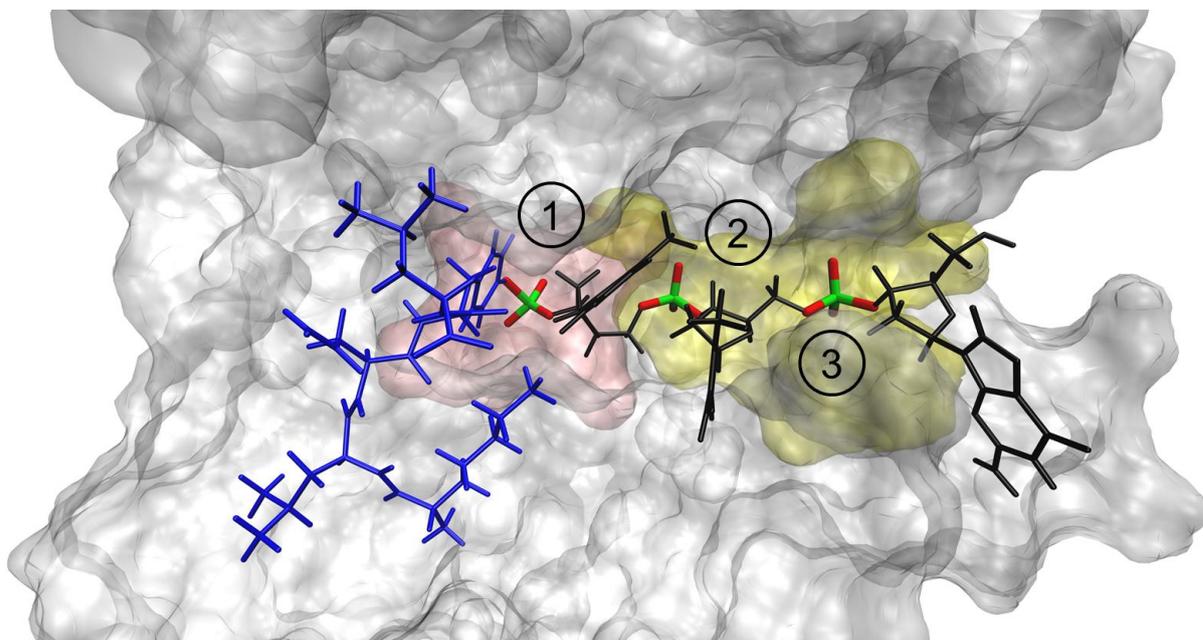
	Химическая структура	$\Delta G^{calc}$ , ккал/моль	IC <sub>50</sub> , мкМ
Терпеноидное производное		-11,9	0,33
Енаминовое производное		-10,4	0,16

Моделирование показано, что терпеноидные производные усниновой кислоты предпочтительно связываются в активном центре апоформы белка, в то время как енамины предположительно являются бесконкурентными ингибиторами ТДФ1, связываясь с ковалентным интермедиатом в полости по соседству с активным центром (рис. 7). Данные моделирования согласуются с экспериментальными результатами по механизму ингибирования, а предсказанные позиции соединений характеризуются выгодными взаимодействиями с белком, что подтверждает пригодность примененной вычислительной методики.



**Рис. 7.** Моделирование связывания производных усниновой кислоты с ТДФ1. (а) конкурентное связывание терпеноидного производного на участке связывания субстрата, (б) бесконкурентное ингибирование енамином усниновой кислоты. Красным цветом показан олигонуклеотид, ковалентно присоединенный к His263.

Детальный анализ строения активного центра в модели фермент-субстратного комплекса ТДФ1 выявил два обособленных участка, предназначенных для связывания фосфотирозиновой и олигонуклеотидной частей субстрата (рис. 8). На фосфотирозиновом участке связывается первая (с 3'-конца) фосфатная группа субстрата, вступая во взаимодействие с остатками Lys265, Asn283, Lys495, Asn516, а также со структурно упорядоченной молекулой воды. На участке связывания олигонуклеотида вторая фосфатная группа взаимодействует с остатками Ser400, Ser518 и двумя молекулами воды, а третья группа – с основными цепями остатков Ser403 и Ala520. Вышеперечисленные остатки могут служить мишенями для связывания сульфогруппы потенциальных ингибиторов ТДФ1.



**Рис. 8.** Важные участки связывания субстрата и ингибиторов в активном центре ТДФ1. Участок связывания фосфотирозина обозначен розовым цветом, участок связывания олигонуклеотида – желтым. Синим цветом показана пептидная часть субстрата, серым – олигонуклеотидная часть. Фосфатные группы субстрата пронумерованы (группа 1 является частью остатка фосфотирозина).

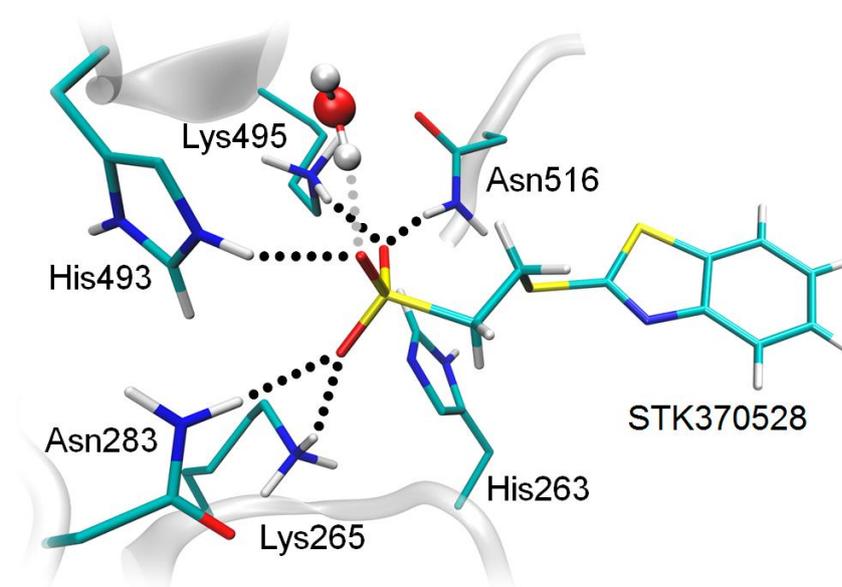
### Первичный скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1

Из библиотеки Vitas-M были извлечены сульфонаты, удовлетворяющие «правилу трех» (всего 71 соединение). После докинга соединений в активный центр апоформы ТДФ1 осуществили структурную фильтрацию полученных позиций с помощью vsFilt. В качестве структурного критерия было выбрано взаимодействие сульфогруппы с сайтом связывания первой фосфатной группы субстрата (водородные связи с остатками Lys265, Asn283, Lys495, Asn516 и молекулой воды). Таким образом, сульфогруппа рассматривалась в качестве миметика 3'-фосфатной группы.

В результате для экспериментальной проверки отобрали два наиболее перспективных соединения, STK370528 и STK376552, в которых сульфогруппа соединена с гетероциклической группой с помощью тиоэфирного линкера (рис. 9, табл. 3). Исследование ингибиторной активности STK370528 и STK376552 было

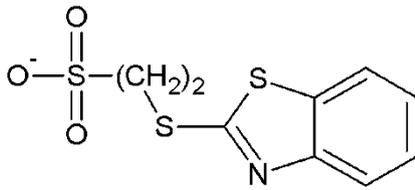
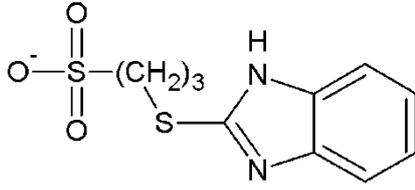
осуществлено в ИХБФМ СО РАН с использованием рекомбинантной ТДФ1 человека, значение  $IC_{50}$  составило 83 и 686 мкМ соответственно.

Анализ модельных позиций показал, что метансульфонатный фрагмент оптимальным образом располагается на участке связывания фосфотирозина. В то же время, гетероциклическая часть ингибитора располагается на участке олигонуклеотида, и ее структура может быть оптимизирована для более эффективного связывания. Следует отметить, что докинг STK370528 и STK376552 в модель ковалентного интермедиата ТДФ1 не выявил позиций, в которых сульфозаместитель мог бы образовать эффективное взаимодействие посредством водородных связей. Это свидетельствует о предпочтительном связывании с апоформой ТДФ1 и конкурентном характере ингибирования.



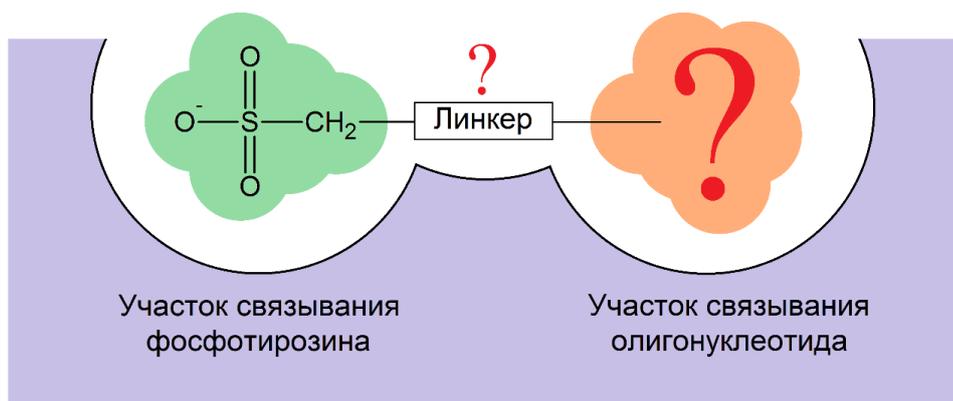
**Рис. 9.** Предсказанная позиция соединения STK370528 в активном центре ТДФ1. Пунктирными линиями показаны водородные связи на участке первой фосфатной группы субстрата.

**Табл. 3.** Сульфозамещенные соединения, обнаруженные в результате скрининга и проявившие ингибиторный эффект в отношении рекомбинантной ТДФ1 человека.

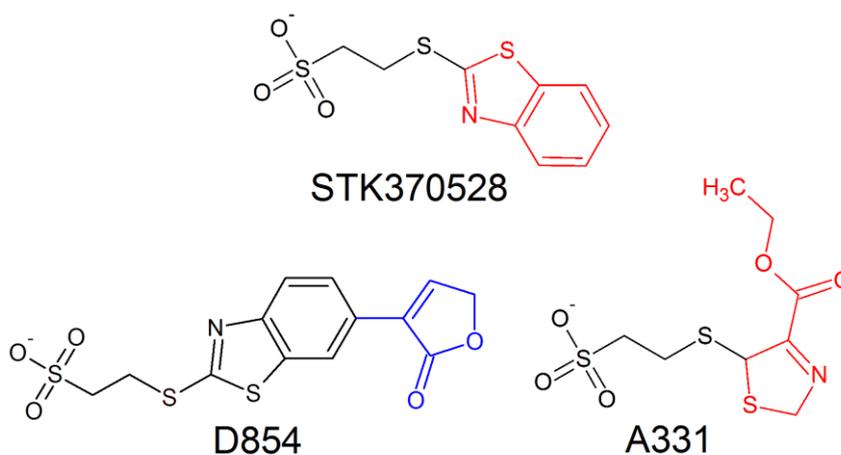
ID	Химическая структура	$\Delta G^{\text{calc}}$ , ккал/моль	IC <sub>50</sub> , мкМ
STK370528		-8,7	83
STK376552		-8,0	686

#### Вторичный скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1

На следующем этапе оптимизировали гетероциклическую часть ингибитора, соединенную с сульфогруппой гибким линкером и располагающуюся на участке связывания олигонуклеотида (рис. 10). На основе базовой структуры STK370528 была сконструирована компьютерная библиотека производных путем автоматизированного перебора заместителей (всего 28519 соединений с учетом пространственной изомерии). При структурной фильтрации докированных позиций отбирали соединения, образующие дополнительные взаимодействия с сайтом связывания третьей фосфатной группы субстрата (водородные связи с остатками Ser403 и Ala520). В результате удалось идентифицировать несколько новых перспективных соединений (например, D854 на рис. 11 и 12).



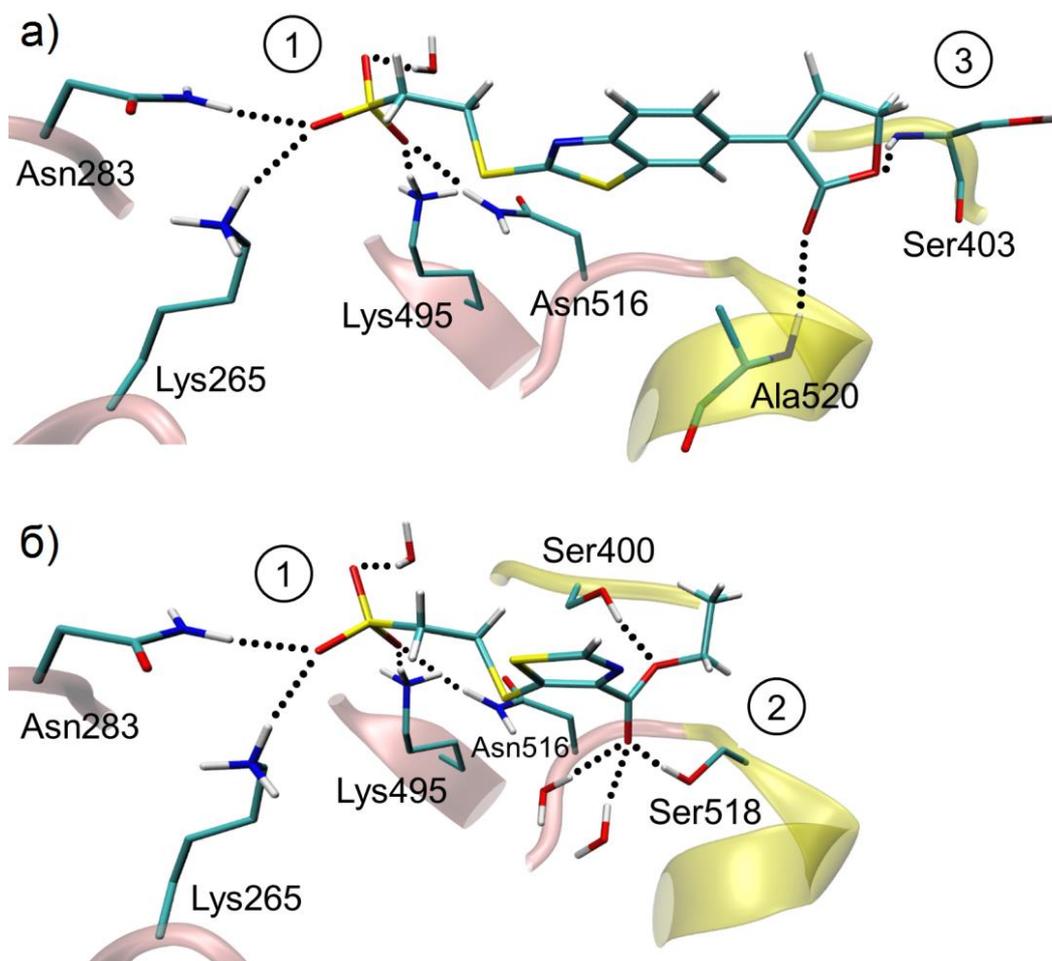
**Рис. 10.** Схематичное изображение связывания сульфозамещенного ингибитора в активном центре ТДФ1. Зеленым цветом показан метилсульфонатный фрагмент, оранжевым показана оптимизируемая гетероциклическая часть ингибитора.



**Рис. 11.** Химические структуры ингибитора ТДФ1 STK370528, а также его перспективного производного D854 и аналога A331.

Бензотиазольный фрагмент STK370528 и его производных располагается в активном центре ТДФ1 таким образом, что ингибиторы не вступают в оптимальное взаимодействие с участком связывания второй фосфатной группы, характерное для субстрата. В связи с этим была исследована возможность замены бензотиазольной группы на более подходящий фрагмент. Было решено сконструировать библиотеку аналогов STK370528 и варьировать бензотиазольную часть и линкер, при этом значительно не отклоняясь от исходной структуры; всего было сгенерировано 956 соединений. При структурной фильтрации отбирали соединения, образующие дополнительные

взаимодействия с сайтом второй фосфатной группы субстрата (водородные связи с Ser400 и Ser518), среди которых удалось идентифицировать несколько новых потенциальных ингибиторов ТДФ1 (например, А331 на рис. 11 и 12).



**Рис. 12.** Предсказанные позиции производных и аналогов STK370528 в активном центре ТДФ1: (а) соединение D854, (б) соединение А331. Участок связывания фосфотирозина обозначен розовым цветом, участок связывания олигонуклеотида – желтым. Сайты фосфатных групп субстрата пронумерованы.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. На основе кристаллических структур сконструированы молекулярные модели транскетолазы (ТК) *M. tuberculosis* и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (ТДФ1) человека, предназначенные для компьютерного поиска ингибиторов.
2. Путем биоинформатического анализа активного центра ферментов из разных организмов в ТК из *M. tuberculosis* идентифицирован кластер гидрофобных остатков Pe211-Leu402-Phe464, отсутствующий в ТК человека, что обуславливает возможность разработки селективных ингибиторов.
3. В результате анализа структуры активного центра ТДФ1 выявлены обособленные участки, важные для связывания субстрата и ингибиторов: участок фосфотирозина (содержащий остатки Lys265, Asn283, Lys495, Asn516) и участок олигонуклеотида (содержащий остатки Ser400, Ser403, Ser518, Ala520).
4. Разработаны критерии структурной фильтрации для отбора эффективных ингибиторов в процессе компьютерного скрининга с учетом специфических взаимодействий в активных центрах ТК и ТДФ1, создано необходимое программное обеспечение.
5. С помощью компьютерного скрининга выявлены соединения-ингибиторы ТК *M. tuberculosis*, содержащие сульфогруппу в качестве структурного миметика пирофосфатной группы кофермента и вариабельный гидрофобный фрагмент, обеспечивающий взаимодействие с кластером Pe211-Leu402-Phe464.
6. С помощью компьютерного скрининга обнаружены новые ингибиторы ТДФ1, содержащие сульфогруппу в качестве миметика фосфатной группы остатка фосфотирозина и гетероциклический фрагмент, обеспечивающий взаимодействие с участком олигонуклеотида.

## НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI<sup>1</sup>

1. **Gushchina I.**, Polenova A., Suplatov D., Švedas V., and Nilov D. vsFilt: A tool to improve virtual screening by structural filtration of docking poses. //Journal of Chemical Information and Modeling. – 2020. – V. 60. – P. 3692-3696; IF 4.549, квартиль Q1 (0,6/0,25).
2. **Гущина И.В.**, Нилов Д.К., Захаренко А.Л., Лаврик О.И., Швядас В.К. Моделирование структуры и скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека. //Acta Naturae. – 2017. – V. 9. – P. 62-69; IF 2.0 (1,0/0,4).
3. Zakharenko A., Luzina O., Koval O., Nilov D., **Gushchina I.**, Dyrkheeva N., Švedas V., Salakhutdinov N., and Lavrik O. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors: usnic acid enamines enhance the cytotoxic effect of camptothecin. //Journal of Natural Products. – 2016. – V. 79. – P. 2961-2967; IF 3.281, квартиль Q1 (0,9/0,1).
4. Dyrkheeva N., Luzina O., Filimonov A., Zakharova O., Ilina E., Zakharenko A., Kuprushkin M., Nilov D., **Gushchina I.**, Švedas V., Salakhutdinov N., and Lavrik O. Inhibitory effect of new semisynthetic usnic acid derivatives on human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. //Planta Medica. – 2019. – V. 85. – P. 103-111; IF 2.687, квартиль Q1 (1,1/0,1).

## ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Нилов Д.К., **Гущина И.В.**, Щербакова Т.А., Балдин С.М., Швядас В.К. Применение фурансульфонатов для ингибирования транскетолазы патогена *Mycobacterium tuberculosis* //Патент на изобретение RU 2703465 C1. – 2019.
2. Швядас В.К., Суплатов Д.А., Нилов Д.К., Балдин С.М., **Гущина И.В.**, Щербакова Т.А., Шмальгаузен Е.В. Разработка методов дизайна селективных

---

<sup>1</sup> В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

- ингибиторов ферментов на основе биоинформатического анализа суперсемейств и молекулярного моделирования. // *Материалы XXVI Симпозиума «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств» в рамках XXVII Российского Национального Конгресса «Человек и Лекарство»*, Москва, Россия, 6-25 апреля 2020. – 2020.
3. **Gushchina I.V.**, Nilov D.K., and Švedas V.K. Rational design of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors as promising antitumor agents. // *Материалы 4-ой Российской конференции по медицинской химии (МедХим-2019) с международным участием*, Екатеринбург, Россия, 9-14 июня 2019. – 2019.
  4. Евтеев С.А., Поленова А.М., **Гущина И.В.**, Нилов Д.К., Швядас В.К. Рациональный дизайн сульфозамещённых противоопухолевых ингибиторов. // *Материалы IV Междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике МОБИ-ХимФарма2018*, Новый Свет, Крым, Россия, 23-26 сентября 2018. – 2018.
  5. Nilov D., **Gushchina I.**, Shcherbakova T., Meshalkina L., and Švedas V. First selective inhibitors of transketolase from *Mycobacterium tuberculosis* targeted towards both the pyrophosphate binding site and an adjacent hydrophobic site. // *Материалы конференции Chemical Biology 2018*, Хайдельберг, Германия, 29 августа - 1 сентября 2018. – 2018.
  6. **Gushchina I.**, Švedas V., and Nilov D. Selection of bifunctional tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors by molecular modeling. // *Материалы 43-го Конгресса FEBS*, Прага, Чехия, 7-12 июля 2018. – 2018.
  7. Швядас В.К., Суплатов Д.А., Нилов Д.К., Балдин С.М., **Гущина И.В.**, Щербакова Т.А., Шмальгаузен Е.В. Поиск селективных ингибиторов ферментов патогенов с использованием методов биоинформатики и молекулярного моделирования. // *Материалы Международного Форума "Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" (BIOTECH WORLD 2018)*, Москва, Россия, 23-25 мая 2018. – 2018.

8. Švedas V., **Gushchina I.**, Meshalkina L., Nilov D., Shmalhauzen E., and Suplatov D. How we do modulate functional properties of enzymes. // *Материалы конференции Biocatalysis-2017: Fundamentals & Applications*, Истра, Россия, 25-30 июля 2017. – 2017.
9. Nilov D.K., **Gushchina I.V.**, and Švedas V.K. Identifying new inhibitors of DNA repair enzymes. // *Материалы конференции Biocatalysis-2017: Fundamentals & applications*, Истра, Россия, 25-30 июля 2017. – 2017.
10. Nilov D.K., **Gushchina I.V.**, and Švedas V.K. In silico screening for sulfonate-based inhibitors against promising anticancer targets. // *Материалы конференции Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/BGRS-2016*, Новосибирск, Россия, 29 августа - 2 сентября 2016. – 2016.
11. **Gushchina I.V.**, Nilov D.K., Zakharenko A.L., Lavrik O.I., and Švedas V.K. Molecular model of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 for a structure-based screening for its inhibitors. // *Материалы конференции Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'15)*, Москва, Россия, 16-19 июля 2015. – 2015.