

## کشف مهارکننده علیه بتالاکتاماز CTX-M-9 باکتری E.coli با استفاده از مطالعات

## داکینگ مولکولی، MM/PBSA و دینامیک مولکولی

کامبیز داوری<sup>۱</sup>، جمیله نوروژی<sup>۱\*</sup>، فرزانه حسینی<sup>۱</sup>، عباس اخوان سپهی<sup>۱</sup> و ساکو میرزایی<sup>۲\*</sup><sup>۱</sup> ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی<sup>۲</sup> ایران، سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، گروه بیوشیمی

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۷

## چکیده

امروزه، مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌ها به یک چالش عمده برای سلامت بشر تبدیل شده است ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی، منجر به ناکارآمدی آنتی بیوتیک‌ها، عدم درمان مناسب بیماری‌های عفونی و افزایش هزینه‌های درمانی شده است. یکی از فراوانترین انواع مقاومتهای آنتی بیوتیکی مقاومت به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام بخصوص پنی سیلین و سفالوسپورین میباشد که در بیشتر موارد با یک مکانیسم آنزیم تغییر دهنده به نام بتالاکتاماز ایجاد می‌گردد. این آنزیم‌ها، حلقه بتا لاکتام آنتی بیوتیک‌های واجد این حلقه را هیدرولیز می‌کنند. بتالاکتامازها، طبق طبقه بندی آمبلر که بر اساس تشابه توالی آمینو اسیدهای پروتئینی انجام می‌پذیرد، به چهار گروه A، B، C، و D تقسیم می‌شوند. در مطالعه حاضر، با استفاده از داکینگ مولکولی در فرآیند غربالگری مجازی، از میان ۱۳۸۴۲ ترکیب، قویترین مهارکننده‌ها بر علیه آنزیم بتالاکتاماز CTX-M-9 انتخاب شد. ترکیبات با کمترین انرژی آزاد اتصال توسط مطالعات دینامیک مولکولی بررسی شدند. مطالعات مدل‌سازی ما مشخص کرد که ترکیب با کد بانک دارویی DB01753 دارای خصوصیت مهارکنندگی آنزیم بتالاکتاماز CTX-M-9 است. بعد از ۵۰ نانو ثانیه مطالعه دینامیک مولکولی، ترکیب DB01753 با آمینو اسیدهای سرین ۲۳۷، آسپارژین ۱۰۴، گلوتامات ۱۶۶، سرین ۲۷۴ و تیروزین ۱۰۵ تشکیل پیوند هیدروژنی داد. مطالعات MM/PBSA مشخص کرد که انرژی آزاد اتصال بین آنزیم بتالاکتاماز و DB01753 برابر ۱۱۱/۵- کیلوژول بر مول است. مطالعات ADME نشان داد که همه پارامترهای فارماکوکینتیکی در محدوده قابل قبول هستند.

واژه‌های کلیدی: بتالاکتاماز، CTX-M-9، داکینگ مولکولی، دینامیک مولکولی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۷۶۱۸۳۳، پست الکترونیکی: sako.biochem@gmail.com، nowroozij@yahoo.com

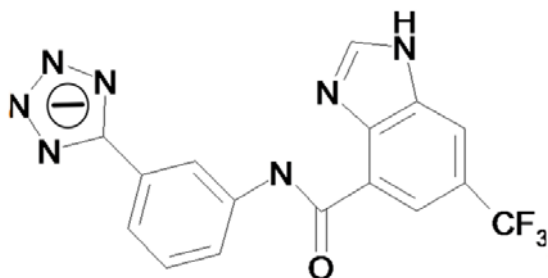
## مقدمه

امروزه یکی از مشکلات جدی در زمینه حفظ سلامتی، مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های بیماری‌زا و مضر است (۲۰ و ۲۶). تعداد بی شماری از انسان‌ها در دنیا توسط آنتی بیوتیک‌ها درمان شده و نجات یافته‌اند. بنابراین، آنتی بیوتیک‌ها گزینه مهمی در درمان انواع بیماری‌های عفونی از جمله بیماری‌های عفونی باکتریایی می‌باشند (۱۲). پس از معرفی پنی سیلین جی، تلاش برای ایجاد سنتز دیگر مشتقات آن شروع شد (۱۲ و ۲۰). در مطالعات اخیر، تنها در ایالات متحده آمریکا، باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک باعث ایجاد حدود ۲ میلیون عفونت و ۲۳۰۰۰ مرگ و میر در سال ۲۰۱۴ شده‌اند. در سال ۲۰۱۴، سازمان بهداشت جهانی از مقاومت دارویی در برابر آنتی بیوتیک‌ها به عنوان یک تهدید بزرگ جهانی نام برد. این سازمان با بررسی آمار مربوط به ۱۱۴ کشور، از افزایش مقاومت دارویی در همه نقاط جهان خبر داد و اعلام کرد جهان وارد دوره "پسا آنتی بیوتیک" شده است. دوره ای که

پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کرباپنم‌ها را هیدرولیز می‌کنند. آنزیم‌های کلاس C، که اغلب توسط کروموزوم باکتری کد می‌شوند، به کلاولانیک اسید مقاوم هستند (۱۵). بتالاکتامازهای کلاس D، به سرعت در حال گسترش بوده و طیف گسترده‌ای از سفالوسپورین‌هایی چون OXA-10 و کرباپنم‌هایی چون OXA-23 را هیدرولیز می‌کنند. این کلاس در باکتری‌های غیر تخمیری چون *Sodomonas آیروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *آسیتوباکتر باومانی* (*Acinetobacter baumannii*) یافت شده است (۱۰). کلاس‌های A، C و D در جایگاه فعال خود دارای یک سرین نوکلئوفیل حفاظت شده هستند. این سه کلاس از یک مکانیسم یکسان برای هیدرولیز و شکستن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام استفاده می‌کنند (۱۰). تعداد بسیار زیادی از مهارکننده‌ها جهت غلبه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از بتالاکتامازها طراحی و سنتز شده‌اند (۳). در این شرایط، یک مهارکننده بتالاکتاماز به همراه آنتی‌بیوتیک مربوطه تجویز می‌گردد. کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام سه مهارکننده برگشت‌ناپذیر بوده که از طریق تشکیل کمپلکس غیرفعال آسیل-آنزیم، موجب خودکشی آنزیم می‌گردند (۲۰). از سال ۱۹۹۵، یک سری جدید از باکتری‌های ESBL کلاس A بنام آنزیم‌های CTX-M در جهان پدیدار شد و اکنون به فراوانترین آنزیم‌های ESBL تبدیل گشته‌اند. آنزیم‌های CTX-M دارای شباهت توالی کمتر از ۴۰ درصد با آنزیم‌های نوع TEM و SHV می‌باشند و خود از بیش از ۴۰ عضو تشکیل شده‌اند. این آنزیم‌ها دارای اثرات هیدرولیزکننده با طیف گسترده بوده و قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌های نسل ۱ و ۲ و ۳ می‌باشند (۶ و ۸). مطالعات نشان داده است که اکثر آنزیم‌های بتالاکتاماز CTX-M که توسط *شیرشیا کلی* بیان می‌شوند باعث ایجاد مقاومت بسیار بالایی به اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها (*oximino-cephalosporins*) (سفتوتاکسیم (*cefotaxime*) و سفتریاکسون (*ceftriaxone*)) و سطوح متفاوتی از مقاومت به سفپیم (*cefepime*) و

عفونت‌های ساده‌ای که برای سالیان طولانی قابل درمان بوده‌اند، کشنده شده‌اند (۲۴). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام گروهی بزرگ و گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که حلقه بتالاکتام در ساختار مولکولی آنها وجود دارد (۱۶). فعالیت بتالاکتاماز در باکتری‌های گرم مثبتی همچون باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*Staphylococcus epidermidis*)، باکتری‌های گرم منفی مانند هموفیلوس آنفلانزا (*Haemophilus influenzae*)، نایسریا گونوره آ (*Neisseria gonorrhoeae*)، موراکسلا کاتارالیس (*Moraxella catarrhalis*)، اشیرشیا کولی (*Escherichia coli*) و گونه‌های پروتئوس (*Proteus*)، سریشیا (*Serratia*)، سودوموناس (*Pseudomonas*) و کلبسیلا (*Klebsiella*) و باکتری‌های بی‌هوازی چون گونه‌های باکتریوئیدس (*Bacterioides*) گزارش شده است (۱۶). آنزیم‌های هیدرولاز و بتالاکتاماز شایعترین علل مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند. این آنزیم‌ها تقریباً تمام آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را از طریق هیدرولیز کردن پیوند امید در حلقه بتالاکتام غیرفعال می‌کنند (۲۴). به طور روزافزون، دامنه سوبسترای بتالاکتامازها رو به گسترش می‌باشد، تاجاییکه اکنون، بتالاکتامازها یک خطر جدی برای سلامت جهانی هستند. بر اساس توالی اسید آمینه، بتالاکتامازها به چهار کلاس A، B، C و D تقسیم شده‌اند (۱). در سال ۱۹۹۵، یک طبقه بندی جدید توسط بوش و جاکوبای معرفی شد که از پروفایل مهارکننده و سوبسترا آن استفاده کردند و تلاش نمودند طبقه بندی این آنزیم‌ها، با فنوتیپ آنها در جدایه‌های بالینی (*clinical isolates*) مرتبط باشند (۷). کلاس A، بتالاکتامازهایی هستند که هم توسط کروموزوم و هم توسط پلاسمید باکتری کد می‌شوند و طیف وسیعی از آنزیم‌هایی چون TEM-1، SHV-1، CTX-M (ESBLs) و کرباپنم‌ها (مانند KPC-2) شامل می‌شوند (۳۱). متالو بتالاکتامازها، که در کلاس B طبقه بندی می‌شوند،

برای ساختار منظور گشته (۱۴) و اتمهای هیدروژن غیرقطبی حذف شدند. قبل از انجام داکینگ، جهت از بین بردن ممانعت فضایی احتمالی ساختار، با استفاده از نرم افزار گرومکس نسخه ۵٫۱ (۲۹)، و الگوریتم steepest descent ساختار آنزیم از لحاظ انرژی کمینه شد. برای انجام داکینگ مولکولی و غربالگری مجازی، ابتدا از مولکول 4-(3H-benzimidazole-3-yl)-trifluoromethyl-carboxylic acid [3-(1H-te-trazol-5-yl)-phenyl]-amide (ترکیب ۱۹) به عنوان الگو استفاده شد. ترکیب ۱۹، یک مهارکننده آنزیم بتالاکتاماز CTX-M-9 بوده و دارای ثابت مهار تجربی ۸۹ نانومولار است (۲۳). در مرحله بعد، از پایگاه داده زینک (۱۷)، ترکیبات با ۵۰ درصد شباهت با ترکیب ۱۹ انتخاب و دانلود شدند (۵۱۲۵ ترکیب). این ترکیب یک مهارکننده قوی بتالاکتاماز بوده و دارای ثابت مهار ۸۹ نانومولار است (۲۳). ساختار ترکیب ۱۹ در شکل ۱ نشان داده است. علاوه بر این پایگاه داده، از یک کتابخانه بانک دارویی دیگر شامل داروهای تصویب شده و ترکیبات تحت آزمایش (۸۷۱۷ ترکیب)، از پایگاه داده دارو جهت انجام غربالگری مجازی استفاده شد (۳۲). مجموع ترکیبات استفاده شده که در داکینگ مولکولی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت ۱۳۸۴۲ مولکول بود. جهت آماده سازی همه این ترکیبات، هیدروژن‌ها اضافه شده و بار آنها با استفاده از روش Gasteiger-Marsili محاسبه شد. سپس ساختارهای سه بعدی این ترکیبات برای مطالعات بعدی ذخیره شد.



شکل ۱- ساختار ترکیب ۱۹

سفپروم (cefpirome) می‌شوند (۵، ۶ و ۲۵). امروزه تکنیک‌هایی چون غربالگری عملی، رزونانس مغناطیسی هسته، کریستالوگرافی اشعه ایکس، طیف‌سنجی جرمی، بیوانفورماتیک، ریاضیات، مدلسازی مولکولی و مکانیک مولکولی - مکانیک کوانتومی جهت طراحی و کشف مهارکننده‌های قوی و جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴، ۱۰ و ۲۰). مطالعات نشان می‌دهد که هزینه فرآیند تولید یک داروی جدید حدود ۲/۶ میلیارد دلار است (۲۲). بنابراین بیولوژی محاسباتی و مدلسازی مولکولی می‌تواند به عنوان یک روش ارزشمند و موثر در طراحی و کشف دارو بکار گرفته شوند. غربالگری مجازی، یک تکنیک مبتنی بر جستجو و غربالگری ترکیبات مورد نظر از میان کتابخانه‌های عظیم ساختاری در محیط مجازی و کامپیوتری است. از آنجاییکه مقاومت در باکتری‌ها به شدت در حال گسترش است، ضرورت وجود یک مهارکننده جدید با ساختاری متفاوت با مهارکننده‌های بتالاکتاماز قدیمی مانند اسید کلوانیک و موثر بر علیه آنزیم‌های مسئول این مقاومت احساس می‌گردد. در این مطالعه، از غربالگری مجازی مبتنی بر داکینگ و دینامیک مولکولی جهت شناسایی مهارکننده قوی و موثر علیه CTX-M-9، یک بتالاکتاماز گروه A، استفاده شد. همچنین، ارزیابی مربوط به جذب، توزیع، متابولیسم و ترشح این ترکیب به صورت محاسباتی انجام پذیرفت. در نهایت در این مطالعه، یک مهارکننده غیر بتالاکتاماز آنزیم بتالاکتاماز با قدرت اتصال بالا و عوارض جانبی پایین از طریق مطالعات محاسباتی معرفی و ارائه شد.

## مواد و روشها

آماده‌سازی ساختارها و غربالگری مجازی: ساختار سه بعدی آنزیم بتالاکتاماز CTX-M-9 از پایگاه داده پروتئین با کد 1YLY گرفته شد (۸). با استفاده از نرم افزار AUTODOCK TOOLS مولکولهای آب حذف شدند. هیدروژن‌ها به ساختار اضافه شده، بار Gasteiger-Marsili

PME استفاده شد (۹). برای تعادل دمای از Berendsen و برای تعادل فشار از Parrinello-Rahman barostat استفاده گشت (۱۰ و ۲۰). در تمام اجراهای دینامیک مولکولی در این مطالعه، از دمای ۳۰۰ درجه کلوین و فشار ۱ اتمسفر استفاده شد و سیستم‌ها در این دما و فشار به تعادل رسیدند. هر سیستم در این مطالعه به مدت ۵۰ نانوثانیه مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. در مدت زمان ۵۰ نانوثانیه، تغییرات کنفورماسیونی زنجیره جانبی ریشه‌های آمینواسیدی به خوبی قابل ارزیابی است. خروجی اجراهای دینامیک مولکولی با نرم افزار VMD آنالیز شده و نمودارهای آن با استفاده از اکسل رسم شد.

محاسبه انرژی آزاد اتصال از روش MM/PBSA: پس از انجام دینامیک مولکولی، انرژی آزاد اتصال از طریق محاسبه فریم‌های ۱۰ نانوثانیه آخر با استفاده از نرم افزار MM/PBSA محاسبه شد. این نرم افزار، یک نرم افزار رایگان برای کاربردهای آکادمیک بوده و برای محاسبه انرژی آزاد بین دو گروه تعریف شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. اخیراً از الگوریتم MM/PBSA به عنوان تابع امتیاز دهی در طراحی محاسباتی دارو استفاده شده است. انرژی آزاد اتصال در این روش از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$G_{\text{binding}} = G_{\text{complex}} - (G_{\text{protein}} + G_{\text{ligand}})$$

که در اینجا  $G_{\text{complex}}$ ، انرژی آزاد کل کمپلکس پروتئین-مهارکننده است و  $G_{\text{protein}}$  و  $G_{\text{ligand}}$  به ترتیب انرژی آزاد کل پروتئین و مهارکننده آزاد در حلال است (۱۹).

پیش‌بینی ADME ترکیبات مورد مطالعه: خواص ADME شامل جذب، توزیع، متابولیسم و ترشح کاندیدهای دارویی نقش مهمی در تصویب این ترکیبات در فاز کارآزمایی بالینی دارد. بنابراین، این خواص توسط نرم افزار Qikprop در مجموعه شرویدینگر، برای ترکیبات مورد مطالعه در دینامیک مولکولی محاسبه شد (۲۷). تقریباً حدود ۴۰ درصد کاندیدهای دارو به دلیل خصوصیت ADME ضعیف در مرحله کارآزمایی بالینی رد می‌شوند. رد شدن

داکینگ مولکولی ترکیبات: داکینگ مولکولی ترکیبات بر علیه جایگاه فعال بتالاکتاماز با استفاده از نرم افزار Autodock vina انجام پذیرفت (۲۸). ساختار کریستالی مورد استفاده در این مطالعه دارای یک مهارکننده بود و آمینواسیدهای اطراف آن به عنوان جایگاه اتصال در جعبه داکینگ در نظر گرفته شد (۸ و ۱۰). در این مطالعات داکینگ، تمام پارامترهای نرم افزار، به عنوان پیش فرض در نظر گرفته شد. در هر بار انجام داکینگ، ساختار با کمترین انرژی داکینگ برای انجام مطالعات دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

دینامیک مولکولی: دینامیک مولکولی برای چهار سیستم مستقل شامل بتالاکتاماز آزاد، کمپلکس بتالاکتاماز: ترکیب ۱۹، کمپلکس بتالاکتاماز: ZINC33264777 و کمپلکس بتالاکتاماز: DB01753 انجام پذیرفت. دو کمپلکس حاوی بتالاکتاماز: DB01753 و ZINC33264777 بر اساس انرژی آزاد اتصال حاصل از داکینگ مولکولی برای مطالعه دینامیک مولکولی انتخاب شدند. از کمپلکس بتالاکتاماز: ترکیب ۱۹ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. تمام مطالعات دینامیک مولکولی با استفاده از نرم افزار گرومکس نسخه ۵.۱ (۲۹) و از میدان نیروی AMBER 99SB استفاده شد.  $pK_a$  ریشه‌های آمینواسیدی بتالاکتاماز توسط سرور PROPKA 2.0 محاسبه گشت تا آمینواسیدهای یونیزه شونده در حالت یونیزاسیون صحیح خود تعریف شوند (۲). بار جزئی و فایل‌های توپولوژی ترکیباتی که جهت انجام غربالگری مورد استفاده قرار گرفتند با استفاده از نرم افزار ACPYPE موجود در مجموعه ANTECHAMBER تولید شدند (۳۰). هر سیستم در یک مکعب با آب مدل TIP3P حل شده (۱۸) و با استفاده از مقادیر مناسب سدیم و کلر خنثی گشت. بهینه کردن ساختارها در دینامیک مولکولی، با استفاده از الگوریتم‌های steepest descent و conjugate gradient انجام پذیرفت. محدوده محاسباتی برهم‌کنش‌های وان‌دروالس و الکترواستاتیک به ترتیب ۱/۴ و ۰/۹ در نظر گرفته شد. جهت محاسبه برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک از

دارو در این مرحله، زیان بسیار زیادی را به شرکت‌های داروسازی و صنعت دارویی کشورها تحمیل می‌نماید. Qikprop قادر است در زمان کوتاهی و با ضریب خطای پایین، بسیاری از خصوصیات فیزیکوشیمیایی و شیمیایی مولکولهای کاندیدای دارو را پیش‌بینی کند.

**نتایج و بحث**

یکی از مشکلات بشریت در عرصه بهداشت و سلامت، مسئله مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها است. این امر موجب مرگ تعداد زیادی از افراد در این کره خاکی می‌گردد. در سالهای اخیر، مدلسازی مولکولی و بیولوژی محاسباتی جزء مهمی از روند مطالعات مربوط به طراحی و کشف دارو شده است. غربالگری مجازی یک روش محاسباتی برای شناسایی ترکیبات رهبر در یک کتابخانه بزرگ و متنوع از ترکیبات شیمیایی است. این روش محاسباتی ارزشمند برای کشف ترکیبات رهبر سریع‌تر و مقرون به صرفه‌تر از روش‌های غربالگری تجربی است. غربالگری مجازی به عنوان "ارزیابی اتوماتیک کتابخانه‌های بسیار بزرگ از ترکیبات" با استفاده از برنامه‌های کامپیوتری تعریف شده است. در این مطالعه، غربالگری مجازی با استفاده از داکینگ مولکولی در مورد ۱۳۸۴۲ ساختار مولکولی بر علیه جایگاه فعال بتالاکتاماز CTX-M-9 انجام پذیرفت. در مرحله بعد، مطالعات دینامیک مولکولی در مورد ۴ سیستم در دو حالت آنزیم آزاد و آنزیم متصل به مهارکننده انجام گرفت.

برای ترکیب الگو (ترکیب ۱۹) نیز محاسبه شد که مقدار آن ۱۱/۹۸- کیلوکالری بر مول بود. ترکیبات نشان داده شده در این جدول، دارای انرژی آزاد اتصال کمتری نسبت به ترکیب شماره ۱۹ بودند. الگوی برهم‌کنش ترکیب DB01753 با جایگاه فعال آنزیم بتالاکتاماز CTX-M-9 در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس این شکل، ۱۰ پیوند هیدروژنی بین ترکیب DB01753 و ریشه آمینواسیدهای Ala 272، Ser 274، Ser 130، Asn 132، Ser 237، Asn 104، Asp 240 و Arg 276 تشکیل شده است. مطالعات بر پایه آنالیز ساختار کریستالی نشان داده است که ریشه آمینواسید Asp 240 نقش مهمی در برهم‌کنش قطبی با مهارکننده‌های سنتز شده بتالاکتاماز CTX-M-9 دارد (۲۳). همچنین ریشه آمینواسیدهای Tyr 105، Pro 167 و Ala 272 با این مهارکننده برهم‌کنش هیدروفوب می‌دهند.

**آنالیز داده‌های دینامیک مولکولی:** انحراف جذر میانگین مربعات یا RMSD یکی از پارامترهای معمول در مطالعات دینامیک مولکولی است که جهت اطمینان از به تعادل رسیدن سیستم طی شبیه‌سازی اندازه‌گیری می‌شود. مقادیر بالای RMSD نشان‌دهنده انعطاف پذیری بالای پروتئین طی زمان شبیه‌سازی است. شکل ۳ مقادیر RMSD چهار سیستم شامل شامل بتالاکتاماز آزاد، کمپلکس بتالاکتاماز: ترکیب ۱۹، کمپلکس بتالاکتاماز: ZINC33264777 و کمپلکس بتالاکتاماز: DB01753 را طی ۵۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی نشان می‌دهد. بر اساس این شکل، RMSD پروتئین آزاد در ۵۴۰۰ پیکوثانیه برابر ۱/۱ آنگستروم بود. سپس در ۲۶۰۰۰ پیکوثانیه به ۱/۳ آنگستروم افزایش پیدا کرد. پس از به تعادل رسیدن و تغییرات و نوسات جزئی، در نهایت در ۴۷۰۰۰ پیکوثانیه به ۱/۷ آنگستروم افزایش پیدا کرد. چندین تغییر ناگهانی RMSD در مورد بتالاکتاماز آزاد مشاهده شد که می‌تواند مربوط به خصوصیت انعطاف پذیری بالای این آنزیم‌ها در حالت آزاد و در محلول

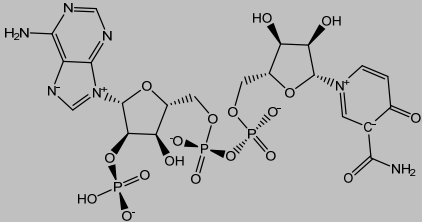
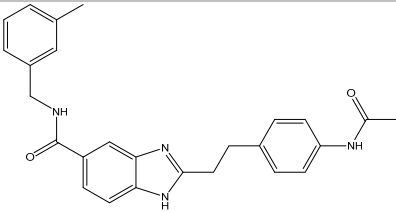
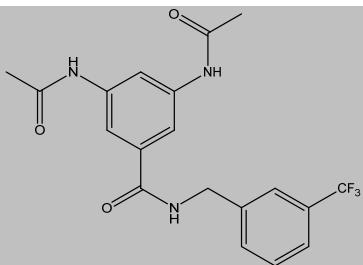
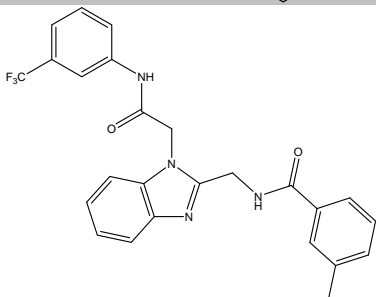
**آنالیز داده‌های داکینگ مولکولی:** نتایج مربوط به قویترین مهارکننده‌های حاصل از داکینگ مولکولی بر اساس مقدار انرژی آزاد اتصال در جدول ۱ نشان داده شده است. ترکیب با کد DB01753 از پایگاه داده دارو دارای کمترین مقدار انرژی آزاد بود (۱۶/۶۲- کیلوکالری بر مول). در جایگاه‌های بعدی، ترکیبات مربوط به پایگاه داده زینک با کدهای ZINC25981582، ZINC33264777 و ZINC40297472 می‌باشند. همچنین، انرژی آزاد اتصال

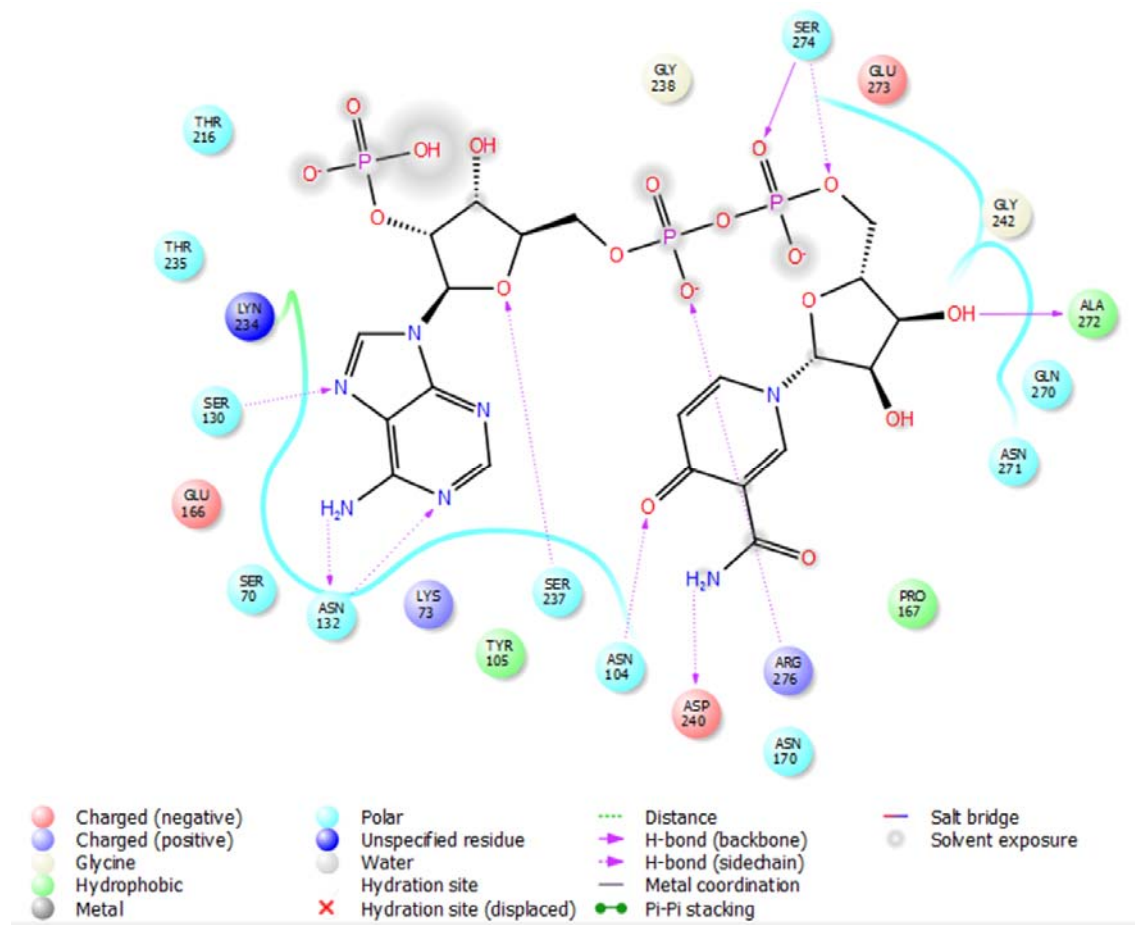
دارو در این مرحله، زیان بسیار زیادی را به شرکت‌های داروسازی و صنعت دارویی کشورها تحمیل می‌نماید. Qikprop قادر است در زمان کوتاهی و با ضریب خطای پایین، بسیاری از خصوصیات فیزیکوشیمیایی و شیمیایی مولکولهای کاندیدای دارو را پیش‌بینی کند.

شبه سازی دینامیک القا شده است. در هر صورت اتصال ترکیب ZINC33264777 به بتالاکتاماز، موجب کاهش مقادیر RMSD شد (۰/۹ آنگستروم). بر اساس شکل ۳، بتالاکتاماز متصل به ZINC33264777 پس از ۵۰۰۰ پیکوثانیه به تعادل رسید. مهار کننده DB01753 پس از اتصال به آنزیم، موجب افزایش میانگین RMSD به ۱/۲ آنگستروم شد.

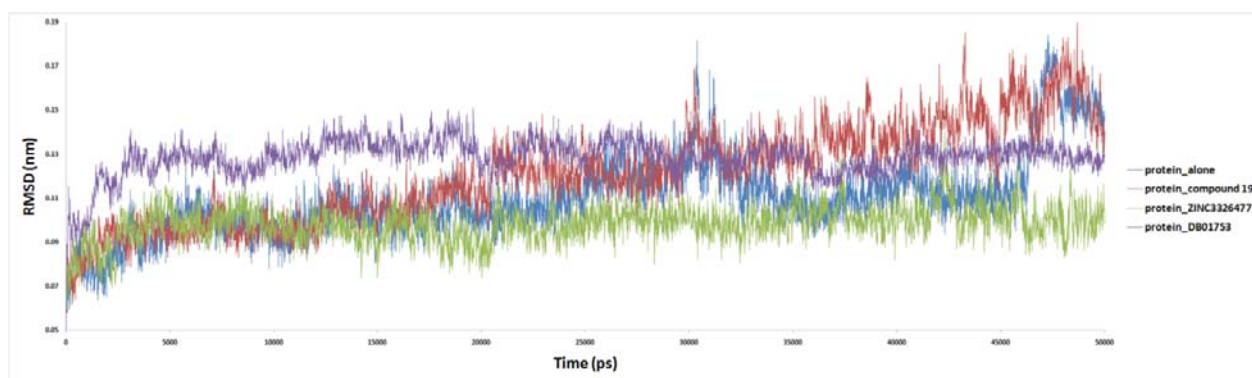
باشد. این آنزیم ها دارای طیف وسیعی از سوبستراها بوده و این تغییرات زیاد کنفورماسیونی و انعطاف پذیری بالا جهت اتصال به این سوبستراها صورت میگیرد (۱۰ و ۲۰). میانگین مقادیر RMSD آنزیم آزاد برابر ۱,۱ آنگستروم بود. این مقدار برای کمپلکس بتالاکتاماز: ترکیب ۱۹ برابر ۱/۲ آنگستروم بود. بنابراین با اتصال ترکیب ۱۹ به جایگاه فعال بتالاکتاماز، افزایش جزئی تحرک اسکلت اصلی آنزیم طی

جدول ۱- ساختار دوبعدی و انرژی آزاد اتصال بهترین ترکیبات حاصل از داکینگ مولکولی توسط نرم افزار Autodock vina. برای مقایسه، انرژی داکینگ ترکیب شماره ۱۹ نیز محاسبه شده است.

Compound	Structure	ZINC database or DRUGBANK code	Docking energy (kcal/mol)
1		DB01753	-16.62
1		ZINC33264777	-15.11
2		ZINC25981582	-12.97
3		ZINC40297472	-12.05
4 <sup>a</sup>	Figure 1	compound 19	-11.98



شکل ۲- الگوی برهم کنش ترکیب DB01753 با جایگاه فعال آنزیم بتالاکتاماز CTX-M-9



شکل ۳- مقادیر RMSD چهار سیستم شامل بتالاکتاماز آزاد، کمپلکس بتالاکتاماز: ترکیب ۱۹، کمپلکس بتالاکتاماز: ZINC33264777 و کمپلکس بتالاکتاماز: DB01753 طی ۵۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی.

آمینواسیدها را طی زمان شبیه‌سازی نشان می‌دهد. مقادیر بالای RMSF، میزان انعطاف پذیری بالای ریشه‌های آمینواسیدها را نشان می‌دهد. مقادیر RMSF طی ۵۰

این الگوی تغییرات RMSD شبیه به رفتار کمپلکس بتالاکتاماز: ترکیب ۱۹ بود. جذر میانگین مربعات نوسانات یا RMSF، میزان تحرک و انعطاف پذیری ریشه‌های

در سه کمپلکس بتالاکتاماز: ZINC33264777، بتالاکتاماز: DB01753 و بتالاکتاماز: ترکیب ۱۹ نشان می‌دهد. میانگین تشکیل پیوند هیدروژنی بین مهار کننده و آنزیم طی زمان شبیه سازی برای ترکیب ۱۹ و ZINC33264777، به ترتیب ۵/۱۳ و ۱/۴۸ بود. میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی برای ترکیب DB01753 برابر ۵/۵۳ بود که بیشتر از دو ترکیب دیگر می‌باشد. بر اساس شکل ۶، بعد از گذشت ۴۰۰۰۰ پیکوثانیه، تعداد پیوندهای تشکیل شده بین ترکیب ۱۹ و آنزیم کاهش یافت. این در حالی بود که پس از گذشت ۳۷۰۰۰ پیکوثانیه، تعداد پیوندهای هیدروژنی بین ترکیب DB01753 افزایش ناگهانی داشت و تا پایان زمان شبیه سازی، این افزایش، پایدار ماند. بنابراین، میتوان استنباط نمود که پایداری ترکیب DB01753 نسبت به ترکیبات ZINC33264777 و ۱۹ در جایگاه فعال آنزیم بیشتر است. پایداری بیشتر این کمپلکس میتواند منجر به کاهش ثابت مهار ترکیب DB01753 گردد. برای بررسی پایداری پیوند هیدروژنی طی زمان شبیه سازی، فاصله بین اتمهای درگیر در پیوند هیدروژنی بین ترکیب DB01753 و آنزیم محاسبه شد (شکل ۷). فاصله بین ۴ اتم از ریشه های آمینو اسیدی Glu 166 (اتم OE1)، Arg 276 (اتمهای HH21 و HH12) و Tyr 105 (اتم HH) جایگاه فعال با اتمهای H231، O29، O38 و O45 از مولکول DB01753 در ۱۵۰۰۰ پیکوثانیه آخر شبیه سازی دینامیک مولکولی، به زیر ۳ آنگستروم کاهش یافت. این داده ها نشان میدهد که با گذشت زمان، پیوندهای هیدروژنی پایدار بین ترکیب DB01753 و آنزیم بتالاکتاماز تشکیل شده که خود موجب پایداری کمپلکس آنزیم: DB01753 می‌شود.

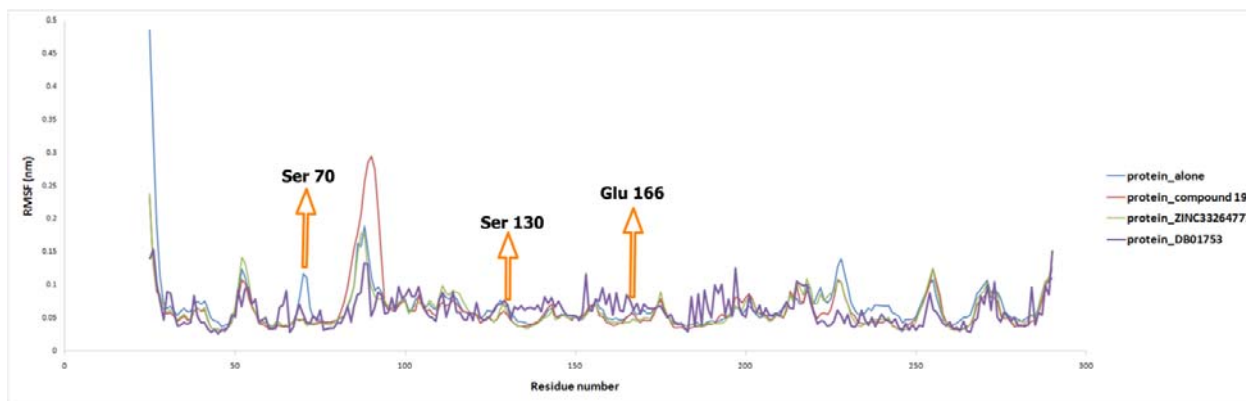
**محاسبه انرژی آزاد اتصال مهارکننده ها با روش MM/PBSA:** انرژی آزاد اتصال بین مهارکننده ها و جایگاه فعال آنزیم بتالاکتاماز در ۱۰ فریم آخر شبیه سازی دینامیک مولکولی برای هر کدام از سیستم ها محاسبه شد (جدول ۲).

نانوئانیه زمان شبیه سازی برای هر چهار سیستم در شکل ۴ نشان داده شده است. مقدار RMSF آمینواسید Ser 70 در آنزیم آزاد برابر ۱/۱ آنگستروم است. این باقی مانده آمینواسیدی به آلکوکساید تبدیل شده و مسئول حمله نوکلئوفیلی به کربن کربونیل حلقه بتا لاکتام است. متعاقباً، حدواسط آسیل آنزیم در جایگاه فعال آنزیم تولید میشود (۱۱). شکل ۴ نشان میدهد که در حضور ترکیب ۱۹، RMSF ریشه Ser 70 به ۰/۴۸ آنگستروم کاهش می‌یابد. این مقدار در حضور ZINC33264777 و DB01753 به ترتیب ۰/۴۶ و ۰/۵۷ آنگستروم است. یکی از دلیل کاهش RMSF این آمینواسید می‌تواند برهمکنش با مهارکننده ها طی زمان شبیه سازی می‌باشد. دلیل دیگر می‌تواند به دلیل القای تغییرات کنفورماسیونی سرین ۷۰ در حضور مهار کننده ها و برهمکنش غیرکوالان این ریشه آمینواسیدی با ریشه های دیگر باشد. علاوه بر آمینواسید Ser 70، ریشه آمینواسیدهای Lys 73، Ser 130 و Glu 166 در شکستن پیوند آمیدی حلقه بتا لاکتام نقش دارند. اتصال ترکیب شماره ۱۹ و ZINC33264777 به جایگاه فعال آنزیم، موجب کاهش مقادیر RMSF مربوط به Ser 130 و Glu 166 می‌گردد (۱۳). Ser 130 بین هلیکس شماره ۶ و ۷ قرار گرفته و تشکیل لوپ حفاظت شده SDN می‌دهد (۲۰). همچنین گزارش شده است که این آمینواسید نقش بسیار مهمی در مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها دارد (۲۱). بنابراین با کاهش تحرک این آمینواسیدها می‌توان احتمال داد که این مهارکننده ها با آمینواسیدهای ذکر شده برهم کنش داده اند. شکل ۵، نحوه برهم کنش ترکیب DB01753 را پس از ۵۰ نانوئانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی نشان می‌دهد. بر اساس این شکل، بین ریشه آمینواسیدهای Ser 274، Asn 104، Glu 166، Ser 237 و Tyr 105 با DB01753 پیوند هیدروژنی تشکیل می‌شود. همچنین، Tyr 105 با پورین مولکول DB01753 برهم کنش از نوع پای پای استاکینگ می‌دهد. شکل ۶، تعداد پیوندهای هیدروژنی بین مهارکننده ها و آنزیم بتالاکتاماز را

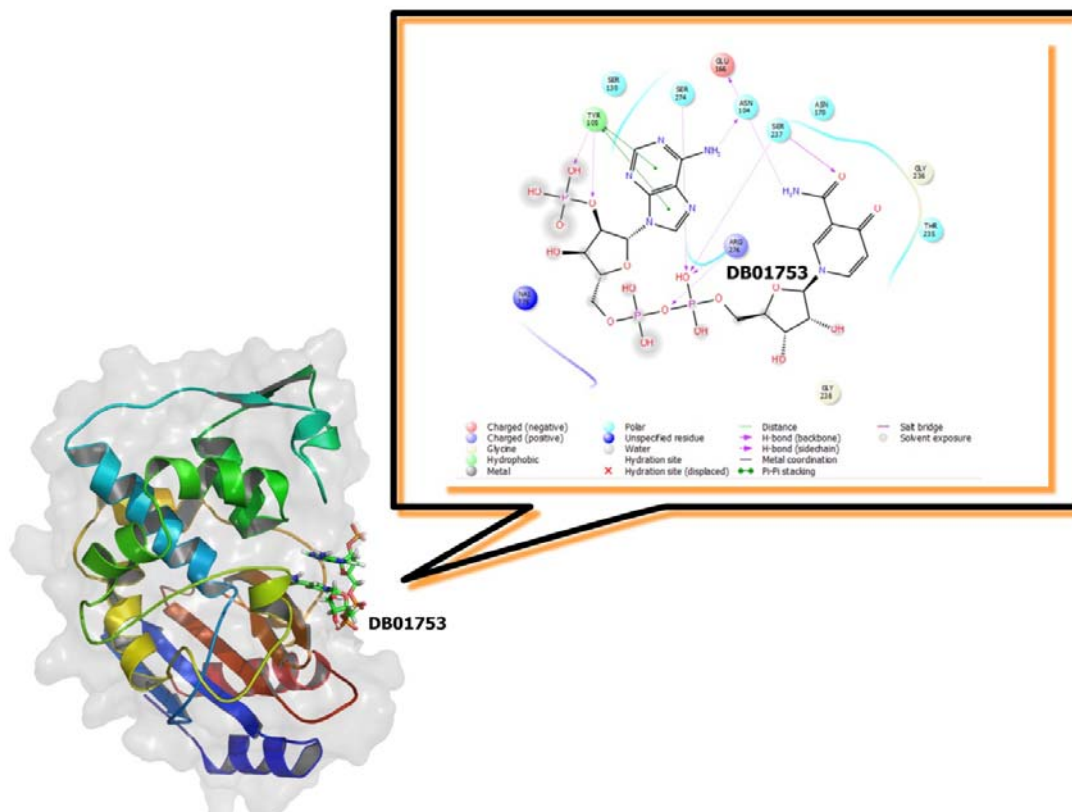


مول بود. انرژی آزاد الکتروستاتیک این ترکیب برابر  $550/8$  کیلوژول بر مول است. مقدار انرژی حلال پوشی برای ترکیب ۱۹، ZINC33264777 و DB01753 به ترتیب  $266/4$ ،  $103/1$  و  $596/6$  بود. بر اساس داده های جدول ۲، انرژی مساحت سطح در معرض حلال هر سه مهار کننده تقریباً شبیه به هم بود.

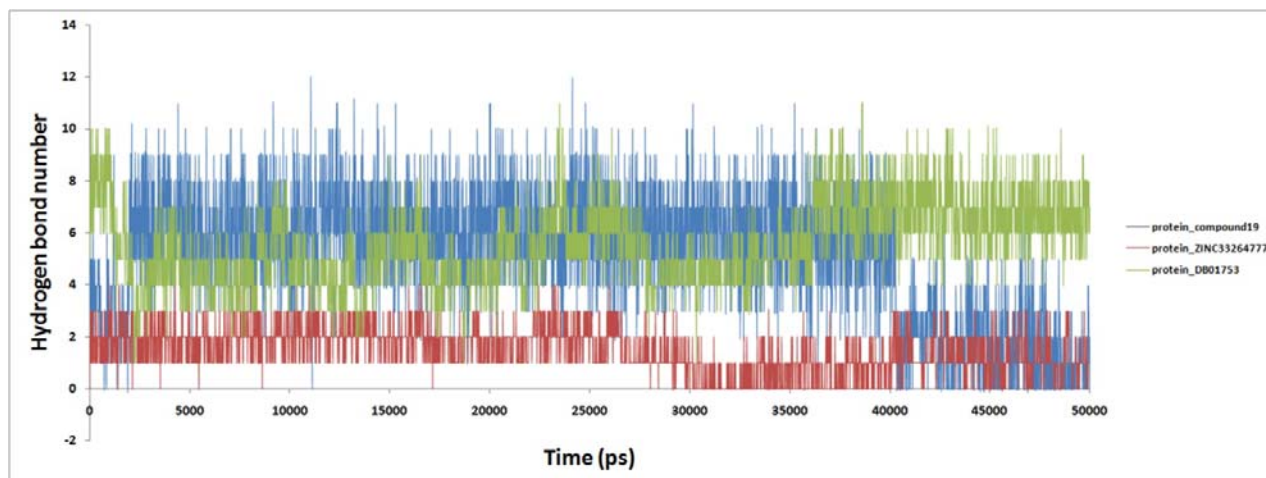
در این روش، اطلاعات دقیقتری در مورد انرژی آزاد اتصال، نسبت به روشهای داکینگ مولکولی حاصل میگردد. مقدار انرژی آزاد اتصال بین مهار کننده و آنزیم رابطه عکس با میزان تمایل مهارکننده برای اتصال به آنزیم دارد. کمترین مقدار انرژی آزاد اتصال، مربوط به ترکیب DB01753 با انرژی آزاد اتصال برابر  $111/5$  کیلوژول بر



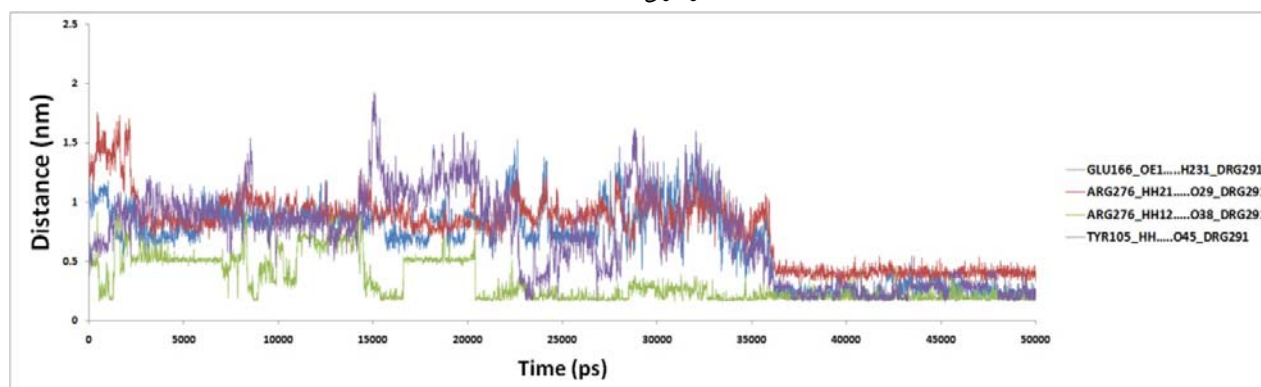
شکل ۴- مقادیر RMSF چهار سیستم شامل بتالاکتاماز آزاد، کمپلکس بتالاکتاماز: ترکیب ۱۹، کمپلکس بتالاکتاماز: ZINC33264777 و کمپلکس بتالاکتاماز: DB01753 طی ۵۰ نانوثانیه زمان شبیه سازی دینامیک مولکولی.



شکل ۵- نحوه برهم کنش ترکیب DB01753 با جایگاه فعال بتالاکتاماز پس از ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی.



شکل ۶- تعداد پیوند هیدروژنی بین مهارکننده های ترکیب ۱۹، ZINC33264777 و DB01753 با بتالاکتاماز طی ۵۰ نانوثانیه زمان شبیه سازی دینامیک مولکولی.



شکل ۷- فاصله های محاسبه شده بین ۴ اتم از ریشه های آمینو اسیدی (اتم OE1)، Arg 276 (اتمهای HH21 و HH12) و Tyr 105 (اتم HH) جایگاه فعال با اتمهای O29، H231، O38، O45 از مولکول DB01753 طی ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی.

شرویدینگر، برخی خواص فارماکو-کینتیکی پیش بینی شد (جدول ۳). پارامترهای محاسبه شده شامل ضریب توزیع آب/ اکتانل، نفوذپذیری سلول Caco-2، ضریب توزیع خونی/ مغزی، درصد جذب دهانی و فعالیت علیه سیستم عصبی مرکزی بود (۱۰). پارامترهای فارماکو-کینتیکی تمامی سه ترکیب در دامنه قابل قبولی بوده و می توانند جهت استفاده در انسان به کار گمارده شوند (جدول ۳).

### نتیجه گیری

برای سالیان متمادی، کشف دارو با استفاده از روش آزمون و خطا در مورد کتابخانه های مولکولی بزرگ انجام می پذیرفت.

همچنین داده ها نشان دادند که مولکول DB01753 تمایل بیشتری به اتصال به آنزیم بتالاکتاماز داشته و با قدرت بیشتری آنرا می تواند مهار کند. در هر صورت، برای کاهش انرژی آزاد اتصال این مولکول، و تولید ترکیبی با انرژی آزاد اتصال کمتر، می توان با تغییرات کووالان بروی ساختار آن، انرژی حلال پوشی آنرا کاهش داد بطوریکه ترکیب با انرژی کمتری در آب حل شود. کاهش گروههای هیدروفوب در مولکول، در این مورد می تواند کمک کننده باشد.

پیش بینی ADMET مهار کننده ها: در مورد ترکیب ۱۹، ZINC33264777 و DB01753 با استفاده از نرم افزار

جدول ۲- محاسبه انرژی آزاد اتصال بین مهارکننده‌ها و آنزیم بتالاکتاماز CTX-M-9 با استفاده از روش MM/PBSA

Energy (kJ/mol)	beta-lactamase: compound 19	beta-lactamase: ZINC33264777	beta-lactamase: DB01753
$\Delta E_{vdw}$	-149.428 ± 9.355	-159.458 ± 7.404	-141.363 ± 8.546
$\Delta E_{elect}$	-173.004 ± 18.289	-20.32 ± 5.812	-550.846 ± 30.102
$\Delta E_{solv}$	266.426 ± 10.495	103.197 ± 5.475	596.633 ± 32.562
$\Delta E_{SASA}$	-14.865 ± 0.538	-17.154 ± 1.397	-15.948 ± 0.808
$\Delta G_{binding}$	-70.871 ± 11.012	-93.735 ± 9.627	-111.524 ± 25.991

جدول ۳- محاسبه ADME مهارکننده‌های مورد استفاده در این مطالعه

Molecule ID	QPlogPo/w <sup>a</sup>	QPPCaco <sup>b</sup>	QPlogBB <sup>c</sup>	Percent Human Oral Absorption <sup>d</sup>	Lipinski Rule of 5 Violations	Jorgensen Rule of 3 Violations	CNS <sup>e</sup>
DB01753	-1.839	100	-2.907	80	1	1	--
ZINC33264777	4.688	593	-1.389	100	0	1	--
compound 19	-0.602	5	-0.649	23	1	1	-

<sup>a</sup> Predicted octanol/water partition coefficient (reasonable value from -2.0 to 6.5).

<sup>b</sup> Predicted apparent Caco-2 cell permeability in nm/s (<25 poor, >500 great).

<sup>c</sup> Predicted brain/blood partition coefficient (reasonable value from -3.0 to 1.2).

<sup>d</sup> Human Oral Absorption in GI (±20%) (<25% is poor).

<sup>e</sup> Predicted central nervous system activity on a -2 (inactive) to +2 (active) scale.

بتالاکتاماز CTX-M-9، نوسانات ریشه سرین ۷۰ کاهش می‌یابد. براساس محاسبه تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مهارکننده و آنزیم، ترکیب DB01753 با میانگین تعداد پیوند هیدروژنی ۵/۵۳ طی زمان شبیه‌سازی، بیشترین برهم‌کنش پیوند هیدروژنی را نسبت به دو ترکیب دیگر با آنزیم داشت. محاسبه انرژی آزاد اتصال نشان داد که ترکیب DB01753 دارای کمترین انرژی آزاد اتصال بوده و بیشترین قدرت مهارکنندگی را نسبت به دیگر ترکیبات بررسی شده در این مطالعه داراست. محاسبات ADME نشان داد که هر سه ترکیب DB01753، ZINC33264777 و ترکیب ۱۹ در دامنه قابل قبولی برای استفاده در انسان وجود دارند. در نهایت، پیشنهاد میشود که ترکیب DB01753 یک کاندیدای خوب برای مهار آنزیم بتالاکتاماز CTX-M-9 بوده و بنابراین میتوان از این مولکول برای آزمایشات تکمیلی تجربی و گسترش دارویی استفاده نمود.

همچنانکه در دیگر علوم نیز مشاهده شده، با ظهور کامپیوترهای قوی به عرصه زیست‌شناسی، درصد خطا در فرآیند طراحی و کشف دارو بسیار کمتر شده است. در این مطالعه، با استفاده از روشهای محاسباتی داکینگ و دینامیک مولکولی، غربالگری مجازی علیه جایگاه فعال آنزیم بتالاکتاماز CTX-M-9 انجام شد. این آنزیم یکی از مهمترین عوامل ایجاد مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیکهای واجد حلقه بتالاکتام است. بنابراین یک هدف مناسب جهت طراحی و کشف دارو می‌باشد. مطالعات شبیه‌سازی نشان داد که دو ترکیب ZINC33264777 و DB01753 با آمینواسیدهای حفاظت شده جایگاه فعال آنزیم پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنشهای آبگریز تشکیل می‌دهند. آنالیز RMSD نشان داد که تغییرات کنفورماسیونی بتالاکتاماز در حضور مهارکننده‌ها افزایش می‌یابد. همچنین، آنالیز RMSF آشکار ساخت که با اتصال مهارکننده‌های ترکیب ۱۹، ZINC33264777 و DB01753 به جایگاه فعال آنزیم

## منابع

1. Ambler R. 1980. The Structure of beta-Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 289:321-31.
2. Bas DC., Rogers DM.Jensen JH. 2008. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein–ligand complexes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 73:765-83.
3. Bassetti M., Righi E.Viscoli C. 2008. Novel  $\beta$ -lactam antibiotics and inhibitor combinations. *Expert opinion on investigational drugs*, 17:285-96.
4. Bebrone C., Lassaux P., Vercheval L., Sohier J-S., Jehaes A, et al. 2010. Current challenges in antimicrobial chemotherapy. *Drugs*, 70:651-79.
5. Bethel CR., Taracila M., Shyr T., Thomson JM., Distler AM, et al. 2011. Exploring the inhibition of CTX-M-9 by  $\beta$ -lactamase inhibitors and carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55:3465-75.
6. Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48:1-14.
7. Bush K., Jacoby GA.Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39:1211.
8. Chen Y., Shoichet B.Bonnet R. 2005. Structure, function, and inhibition along the reaction coordinate of CTX-M  $\beta$ -lactamases. *Journal of the American Chemical Society*, 127:5423-34.
9. Darden T., York D.Pedersen L. 1993. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics*, 98:10089-92.
10. Davari K., Nowroozi J., Hosseini F., Sepahy AA.Mirzaie S. 2017. Structure-based virtual screening to identify the beta-lactamase CTX-M-9 inhibitors: An in silico effort to overcome antibiotic resistance in E. coli. *Computational Biology and Chemistry*, 67:174-81.
11. Delmas J., Leyssene D., Dubois D., Birck C., Vazeille E, et al. 2010. Structural insights into substrate recognition and product expulsion in CTX-M enzymes. *Journal of molecular biology*, 400:108-20.
12. Drawz SM.Bonomo RA. 2010. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*, 23:160-201.
13. Fiset O., Morin S., Savard P-Y., Lagüe P.Gagné SM. 2010. TEM-1 backbone dynamics—insights from combined molecular dynamics and nuclear magnetic resonance. *Biophysical journal*, 98:637-45.
14. Gasteiger J.Marsili M. 1980. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, 36:3219-28.
15. Ghafourian S., Sadeghifard N., Soheili S.Sekawi Z. 2014. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*, 17:11-22.
16. Holten KB. 2000. Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *American family physician*, 62.
17. Irwin JJ.Shoichet BK. 2005. ZINC— a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, 45:177-82.
18. Jorgensen WL., Chandrasekhar J., Madura JD., Impey RW.Klein ML. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of chemical physics*, 79:926-35.
19. Kumari R., Kumar R., Consortium OSDD.Lynn A. 2014. g\_mmpbsa: A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of chemical information and modeling*, 54:1951-62.
20. Mirzaie S., Najafi K., Hakhmaneshi MS., Shahverdi AR.Fathi F. 2015. Investigation for antimicrobial resistance-modulating activity of diethyl malate and 1-methyl malate against beta-lactamase class A from *Bacillus licheniformis* by molecular dynamics, in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33:1016-26.
21. Morin S.Gagné SM. 2009. NMR Dynamics of PSE-4  $\beta$ -Lactamase: An Interplay of ps-ns Order and  $\mu$ s-ms Motions in the Active Site. *Biophysical journal*, 96:4681-91.
22. Mullard A. 2014. New drugs cost US [dollar] 2.6 billion to develop. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13:877.
23. Nichols DA., Jaishankar P., Larson W., Smith E., Liu G, et al. 2012. Structure-based design of

- potent and ligand-efficient inhibitors of CTX-M Class A  $\beta$ -lactamase. *Journal of medicinal chemistry*, 55:2163-72.
24. Olsen I. 2015. New promising  $\beta$ -lactamase inhibitors for clinical use. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34:1303-8.
  25. Pitout JD., Gregson DB., Campbell L., Laupland KB. 2009. Molecular characteristics of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53:2846-51.
  26. Rice LB. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. The University of Chicago Press.
  27. Schrödinger Release 2017-1: QikProp S, LLC, New York, NY, 2017.
  28. Trott O., Olson A.J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31:455-61.
  29. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, 26:1701-18.
  30. Wang J., Wang W., Kollman P.A., Case D.A. 2006. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of molecular graphics and modelling*, 25:247-60.
  31. Watkins R.R., Papp-Wallace K.M., Drawz S.M., Bonomo R.A. 2013. Novel  $\beta$ -lactamase inhibitors: a therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance. *Frontiers in microbiology*, 4.
  32. Wishart D.S., Feunang Y.D., Guo A.C., Lo E.J., Marcu A., et al. 2017. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic acids research*, 46:D1074-D82.

## Inhibitor discovery against beta lactamase CTX-M-9 from *E.coli* by molecular docking, MM/PBSA and molecular dynamics studies

Davari K.<sup>1</sup>, Nowroozi J.<sup>1</sup>, Hosseini F.<sup>1</sup>, Akhavan Sepahy A.<sup>1</sup> and Mirzaie S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Dept. of Biochemistry, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, I.R. of Iran

### Abstract

Nowadays, antibiotic resistance in bacteria is a major challenge for human health. These new emerging resistances cause ineffectiveness of antibiotics and raising the severity of diseases and treatment costs. One of the most abundant antibiotic resistances is beta lactam antibiotic resistance, especially penicillin and cephalosporin resistances. In most cases, a converting enzyme, named beta lactamase is involved. These enzymes hydrolyse the beta lactam-containing antibiotics. Based on Ambler classification, and with regard to their amino acid sequence similarities, these enzymes are classified to four groups; A, B, C and D. In the current study, among 13842 structures, we employed the molecular docking method in virtual screening process to select the potent and effective inhibitors against beta lactamase CTX-M-9 from *E.coli*. The structures with the lowest free binding energy were conducted to molecular dynamics (MD) studies. Our molecular modeling analysis demonstrates that a compound with Drug-Bank ID of DB01753 has ideal characteristics as potent beta lactamase CTX-M-9 inhibitor. After the 50 ns MD studies, DB01753 interacted with beta lactamase residues Ser 237, Asn 104, Glu 166, Ser 274 and Tyr 105 via hydrogen bonding. MM/PBSA analysis showed that the free energy of binding between DB01753 and beta lactamase was  $-111.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$ . Also, ADME analysis exhibited that all pharmacokinetic parameters were in reasonable range.

**Key words:** beta lactamase, CTX-M-9, molecular docking, molecular dynamics