

## ИЗУЧЕНИЕ ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НЕМОНОКСАЦИНА – НОВОГО, НЕ СОДЕРЖАЩЕГО ФТОРА ПРОИЗВОДНОГО ХИНОЛОНА, В ОТНОШЕНИИ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ IV МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

Печинский С.В.<sup>1</sup>, Курегян А.Г.<sup>1</sup>, Самсонов М.Ю.<sup>2</sup>, Иванов А.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск (357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: hplc@yandex.ru;

<sup>2</sup>ЗАО «Р-Фарм», 123317, г. Москва, ул. Тестовская, д.10, подъезд.1. e-mail: info@rpharm.ru

Немоноксацин является оригинальным, не содержащим фтора производным хинолона. Он обладает ультрашироким спектром антибактериальной активности как в отношении грамотрицательных, так и в отношении грамположительных и анаэробных бактерий, включая различные резистентные штаммы стрептококков и стафилококков. На основании данных зависимости «структура — активность» построена компьютерная модель ингибирующей активности хинолонов в отношении топоизомеразы IV грамположительных микроорганизмов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*. По результатам эксперимента установлено, что фтор в положении С6 в молекуле фторхинолонов не участвует в образовании связей в активном центре белка, а только оказывает влияние на пространственную конфигурацию лиганда. Модель, построенная *in silico*, показала, что немоноксацин превосходит по ингибирующей активности некоторые фторхинолоны, что подтверждается данными *in vitro*.

Ключевые слова: немоноксацин, молекулярный докинг, топоизомераза IV, хинолоны, фторхинолоны, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*

## STUDY OF THE INHIBITORY ACTIVITY NEMONOXACIN A NOVEL NONFLUORINATED QUINOLONE DERIVATIVE AGAINST TOPOISOMERASE IV BY DOCKING

Pechinskiy S.V.<sup>1</sup>, Kuregyan A.G.<sup>1</sup>, Samsonov M.Y.<sup>2</sup>, Ivanov A.I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of the Volgograd State Medical University, Ministry of Health, Pyatigorsk, 357532, Prospekt Kalinina, 11, e-mail: hplc@yandex.ru;

<sup>2</sup>CJSC «R-Pharm», 123317, Moscow, Testovskaya st., 10, p.1, e-mail: info@rpharm.ru

Nemonoxacin is novel nonfluorinated quinolone. It has ultra wide spectrum antibacterial activity both against Gram-negative as well as against Gram-positive and anaerobic bacteria, including various resistant strains of staphylococci and streptococci. Based on structure-activity relationships built a computer model inhibitory activity quinolone against topoisomerase IV Gram-positive microorganisms *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. The experiment results revealed that fluorine in the C6 position fluoroquinolone molecule not involved in bond formation at the active site of the protein, and only affects the spatial configuration of the ligand. The model constructed *in silico* showed that nemonoxacin superior to the inhibitory activity of some fluoroquinolones, which was confirmed by *in vitro*.

Keywords: Nemonoxacin, docking, topoisomerase IV, quinolones, fluoroquinolone, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*

Производные хинолонов являются одним из наиболее эффективных и быстро развивающихся классов антибиотиков, которые чаще других химиотерапевтических средств применяются в клинической практике. С начала 1960-х гг., когда родоначальник этого класса – налидиксовая кислота была впервые использована для лечения инфекций мочеполовой системы, и до сегодняшнего дня синтезировано более 10 000 активных соединений этой группы; около 400 лекарственных средств, производных хинолонов, отечественного и импортного производства зарегистрированы в РФ [1, 4, 9, 10].

С тех пор как в 1983 г. был введен в медицинскую практику норфлоксацин – первый клинически значимый хинолон, содержащий фтор в положении С6, долгие годы считалось,

что именно этот фармакофор является доминирующим в проявлении антимикробной активности [4, 9]. В ряду фторхинолонов были синтезированы несколько тысяч соединений, многие из которых стали несомненными лидерами в группе антибактериальных средств (например, ципрофлоксацин).

Тем не менее исследования последних лет доказали, что удаление фтора из положения С6 совместно с некоторыми модификациями в положении С8 не только приводит к повышению активности, улучшает фармакокинетические характеристики хинолонов, но и снижает побочные эффекты. Особенно важным является проявление активности не содержащих фтор хинолонов относительно грамположительных микроорганизмов, резистентных к фторхинолонам [9].

Установлено, что реализация антимикробного действия хинолонов связана с ингибированием фермента топоизомеразы II (ДНК-гиразу) у грамотрицательных и топоизомеразы IV у грамположительных бактерий. Этот фермент выполняет функцию поддержания спиральности ДНК, отвечая за разрыв и восстановление суперскрученной спирали, что является решающим фактором для процессов транскрипции и репликации ДНК.

В результате связывания хинолонов с ферментом образуется «тройной комплекс» – «фермент — субстрат — препарат», который не может диссоциировать на компоненты, не выполнять функцию фермента, что приводит к подавлению биосинтеза ДНК и как следствие — к гибели бактериальной клетки. Высокая активность хинолонов скорее всего связана с тем, что в бактериальных клетках отсутствуют ферментные системы, препятствующие образованию «тройных комплексов», способные разрушать эти комплексы или метаболизировать сами хинолоны.

Необходимо отметить, что хинолоны не ингибируют топоизомеразу II млекопитающих, такая селективность обусловлена существенными различиями в структуре этих ферментов [4, 9, 12].

Немоноксацин является оригинальным, не содержащим фтора производным хинолона. Он обладает ультрашироким спектром антибактериальной активности как в отношении грамотрицательных, так и в отношении грамположительных и анаэробных бактерий, включая различные резистентные штаммы стрептококков и стафилококков [5, 7, 8].

Немоноксацин, структурная формула которого приведена на рисунке 1, менее чем на 20% связывается с белками крови, выводится почками практически в неизменном виде, что доказано в ходе клинических испытаний.

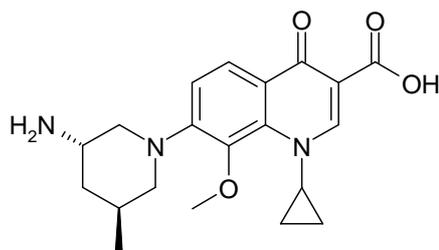


Рис. 1. Структурная формула Немонксацина

Для него *in vitro* не выявлена ингибирующая или индуцирующая активность различных цитохромов P450. Кроме того, для этого хинолона не характерна фотосенсибилизация [6].

**Целью настоящего исследования** является установление зависимости между структурой Немонксацина и его ингибирующей активностью в отношении топоизомеразы IV на примере *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*.

#### **Объекты и методы исследования**

В исследованиях использовали программу ArgusLab, разработанную Mark Thompson, Planaria Software Seattle [2], оптимизацию пространственной структуры лиганда выполняли полуэмпирическим методом PM3 с помощью программного комплекса GAMESS [3]. Это сочетание позволило получить более точную модель взаимодействия лиганда с центром связывания фермента. В качестве объектов исследования были выбраны компьютерные модели взаимодействия топоизомеразы IV с лигандами, построенные на основании кристаллографических снимков *Streptococcus pneumoniae* (PDB код: 3FOF) с величиной разрешения 1,7 Å [11] и *Staphylococcus aureus* (PDB код: 2XCT) с величиной разрешения 3,35 Å [13]. Сопоставление полученных прогнозов проводили с результатами антимикробной активности некоторых производных фторхинолона: Левофлоксацина, Ципрофлоксацина, Моксифлоксацина и Немонксацина по данным, полученным *in vitro* и опубликованным в работах [5, 7, 8].

#### **Результаты и их обсуждение**

Компьютерная модель была построена и апробирована на уже известных взаимодействиях топоизомеразы IV *Streptococcus pneumoniae* и топоизомеразы IV *Staphylococcus aureus* с фторхинолонами.

Сравнение проводили по пространственному расположению лиганда в активном центре белка, рассчитанному с помощью компьютерной модели с кристаллографическими снимкам, и энергии докинга.

При расчетах энергии докинга учитывали гибкость как лиганда, так и белка. Такая техника «стратегической гибкости» позволила улучшить прогнозирующую способность компьютерной модели.

Высокая степень прогноза дает возможность использовать предложенную модель для установления взаимодействия Немоноксацина с топоизомеразой IV *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*.

Расположение Немоноксацина и Моксифлоксацина в активном центре топоизомеразы IV *Streptococcus pneumoniae* представлено на рисунке 2.

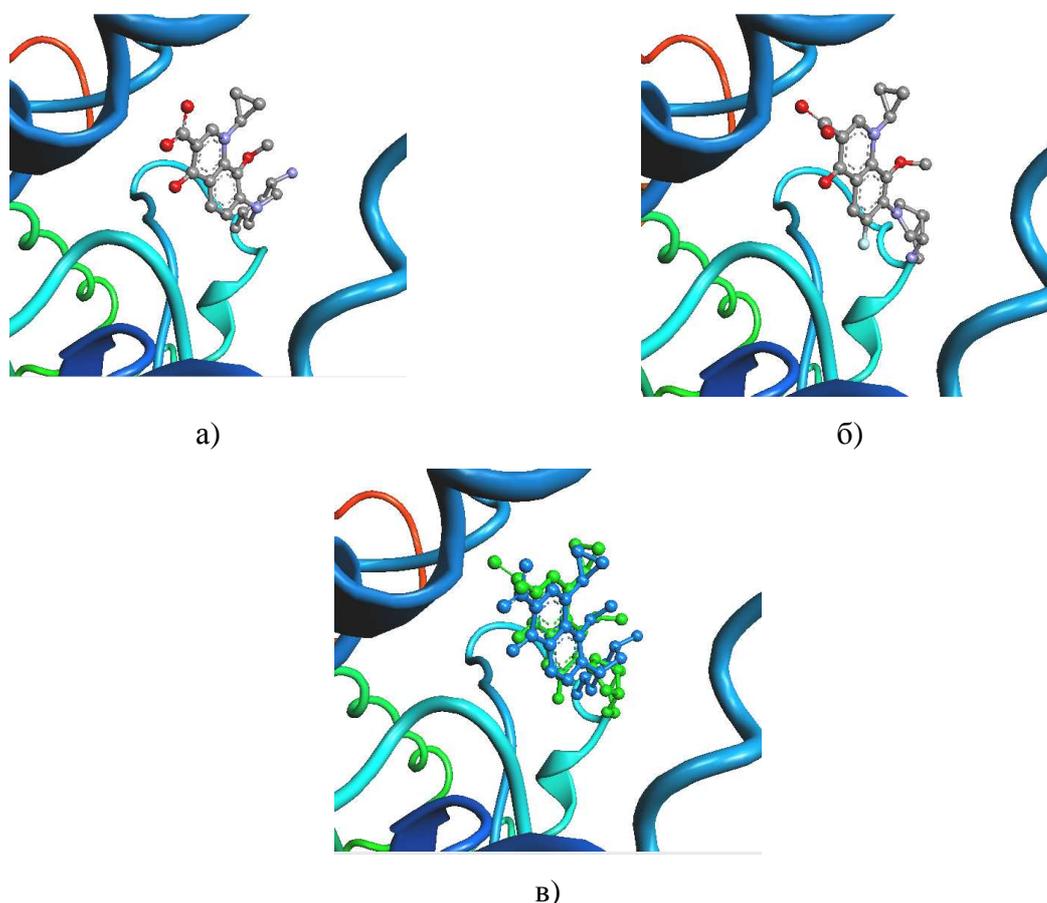


Рис. 2. Немоноксацин (а), Моксифлоксацин (б),  
Немоноксацин – синий и Моксифлоксацин – зеленый (в)

в активном сайте связывания топоизомеразы IV *Streptococcus pneumoniae*

Близкое пространственное расположение молекул Немоноксацина и Моксифлоксацина в активном центре топоизомеразы IV *Streptococcus pneumoniae* свидетельствует о схожем механизме ингибирования на молекулярном уровне. При этом Немоноксацин образует более прочные водородные связи в ряду рассматриваемых препаратов между карбоксильной группой и аминогруппой серотонинов 79 и 80, что скорее всего является ключевым фактором в проявлении ингибирующего действия. Следует отметить, что при этом фтор молекул фторхинолонов не образует связей с активным центром фермента.

Результаты расчета энергии докинга взаимодействия Левофлоксацина, Ципрофлоксацина, Моксифлоксацина, Немоноксацина с топоизомеразой IV *Streptococcus*

*pneumoniae* и сопоставление результатов *in silico* с данными антимикробной активности этих соединений, полученными *in vitro* [5, 7, 8], представлены в таблице 1.

**Таблица 1**

Энергия докинга и ингибирующая активности хинолонов в отношении  
*Streptococcus pneumoniae*

Лиганды	Энергия докинга (ккал/М)	МІС <sub>50</sub> (мг/л)
Левифлоксацин	-9,781	4
Цифрофлоксацин	-11,365	2
Моксифлоксацин	-13,244	1
Немоноксацин	-15,562	0,25

Как следует из данных таблицы 1, наблюдается корреляция рассчитанной энергии докинга и результатов ингибирующей активности в рассматриваемом ряду лекарственных средств.

Для проявления ингибирующей активности Левифлоксацина необходима наибольшая концентрация – 4 мг/л, при этом энергия докинга составляет -9,781 ккал. Промежуточное положение в сравниваемых препаратах занимают Цифрофлоксацин и Моксифлоксацин с минимальной ингибирующей концентрацией 2 мг/л (-11,365 ккал) и 1 мг/л (-13,244 ккал) соответственно. Немоноксацин обладает ингибирующей активностью в отношении *Streptococcus pneumoniae* в минимальной концентрации – 0,25 мг/л (-15,562 ккал) в сравнении с Левифлоксацином, Цифрофлоксацином и Моксифлоксацином.

Таким образом, наблюдается полное совпадение результатов прогноза, полученного *in silico*, и независимо полученных результатов [5, 7, 8] *in vitro*.

Далее было изучено взаимодействие Немоноксацина и Цифрофлоксацина с активным центром топоизомеразы IV *Staphylococcus aureus*.

Расположение лигандов в пространстве фермента представлено на рисунке 3.

Немоноксацин, в отличие от рассматриваемых фторхинолонов, занимает более выгодное пространственное расположение в активном центре топоизомеразы IV *Staphylococcus aureus*, что связано с образованием водородной связи между карбоксильной группой и аспарагином 476, длина которой составляет 2,2 Å, тогда как, например, Цифрофлоксацин образует между карбоксильной группой и серотонином 1084 водородную связь длиной 2,5 Å, а также наличием дополнительных водородных связей между метокси-группой и аргинином 458, и между первичной аминогруппой в радикале в 7-ом положении и аспарагиновой кислотой 437.

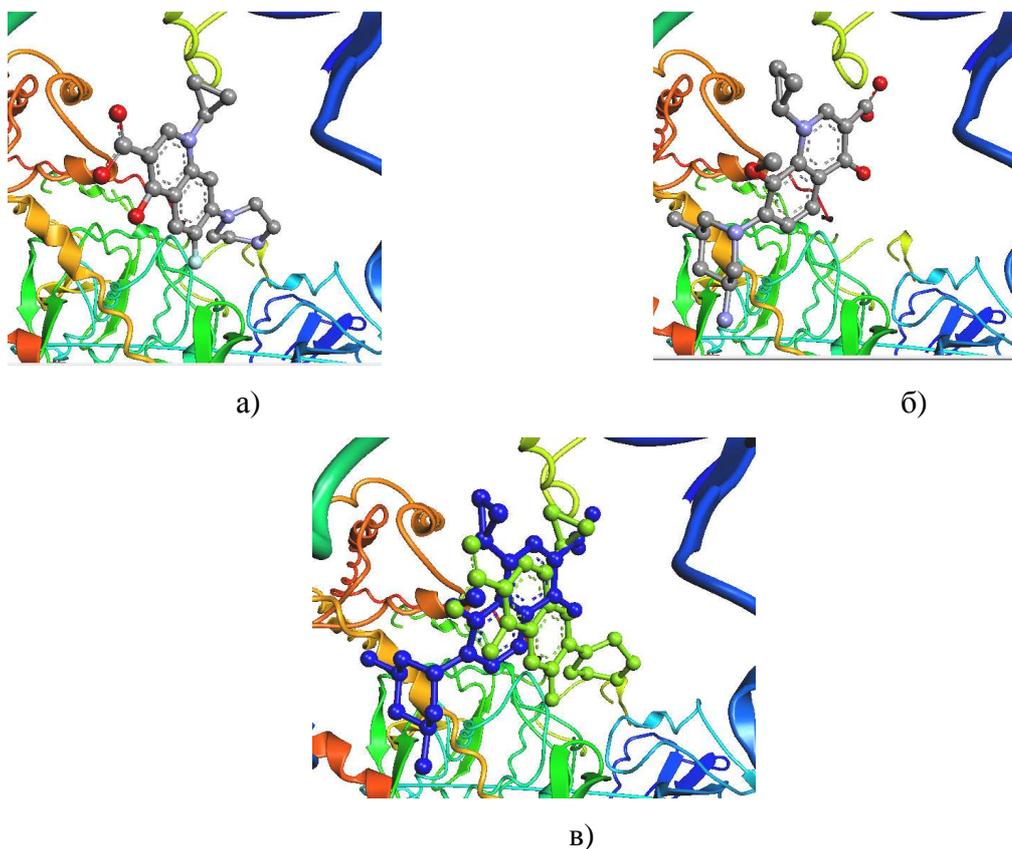


Рис. 3. Ципрофлоксацин (а), Немоноксацин (б),  
Немоноксацин – синий и Ципрофлоксацин – зеленый (в)

в активном сайте связывания топоизомеразы IV *Staphylococcus aureus*

Кроме того, установлено, что фтор, входящий в структуру фторхинолонов, не образует связей в активном центре топоизомеразы IV *Staphylococcus aureus*.

Следующим этапом исследования было определение энергии докинга взаимодействия Левофлоксацина, Ципрофлоксацина, Моксифлоксацина, Немоноксацина с активным центром топоизомеразы IV *Staphylococcus aureus*. Сравнительные результаты виртуального прогноза с данными, полученными *in vitro* [5, 7, 8], представлены в таблице 2.

**Таблица 2**

Энергия докинга и ингибирующая активность хинолонов в отношении *Staphylococcus aureus*

Лиганды	Энергия докинга (ккал/М)	МІС <sub>50</sub> (мг/л)
Левофлоксацин	-13,163	0,125
Ципрофлоксацин	-13,477	0,125
Моксифлоксацин	-16,928	0,032
Немоноксацин	-17,211	0,030

Расчет энергии докинга взаимодействия хинолонов с топоизомеразой IV *Staphylococcus aureus* показал, что Немоноксацин проявляет наиболее высокую ингибирующую активность по сравнению с фторхинолонами.

Антимикробная активность Левофлоксацина и Ципрофлоксацина проявляется при одинаковой минимальной концентрации – 0,125 мг/л. Для реализации ингибирующей активности Моксифлоксацина и Немоноксацина требуется концентрация около 0,03 мг/л.

Сравнение данных энергии докинга и ингибирующей активности показывает согласованность результатов исследований, полученных *in silico* и *in vitro*.

### **Выводы**

Разработанная компьютерная модель взаимодействия лигандов с топоизомеразой IV грамположительных микроорганизмов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* позволяет проводить исследования в ряду «структура — активность», что является важным условием при разработке новых высокоактивных лекарственных средств с заданным фармакологическим действием.

Прогноз антимикробной активности с помощью молекулярного докинга некоторых производных хинолона подтверждается результатами *in vitro*, что свидетельствует о высокой прогнозирующей способности разработанной модели.

Установлено, что фтор в положении С6 в молекуле фторхинолонов не участвует в образовании связей в активном центре белка, а только влияет на пространственную структуру лиганда. В связи с этим наличие фтора в положении С6 не является решающим фактором в проявлении антимикробного действия и подтверждает перспективность поиска новых не содержащих фтора производных хинолона.

В результате проведенных исследований было установлено, что не содержащее фтора производное хинолона Немоноксацин проявляет более выраженную ингибирующую активность в отношении топоизомеразы IV грамположительных микроорганизмов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* по сравнению с фторхинолонами.

### **Список литературы**

1. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. — Режим: <http://grls.rosminzdrav.ru>.
2. Мокрушина Г.А., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. Взаимосвязь структуры и антибактериальной активности в ряду фторхинолонов. Обзор // Хим.-фарм. журн.. – 1995. – Т. 29. – № 9. – С. 5–19.
3. Компьютерная программа ArgusLab [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html> (дата обращения: 03.09.2015).
4. Компьютерная программа GAMESS [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.msg.chem.iastate.edu/gamess/download.html> (дата обращения: 03.09.2015).

5. Comparative in vitro activities of the new quinolone nemonoxacin (TG-873870), gemifloxacin and other quinolones against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* / Che-Kim Tan, Chih-Cheng Lai, Chun-Hsing Liao et al. // *J. of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2009. – V. 64. – P. 428–435.
6. Dose escalation study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of Nemonoxacin (TG-873870), a novel potent broad-spectrum nonfluorinated quinolone, in healthy volunteers / Luke Lin, Li-Wen Chang, Cheng-Yuan Tsai et al. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – V. 54. – P. 405–410.
7. In vitro activity of nemonoxacin (TG-873870), a novel non-fluorinated quinolone, against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *enterococci* and *Streptococcus pneumoniae* with various resistance phenotypes in Taiwan / Yen-Hsu Chen, Chia-Ying Liu, Jang-Jih Lu et al. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2009. – V. 64.– P. 1226–229.
8. In vivo antibacterial activity of Nemonoxacin, a novel non-fluorinated quinolone / Cong-Ran Li, Yi Li, Guo-Qing Li et al. // *J. Antimicrob Chemother.* – 2010. – V. 65. – P. 2411-2415.
9. Ronald A.R., Low D.E. Fluoroquinolone antibiotics. – Basel - Boston – Berlin : Springer Basel AG, 2003. – 261 p..
10. Steven Swallow Chapter two - fluorine in medicinal chemistry // *Progress in Medicinal Chemistry*. – 2015. – V. 54. – P. 65–133.
11. Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases / I. Laponogov, M.K. Sohi, D.A. Veselkov et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – V.16. – P. 667–669.
12. Thomas D. Gootz, Katherine E. Brighty Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance, and clinical aspects // *Medicinal Research Reviews*. – 1996. – V. 16. – № 5. – P. 433–486.
13. Type IIА topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents / Benjamin D. Wax, Pan F. Chan, Drake S. Eggleston et al. // *Nature*. – 2010. – V. 466. – P. 935–940.

**Рецензенты:**

Оганесян Э.Т., д.фарм.н., профессор кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск;

Степанова Э. Ф., д.фарм.н., профессор, профессор кафедры технологии лекарств Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.