

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
УФИМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК
Уфимский институт химии

На правах рукописи



БОРИСЕВИЧ СОФИЯ СТАНИСЛАВОВНА

**АЛГОРИТМ ОПИСАНИЯ МЕХАНИЗМА ПРОТИВОВИРУСНОЙ
АКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРОВ МЕМБРАННЫХ ВИРУСНЫХ
БЕЛКОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

(1.4.16 Медицинская химия)

Диссертация на соискание ученой
степени доктора химических наук

Научные консультанты:

д.х.н. О. И. Яровая

д.б.н. В. В. Зарубаев

Уфа – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Актуальность темы исследования	4
Цель работы	5
Научная новизна	5
Теоретическая и практическая значимость	7
Основные положения, выносимые на защиту:	7
Личный вклад автора	8
Публикации и апробация работы.	8
Структура и объем работы	9
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	10
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1. Вирусные белки слияния	13
1.2. Сайты связывания ингибиторов вирусных белков слияния I типа	18
1.2.1. Гемагглютинин вируса гриппа	18
1.2.2. Гликопротеин (спайк-белок) коронавирусов	33
1.2.3. F-протеин респираторно-синцитиального вируса (РСВ)	49
1.2.4. Гликопротеин вируса Эбола	57
1.3. Другие мембранные белки	66
1.3.1. Протонный M2 канал вируса гриппа	66
1.3.2. Высококонсервативный мембранный белок ортопоквирусов р37	72
1.4. Методы молекулярного моделирования	78
1.5. Заключение	83
2. МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	85
2.1. Объекты исследования	85
2.2. Подготовка протеина и лиганда	86
2.2.1. Подготовка протеина	86
2.2.2. Предсказание третичной структуры белка	86
2.2.3. Подготовка лигандов и оценка константы кислотности	87
2.3. Поиск потенциального сайта связывания	87
2.4. Молекулярный докинг	91
2.4.1. Алгоритм молекулярного докинга	91
2.4.2. Выбор оптимальной докинг позиции	92
2.4.3. Ранжирование результатов расчетов и результатов экспериментов	93
2.4.4. Оценка константы диссоциации	95

2.5. Молекулярная динамика и метадинамика	96
2.5.1. Подготовка системы к расчетам	96
2.5.2. Анализ результатов расчетов	97
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	100
3.1. Ингибирующая активность малых молекул в отношении мембранных белков вируса гриппа	100
3.1.1. Фармакофорный профиль сайта связывания ТБГХ/умифеновира	100
3.1.2. Оценка аффинности малых молекул к сайту связывания ТБГХ/умифеновира	104
3.1.3. Оценка аффинности малых молекул к альтернативным сайтам связывания	111
3.1.4. Связывание камфецина влияет на патогенность мутантного штамма	141
3.1.5. Большим молекулам – большой сайт связывания	145
3.1.6. Камфецин и гинсамид – потенциальные ингибиторы протонного М2 канала вируса гриппа	156
3.2. Ингибирующая активность малых молекул в отношении поверхностного белка SARS-CoV-2	163
3.2.1. Поиск места связывания умифеновира	163
3.2.2. Оценка аффинности производных эфиров (–)-борнеола к сайту связывания S-белка	180
3.2.3. Механизм противовирусной активности производных усниновой кислоты	186
3.3. Ингибирующая активность малых молекул в отношении поверхностного F-белка РСВ	197
3.3.1. Фармакофорный профиль сайта связывания	197
3.3.2. Оценка аффинности производных кумаринов к сайту связывания ингибиторов F-белка	199
3.3.3. Могут ли методы молекулярной динамики и метадинамики объяснить разную противовирусную активности разных стереоизомеров?	215
3.3.4. Аналоги борнеола – ингибиторы F-белка	220
3.4. Ингибирующая активность малых молекул в отношении вируса Эбола	230
3.4.1. Аффинность производных камфена к сайтам связывания НА вируса гриппа	232
3.4.2. Аффинность производных камфена к сайту связывания ингибиторов GP вируса Эбола	237
3.4.3. Картирование сайтов связывания ингибиторов поверхностных гликопротеинов вируса гриппа и вируса Эбола	239
3.5. Фармакофорный профиль ингибиторов поверхностных вирусных белков I типа	244
3.6. Ингибирующая активность малых молекул в отношении ортопоксвирусов	246
3.6.1. Предсказание вторичной структуры р37 и сайта связывания тековиримата	246
3.6.2. Производные (+)-камфоры и (–)-фенхона – ингибиторы р37	252
3.6.3. Производные адамантана – ингибиторы р37	264
3.6.4. Построение прогностической модели	268
3.6.4. Фармакофорная модель ингибитора р37	274
3.7. Методология расчета, или как правильно моделировать вирусные белки	277
4. ВЫВОДЫ	281
5. ПРИЛОЖЕНИЯ	283

5.1. Лиганд-белковые комплексы	283
5.2. Анализ молекулярно-динамических симуляций	289
5.2.1. Протонный M2-канал вируса гриппа	289
5.2.2. Поверхностный S-белков вируса SARS-CoV-2	291
5.2.3 Поверхностный F-белок РСВ	298
5.2.4. Мембранный вирусный белок р37	301
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	303

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Пандемия COVID-19, вызванная распространением коронавируса SARS-CoV-2 убедительно показала, что поиск и разработка новых малотоксичных противовирусных препаратов является актуальной задачей медицинской химии и вирусологии. Современные подходы к направленному созданию химических соединений с заданным типом биологической активности обязательно требуют понимания механизма действия противовирусной активности, для чего необходимо привлечение методов молекулярного моделирования. Теоретические методы расчета применяются при обосновании выбора биологических мишеней, при исследовании физико-химической природы взаимодействия активного соединения с белком, при выявлении взаимосвязи между химической структурой и механизмом противовирусного (или любого другого) действия исследуемых соединений. Под методами молекулярного моделирования (молекулярный докинг, молекулярная динамика и метадинамика) понимается совокупность подходов, включающих этапы анализа взаимосвязи «структура-активность» лигандов, изучение структурных особенностей белков в качестве потенциальных биологических мишеней, поиск и описание вероятных сайтов связывания малых молекул, а также оценка аффинности лигандов к рассматриваемым сайтам связывания.

Как и любые другие методы исследования физико-химических свойств молекул, методы молекулярного моделирования имеют свои возможности и границы применимости. Понимание границ применимости методов молекулярного моделирования позволяет ответить на многие вопросы, которые возникают у исследователей, занимающихся разработкой новых биологически активных соединений. Анализ результатов теоретических расчетов должен проводиться в совокупности с данными биологических экспериментов, иначе многие или даже все полученные выводы, основанные только на теории, могут оказаться спекулятивными и не соответствующими действительности.

В рамках данной работы разработаны теоретические положения, которые можно использовать для обоснования выбора биологической мишени, описания механизма противовирусного действия биологически активных соединений, для систематизации рекомендаций структурных модификаций агентов, проявляющих противовирусную активность широкого спектра, а также для создания прогностической модели для оценки заданной биологической активности исследуемых структур.

Цель работы

Целью данной работы является создание теоретической методологии, позволяющей дать рекомендации для обоснования выбора биологической мишени среди мембранных вирусных белков, описания механизма противовирусной активности малых молекул и разработки прогностической модели для оценки биологической активности новых соединений.

Для достижения целей были поставлены и решены следующие задачи:

1. детальный анализ структурных особенностей и механизма действия мембранных вирусных белков: гемагглютинина и протонного M2 канала вируса гриппа, поверхностного S-белка коронавируса SARS-CoV-2, F-белка респираторно-синцитиального вируса (PCV), гликопротеина вируса Эбола и мембранного белка р37 ортопоксвирусов;
2. картирование известных сайтов связывания указанных белков с малыми молекулами, изображение их фармакофорного профиля с указанием ключевых аминокислотных остатков; описание природы взаимодействия референсных (если таковые имеются) лигандов с аминокислотами сайтов связывания;
3. поиск и изучение взаимосвязи между энергетическим профилем конформационных переходов гемагглютинина вируса гриппа с патогенностью дикого и камфецин-резистентного штаммов;
4. определение и аннотирование сайтов связывания соединений, влияющих на фузогенную активность гликопротеинов вируса гриппа, коронавируса SARS-CoV-2 и ингибиторов мембранного белка р37 вирусов ортопоксвирусов;
5. оценка аффинности малых молекул к сайтам связывания мембранных вирусных белков (гемагглютинина вируса гриппа, S-белка SARS-CoV-2, F-белка PCV, гликопротеина вируса Эбола, протонного канала M2 вируса гриппа и мембранного белка ортопоксвирусов р37); описание природы и динамики взаимодействия лигандов с аминокислотами сайта связывания; определение взаимосвязи между химической структурой лигандов и сродства к сайтам связывания в совокупности с данными биологических тестов; создание рекомендаций к структурной модификации лигандов для увеличения их аффинности;
6. разработка и создание прогностической модели для предсказания противовирусной активности новых соединений в отношении ортопоксвирусов.

Научная новизна

В результате проведенного исследования впервые описан и аннотирован альтернативный сайт связывания ингибиторов гемагглютинина вируса гриппа – малых молекул, состоящих из жесткого гидрофобного каркаса и полярного заместителя. Сайт связывания расположен в месте

пептида слияния гемагглютинина рядом с дисульфидным мостиком, соединяющим две субъединицы белка.

Впервые при помощи методов молекулярной метадинамики объяснен механизм снижения патогенности камфецин-резистентного штамма вируса гриппа, связанный с изменением энергетического профиля конформационных переходов гемагглютинина, что позволяет расширить границы применимости подобного теоретического подхода.

Впервые построен и динамически аннотирован полноразмерный протонный M2 канал, геометрические параметры которого могут быть в дальнейшем использованы для разработки и создания новых ингибиторов M2 канала, а также описания механизма их противовирусной активности.

Впервые в работе при помощи молекулярного моделирования описано мультитаргетное действие на мембранные белки вируса гриппа каркасных производных на основе терпеновых соединений, которое может заключаться в совместном ингибировании фузогенной активности гемагглютинина и блокировании протонного M2 канала.

Впервые использование метода мультилигандной динамики, позволило аннотировать потенциальный сайт связывания умифеновира в поверхностном S-белке SARS-CoV-2, расположенный в области гептадного повтора и пептида слияния. Фармакофорный профиль данного сайта был сравнен с фармакофорным профилем сайта связывания, расположенного в области пептида слияния стеблевой части гемагглютинина вируса гриппа. Результаты теоретического анализа позволили предположить, что соединения, подавляющие фузогенную активность гемагглютинина, могут также ингибировать S-белок. Данные предположения впоследствии были подтверждены результатами биологических тестов с использованием псевдовиральной системы.

Проведенный анализ фармакофорного сайта связывания ингибиторов F-белка респираторно-синцитиального вируса позволил объяснить противовирусную активность производных фенилкумаринов и N-содержащих производных эфиров (–)-борнеола, которая может быть связана с влиянием малых молекул на F-белок.

Впервые выявлена взаимосвязь между химической структурой ряда лигандов и фармакофорным профилем сайтов связывания ингибиторов поверхностных белков вируса гриппа, коронавируса SARS-CoV-2, вируса Эбола и РСВ, которая может быть использована для разработки рекомендаций структурной модификации лигандов с целью повышения их противовирусной активности.

Разработана и подтверждена прогностическая модель для теоретической оценки противовирусной активности в отношении *vaccinia virus* (VV) для ряда производных адамантана. Описаны границы применимости данного подхода.

Теоретическая и практическая значимость

В результате диссертационного исследования проведена систематизация знаний об алгоритмах и методах молекулярного моделирования и о границах их применимости. Предложена методология использования современных методов молекулярного моделирования для исследования механизма противовирусной активности соединений и создания прогностической модели для оценки фармакологического потенциала новых структур. Обоснована важность сочетания методов молекулярного моделирования с биологическими тестами. Подобная методика позволяет получить максимально достоверную информацию о природе взаимодействия исследуемых лигандов и вирусных белков, а также сформулировать рекомендации к дальнейшей структурной оптимизации активных соединений. Данная методология, безусловно, будет полезна исследователям и может быть применена для изучения других видов биологической активности. Результаты диссертационной работы могут быть использованы для разработки новых соединений, проявляющих противовирусную активность, в том числе и противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Механизм противовирусной активности каркасных производных на основе терпеновых соединений заключается в следующем: малые молекулы связываются с гемагглютинином вируса гриппа в месте протеолиза и стабилизируют конформацию белка, что затрудняет его последующие конформационные перестройки, предшествующие процессу слияния вирусной и клеточной мембран.
2. Аминокислотная замена V615L в месте протеолиза гемагглютинина приводит к стабилизации к префузионной конформации белка, что может сказаться на патогенности вируса гриппа.
3. Каркасные производные терпеновых соединений, среди которых камфецин и гинсамид, ингибируют активность НА и, вероятнее всего, блокируют M2 канал вируса гриппа, что позволяет рассматривать их в качестве мультитаргетных противогриппозных агентов.
4. Противовирусная активность в отношении SARS-CoV-2 ряда малых молекул – ингибиторов входа связана с их влиянием на вторичную структуру S-белка: умифеновир и ряд производных эфиров борнеола располагаются в области гептадных повторов второй субъединицы S-белка, затрудняя его конформационные переходы; производные усниновой кислоты связываются в N-терминальном домене первой субъединицы S-белка, влияя на подвижность рецептор-связывающего домена.

5. Малые молекулы, содержащие жесткий каркасный фрагмент и полярные заместители, могут одновременно связываться в сайтах связывания, расположенных в области гептадных повторов поверхностных белков I типа, а именно: гемагглютинаина вируса гриппа, S-белка SARS-CoV-2, F-белка РСВ и гликопротеина белка вируса Эбола.
6. Разработанная на основании молекулярного моделирования прогностическая модель позволяет оценить противовирусную активность производных адамантана в отношении *vaccinia virus*. Данный подход может быть использован для разработки прогностических моделей для предсказания других видов активности, при условии обоснованного выбора биологической мишени и достоверных данных о значениях, характеризующих биологическую активность соединений, полученных в результате ряда *in vitro* экспериментов.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в выборе темы диссертационной работы, постановке цели и задач данного исследования, в организации теоретических расчетов, выбора протоколов молекулярного моделирования, в обобщении полученных результатов и формулировке научных положений, выносимых на защиту. Решение каждой конкретной биохимической задачи требует глубокого понимания функциональных и структурных особенностей белков. Все работы, связанные с изучением биологических функций мембранных вирусных белков методами молекулярного моделирования, принадлежат лично автору.

Публикации и апробация работы.

По материалам диссертации опубликовано **26** статей в научных журналах, рекомендованных ВАК, из которых **19** в журналах первого и второго квартилей (**Q1, Q2**) по медицинской химии, вирусологии, химии и фармакологии. Результаты работы были представлены в виде устных и пленарных докладов на международных и российских конференциях: на XXIV и XXV симпозиумах «Биоинформатика и компьютерное моделирование лекарств» г. Москва (2018, 2019 гг.); на Всероссийской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы органической химии» п. Шерегеш, Кемеровской области (2018, 2022 гг.); на 4-й и 5-й Российских конференциях по медицинской химии с международным участием, г. Екатеринбург (2019 г.), г. Волгоград (2022 г.); на Юбилейной V Международной конференции «Молекулярный и биологические аспекты Фармацевтики и Фармакологии» г. Судак, Крым (2019 г.); на Симпозиуме по системной биологии, биоинформатике и биомедицине (Symposium Systems Biology, Bioinformatics and Biomedicine SBioMed-2020) г. Новосибирск (2020 г.); на Четвертой международной конференции «Физика –

наукам о жизни» г. Санкт-Петербург (2021 г.); на первой и второй Всероссийских школах для молодых ученых по медицинской химии г. Новосибирск (2021 г.), г. Санкт-Петербург (2023 г.); на Международной конференции по химии «Байкальские чтения-2023» г. Иркутск (2023 г.); на I междисциплинарной всероссийской молодежной научной школе-конференции с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» г. Казань (2023 г.); на Симпозиуме по биоинформатике и компьютерному конструированию лекарств (XXIX Symposium on Bioinformatics and Computer-Aided Drug Discovery) (2023 г.).

Структура и объем работы

Диссертация включает введение, в котором обоснована актуальность, научная новизна и практическая значимость темы исследования, сформулированы цели и задачи. Литературный обзор посвящен анализу сайтов связывания ингибиторов вирусных мембранных белков в совокупности с данными биологических тестов и результатов молекулярного моделирования. Методы и объекты исследования описывают особенности протокола и алгоритма методов молекулярного докинга и динамики. Заостряется внимание на корректной подготовке к расчетам лиганда и белка, а также особенностям ранжирования результатов расчетов и экспериментальных данных. Приведены результаты, заключение и основные выводы. Работа изложена на 332 страницах машинописного текста, содержит 170 рисунков, 40 таблиц, список цитируемой литературы (325 литературных источников) и приложения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

$\Delta G_{\text{MM-GBSA}}$ (ΔG_{bind}) – энергия связывания лиганда и белка, оцененная на основании диэлектрической модели Борна

ACE2 (Angiotensin-converting enzyme) – ангиотензин-превращающий фермент (АПФ2)

ACE2-RBD-nArb (Angiotensin-converting enzyme – Receptor binding domain – Arbidol) – модельная система комплекса РСД-АПФ2 коронавируса с n молекулами Арбидола

BFD (Big Fantastic Database) – база данных, содержащая геометрические параметры пространственных белковых структур

CEV – ассоциируемый с клеткой оболочечный вирус

CCR5 (C-C chemokine receptor type 5) – рецептор хемокина 5

CD4 (cluster of differentiation 4) – мономерный трансмембранный гликопротеин

CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) – рецептор хемокинов

CoV – коронавирус

Clash (столкновения) – стерические затруднения, возникающие при расположении лиганда в сайте связывания, вызванные, нежелательными взаимодействиями между атомами лиганда и боковых цепей а.о. сайта связывания

CMRV – вирус оспы верблюдов

CTD – С-терминальный (концевой) домен

CPH – камфецин

DS – docking score (балл стыковки), энергетическая характеристика расположения лиганда в сайте связывания

ECT – вирус эктромелии

EEV – внеклеточный оболочечный вирус

F-белок – гликопротеин респираторно-синцитиального вируса

F₁ – первая субъединица F-гликопротеина респираторно-синцитиального вируса

F₂ – вторая субъединица F-гликопротеина респираторно-синцитиального вируса

FP – пептид слияния

GP – гликопротеин вируса Эбола

GIN – гинсамид

HA – гемагглютинин вируса гриппа.

HA₁ – первая субъединица гемагглютенина (глобулярная головка)

HA₂ – вторая субъединица гемагглютенина (стеблевая часть)

HIV-1 – вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1)

HR – гептадные повторы

- HTS – высокопроизводительный скрининг
- IAV – вирус гриппа А
- IBV – вирус гриппа В
- IEV – внутриклеточный оболочечный вирус
- IFD – протокол принудительной стыковки
- IMV – внутриклеточный зрелый вирус
- LA – линолевая кислота (ЛК)
- LDDT – тест на локальную разницу расстояний
- M2 IAV – трансмембранный белок M2 вируса гриппа
- MERS-CoV – ближневосточный респираторный синдром
- MPVX – вирус оспы обезьян
- NTD – N-терминальный (концевой) домен
- RBD – рецептор-связывающий домен (РСД) коронавируса
- RBD-nArb – модельная система, в которой на один РСД коронавируса приходится n молекул Арбидола
- RBS – рецептор-связывающий сайт (РСС) гемагглютинаина вируса гриппа
- RMSD – (root-mean-square deviation) среднеквадратичное отклонение положений атомов
- RMSF – (root mean square fluctuation) среднеквадратичное смещение положений атомов
- протеина используется для анализа локальных изменений атомов в боковой цепи протеина
- RSV – респираторно-синцитиальный вирус
- PIV – вирус парагриппа
- QM – квантовая механика (квантово-химические расчеты)
- QM/MM – квантовая механика/молекулярная механика
- S – спайк-белок или гликопротеин коронавируса
- S_1 – первая субъединица S-белка коронавируса
- S_2 – вторая субъединица S-белка коронавируса
- SARS – тяжелый острый респираторный синдром
- SUG-RBD-nArb – модель гликозилированного РСД коронавируса с n молекулами Арбидола
- TEVC – метод двухэлектродной фиксации потенциала
- TBEV – вирус клещевого энцефалита
- TMD – трансмембранный домен
- VAR – вирус натуральной оспы
- VSV – вирус везикулярного стоматита
- VV – вирус осповакцины

А.о. – аминокислотный остаток

АПФ2 – ангиотензин-превращающий фермент

ЛК – линолевая кислота

МД – молекулярная динамика

РСА – рентгеноструктурный анализ

РСД – рецептор-связывающий домен

РСС – рецептор-связывающий сайт

ТБГХ – трет-бутил гидрохинон

ТМД – трансмембранный домен

ЦОГ-1 – циклооксигеназа

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Вирусные белки слияния

Вирусные инфекции составляют основную часть инфекционной патологии человека. Вирусы являются облигатными клеточными паразитами и, в своем жизненном цикле, зависят от клеточных сигнальных и синтетических цепей, при помощи которых реализуется синтез основных вирусных компонентов и сборка из них вирусного потомства. По морфологическому строению вирусы делятся на оболочечные, т. е. имеющие билипидную мембрану, окружающую вирусный капсид, и безоболочечные.

Важным этапом в жизненном цикле любого оболочечного вируса в процессе проникновения и инфицирования клетки является слияние вирусной мембраны с мембраной клетки-мишени [1–4]. Все оболочечные вирусы, включая смертельные человеческие патогены, такие как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус Эбола или коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2), обеспечивают слияние оболочки вируса и клеточной мембраны при помощи белков слияния [4,5]. Основное назначение белков слияния этих вирусов заключается в связывании с рецептором – белком, расположенным на клеточной мембране – с последующим конформационными перестройками, которые в итоге приводят к объединению липидных бислоев и формированию поры слияния, через которую вирусный геном попадает в цитоплазму клетки. Вирусные белки оболочки, таким образом, несут две функции – связывание с клеткой и слияние мембран. Эти функции могут быть совмещены в одном белке или выполняться разными белками. На основе структурного сходства вирусные белки слияния разделяют на три основных класса. Первый класс белков слияния (рисунк 1–1А) включает в себя поверхностные белки вирусов семейств *Retroviridae* (вирус иммунодефицита человека, транс-мембранный протеин gp41)[6,7], *Filoviridae* (вирус лихорадки Эбола, GP2) [8], *Orthomyxoviridae* (вирус гриппа, HA) [9,10], *Paramyxoviridae* (парагрипп, F-белок) [11], *Coronaviridae* (коронавирусы, S- белок)) [12],

Pneumoviridae (респираторно-синцитиальный вирус, F-белок) [13] и представляют собой гомотримерные образования, состоящие из трёх идентичных субъединиц. Они содержат α -спиральные структуры и пептид слияния, расположенный ближе к N-концу и скрытый в середине белкового тримера. Механизмы слияния у этих белков схожий и реализуются при помощи гептадных повторов (HR).

Белки слияния второго класса характерны для семейств *Flaviviridae* (Е белки вирусов лихорадки Денге, Зика, желтой лихорадки) и *Bunyavirales* (вирусы Хантаан и Пуумала) [3,4]. Мономеры белков слияния состоят из трех основных глобулярных доменов, которые, преимущественно, составлены из β -слоев (рисунк 1–1Б), со скрытым во внутренних петлях пептидом слияния.

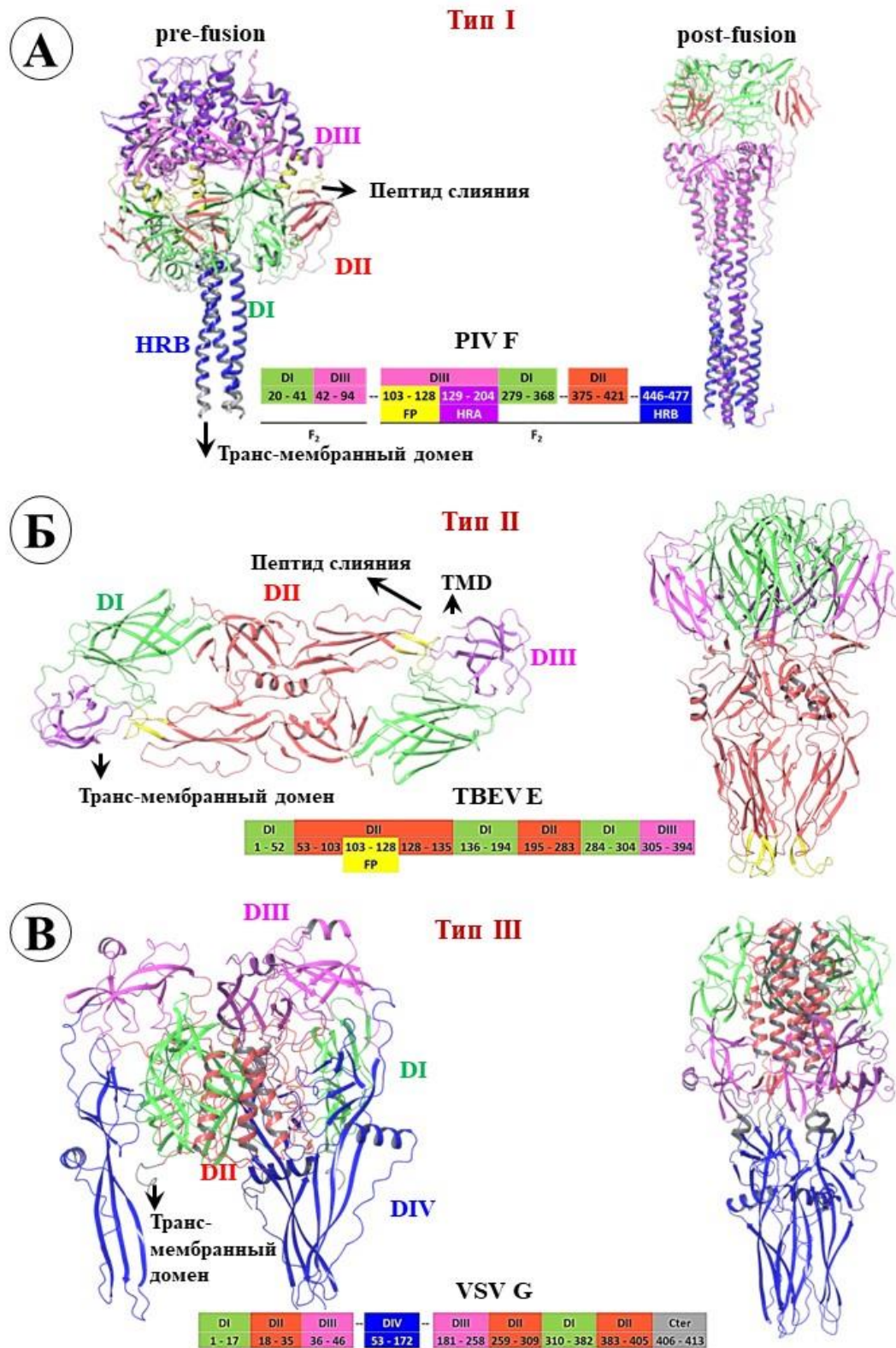


Рисунок 1-1 – Структурные особенности белков слияния по данным рентгеноструктурного анализа [14]: А – префузионная и постфузионная конформации F-белка парагриппа PIV F (PDB коды 2B9B [15] и 1ZTM [11], соответственно; Б – префузионная и постфузионная конформации E белка вируса клещевого энцефалита TBEV E (PDB коды 1SVB [16] и 1URZ [17], соответственно; В – префузионная и постфузионная конформации гликопротеина белка вируса везикулярного стоматита VSV G (PDB коды 5I2S [18] и 5I2M [19], соответственно.

В отличие от белков I и II типов, в структуре белков слияния III типа, состоящих из α -спиралей и β -листов, присутствует дополнительный глобулярный домен (рисунок 1–1В). Белок состоит из трех протомеров с рядом α -спиралей, расположенных в центре белка. Белки данного класса характерны для семейств *Rhabdoviridae* (вирус везикулярного стоматита, белок G), *Herpesviridae* (вирус простого герпеса I типа, белок gB) и *Baculoviridae* (бакуловирус, белок gp64) [2,3].

На рисунке 1–2 представлены два поверхностных белка вируса гриппа (А) и спайк-белка коронавируса SARS-CoV-2 (Б).

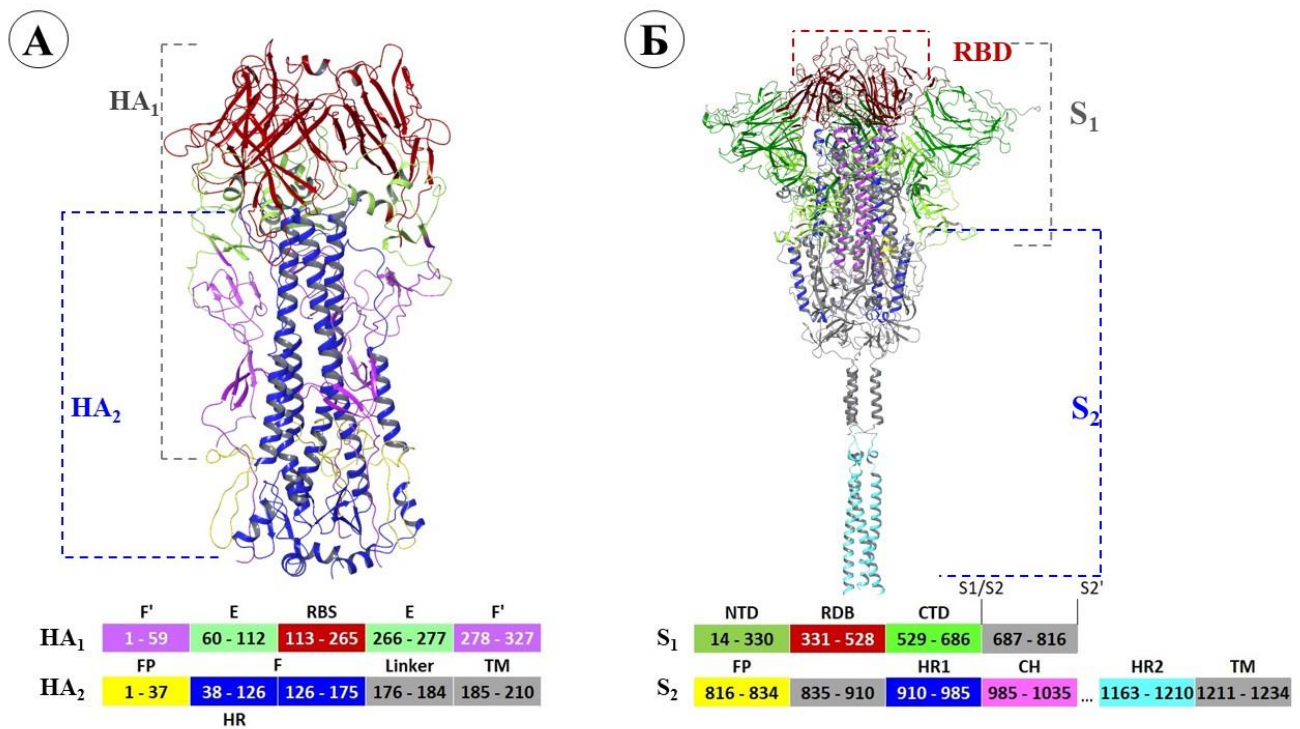


Рисунок 1-2 – Структурные особенности гемагглютинаина вируса гриппа и S-белка коронавируса: А – визуализация гемагглютинаина была произведена на основании PDB кода 6Y5G [10]. Аминокислотные последовательности соответствуют [20,21]: F,F' – слияния; Е – остаточная эстераза, RBS – рецептор-связывающий сайт, FP – пептид слияния, HR – гептадный повтор, TM – трансмембранный домен. Б – визуализация S-белка проводилась на основании PDB кода 6VXX [22]. Аминокислотные последовательности соответствуют [12]: NTD – N-терминальный домен; RBD –рецептор связывающий домен; CTD – C-терминальный домен; S1/S2, S2' – сайты протеолиза; FP – пептид слияния; HR – гептадный повтор, CH – центральный гептад; TM –трансмембранный домен.

Безусловно, вирус гриппа и коронавирусы относятся к принципиально разным семействам вирусов. Однако их поверхностные белки являются белками слияния первого типа. Оба белка состоят из двух субъединиц. В первой локализован рецептор-связывающий сайт (в случае HA) или домен (в случае S-белка), ключевая роль которого заключается в связывании с клеточными рецепторами хозяина. Гептадные повторы второй субъединицы участвуют в структурных перестройках белка при переходе из префузионной и постфузионную

конформации, с последующим слиянием вирусных и клеточных мембран. Несмотря на заметные различия в структурах протеина, именно наличие схожих гептадных повторов позволяет считать, что механизм слияния вирусных и клеточных мембран у этих вирусов схожий.

Большинство вирусных белков слияния претерпевают существенные внутренние конформационные изменения для объединения вирусной и клеточной мембран. Для слияния мембран необходимо привести два отдельных билипидных слоя клеточной и вирусной мембран в тесный контакт, а затем объединить их в один [5]. Очевидно, что подобный процесс протекает через преодоление высокого кинетического барьера, но с точки зрения термодинамики данный процесс является выгодным [4].

Рассмотрим модель слияния (рисунки 1–3) вирусной и клеточной мембран на примере белка слияния I класса. Похожие процессы также происходят в белках слияния II и III класса. Поверхностный вирусный белок располагается на поверхности вирусной мембраны, представленной на рисунке 1–3 желтым цветом. Первым этапом (рисунки 1–3, А → Б) механизма слияния является протеолитическое расщепление (праймирование) вирусного белка клеточной протеазой, что приводит к раскрытию высоко гидрофобного пептида слияния или петли слияния. В случае белков I класса поверхностный белок подвергается протеолитической обработке непосредственно. Для белков II класса протеолитическому расщеплению подвергается не вирусный белок, а связывающийся с ним клеточный белок-партнер «шаперон» [3,4]. В ряде белков III класса могут сочетаться особенности первых двух. Однако для рабдовирусов, чьи белки слияния принадлежат к III классу, очевидный прайминг отсутствует и большинство конформационных переходов обратимы [3]. Праймирование переводит белок в некоторое метастабильное, т. е. термодинамически невыгодное состояние Б, в ожидании инициирующего процесса, например понижения pH среды.

Следующим ключевым этапом процесса является переход префузионной и постфузионную конформацию в результате связывания лиганда (рисунки 1–3, Б → В). Например, в случае с активацией гемагглютинаина вируса гриппа лигандом является протон: конформационные изменения протеина происходят при пониженной pH среды [10]. В случае ВИЧ конформационные перестройки инициируются связыванием с рецептором CD4 и ко-рецепторами CCR5 или CXCR4 [7]. Конформационные перестройки в белке приводят к образованию промежуточной структуры, называемой пре-шпилька В. Доказательства образования подобной структуры на примере гемагглютинаина вируса гриппа весьма веские [10]. Кроме того, исследования других типов белков слияния позволяют предположить, что данный умеренно долгоживущий промежуточный продукт В характерен для большинства поверхностных белков, с учетом их структурных особенностей [3], в том числе и для S-белка SARS-CoV-2 [23].

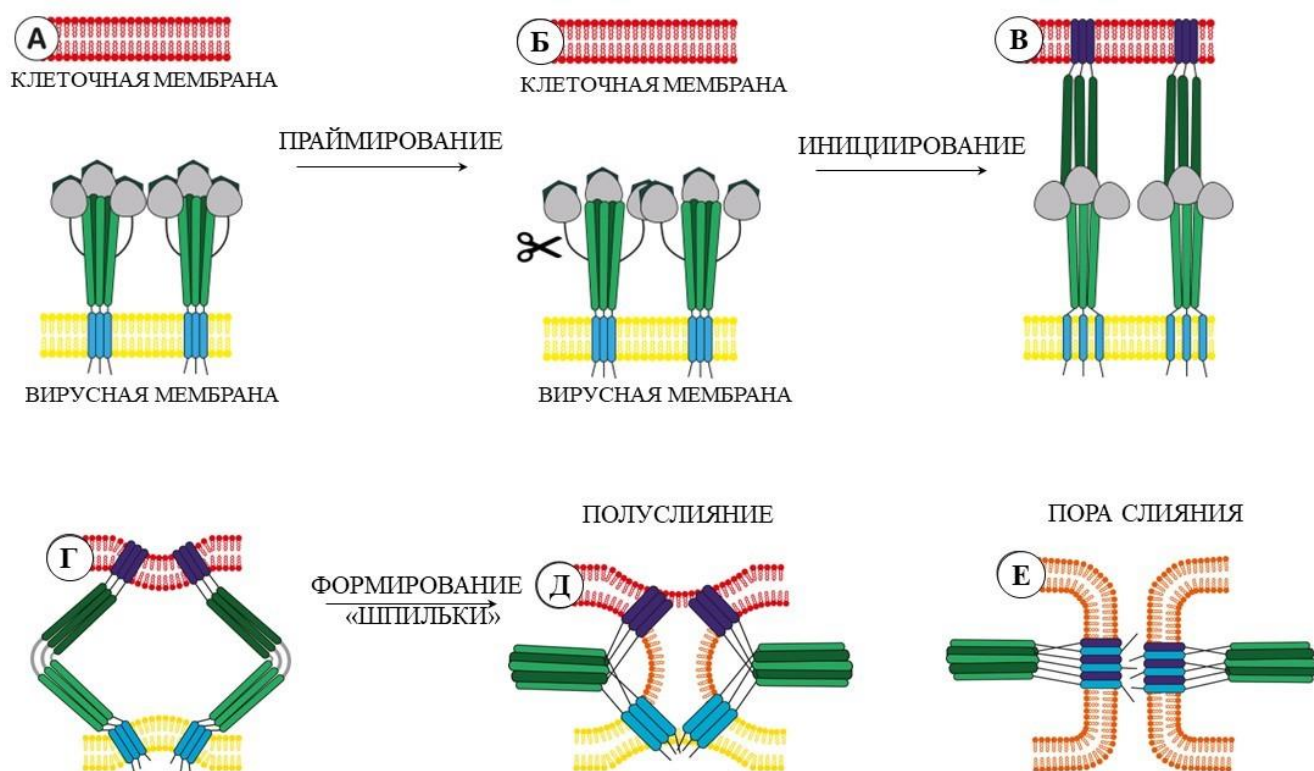


Рисунок 1-3 – Модель слияния вирусной и клеточной мембран (изображение модифицировано на основании [4]).

Далее конформационные перестройки в пре-шпильке **В** сближают N- и C-концы гептадных повторов, притягивая вирусную и клеточную мембраны друг к другу, с формированием некоторого метастабильного состояния **Г**. Гептадные повторы формируют пучок из шести спиралей, с образованием так называемой «шпильки», в результате чего мембрана клетки и вирусная мембрана достигают состояния полуслияния **Д**. Далее процесс продолжается до полной интеграции мембран с образованием поры слияния **Е**, через которую генетический материал вируса проникает в клетку-хозяина. При этом конечная структура тримера шпилек **Д** характерна для всех поверхностных вирусных белков слияния [3–5].

В литературном обзоре в основном представлены результаты исследований методами молекулярного моделирования, нацеленные на поиск новых ингибиторов поверхностных вирусных белков, а именно гемагглютинаина вируса гриппа, S-белка SARS-CoV-2, F-белка респираторно-синцитиального вируса и гликопротеина (GP) вируса Эболы. Показаны сайты связывания известных ингибиторов входа упомянутых белков, с описанием фармакофорных профилей сайта и функциональных аминокислотных остатков (а.о.). PDB коды поверхностных вирусных белков в комплексе с их ингибиторами представлены в [приложении таблица 5–1](#).

1.2. Сайты связывания ингибиторов вирусных белков слияния I типа [24].

1.2.1. Гемагглютинин вируса гриппа

1.2.1.1. Структура и функция гемагглютинина

Гемагглютинин (НА) вируса гриппа представляет собой гликопротеин, состоящий из трех идентичных субъединиц, каждый из которых состоит из варибельного глобулярного домена НА₁, связывающегося с клеточным рецептором, и более консервативной стеблевой части НА₂ (рисунок 1–4А).

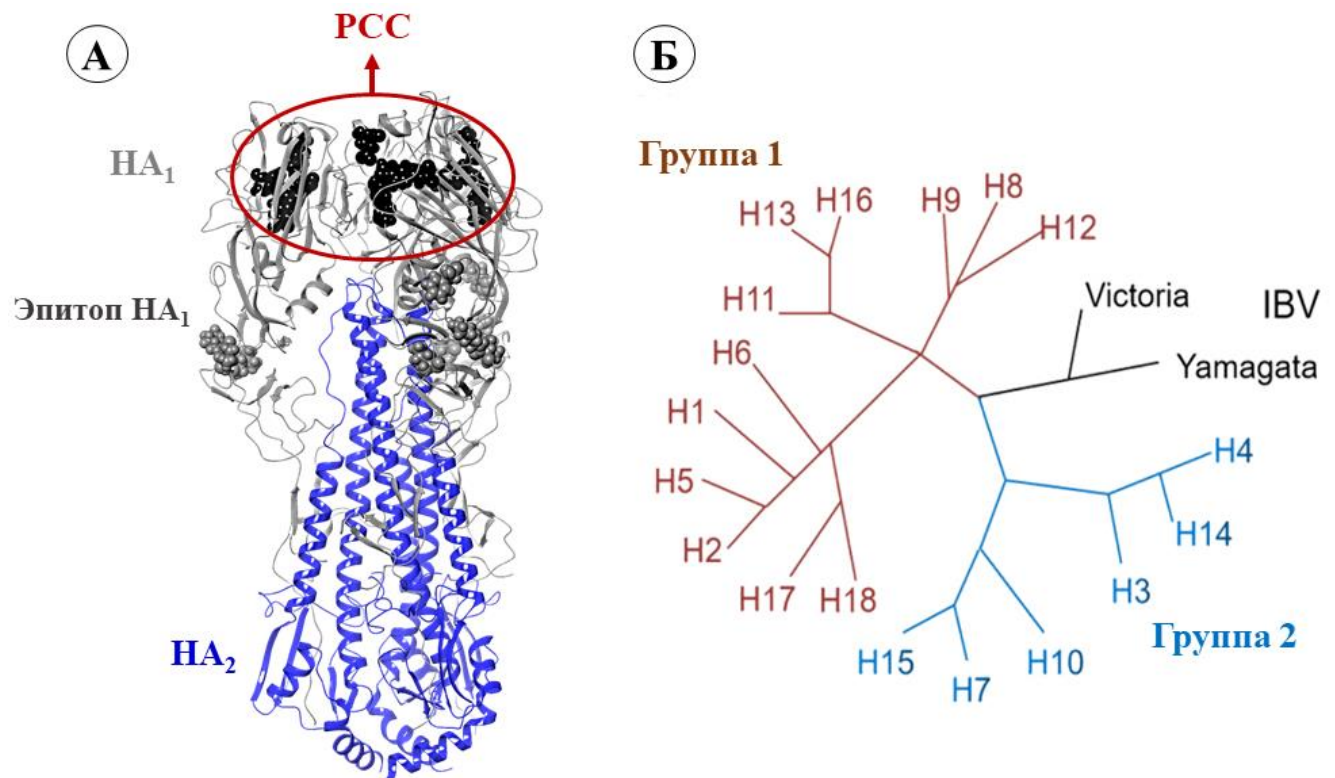


Рисунок 1-4 – Визуализация третичной структуры гемагглютинина: А – структура гемагглютинина соответствует PDB [14] коду 6FC5 [25]: темно-серым цветом показаны аминокислоты, участвующие в связывании с антителами (Abs/Fab) [26], черным-цветом выделены аминокислоты, входящие в рецептор-связывающий сайт (РСС) и связывающиеся с остатками сиаловых кислот [27]; Б – филогенетическое дерево НА вируса гриппа.

Ключевая проблема, с которой сталкиваются разработчики новых ингибиторов НА, это его высокая разнообразность. В течение всего времени существования гриппа происходит адаптация вируса к организму хозяина, и как результат – возникновение мутаций, в том числе и в гемагглютинине. На основе филогенетического анализа описаны 18 антигенных подтипов НА, которые собраны в две основные группы [28–30]. Группа 1 включает подтипы H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 и H18, а группа 2 включает H3, H4, H7, H10, H14 и H15 (Рисунок 1–4Б). Кроме того, существует два различных класса НА IBV: линии Yamagata-like и Victoria-

конформационные перестройки [10,28]. На первом этапе происходит вращение субъединицы НА₁, которая приводит к увеличению расстояний между центрами доменов НА₁ и НА₂ с 35Å до 38Å (на [рисунке 1–5](#) формы I–III показаны расстояния между аминокислотами D₁₁₀₄ и Arg₂₇₆) и ослаблению межмолекулярных контактов между субъединицами ([рисунк 1–5 форма II](#)). В форме III расстояние между доменами продолжает увеличиваться до 40Å, сопровождая конформационные перестройки в домене НА₂. Далее петля (участок аминокислот 58–75 на [рисунке 1–5](#) выделен красным цветом) разворачивается на 180°, что приводит к расхождению α-спиралей. Пептид слияния на N-конце перемещается, чтобы стать N-концом новой α-спирали (форма IV), образованной из перевернутой короткой (на [рисунке 1–5](#) показана синим цветом) и центральной (на [рисунке 1–5](#) показана зеленым цветом) α-спиралей. Далее субъединицы НА₁ и НА₂, связанные дисульфидным мостиком, расходятся, и обнажается мембранный якорь [10,21,28]. Согласно вышеописанным наблюдениям, стабилизация структуры «спираль-петля-спираль» может считаться решающей для предотвращения перехода из формы II в форму IV [10]. Понимание механизма конформационных перестроек НА может помочь в поиске низкомолекулярных соединений, связывание которых в белке приведет к стабилизации лиганд-белковой структуры.

1.2.1.2. Сайт связывания малых молекул в НА₁

Сайт связывания рецептора (РСС) локализован в вариабельном глобулярном домене НА₁ и наименее консервативен для всех 16 подтипов НА вируса гриппа А [36]. РСС представляет собой неглубокий карман, расположенный на поверхности глобулярной головки НА и состоящий из аминокислотных остатков 116–261. Четыре аминокислоты (Y₁₉₈, W₁₅₃, H₁₈₃ и Y₁₉₅ ([рисунк 1–6](#)) консервативны между всеми подтипами гемагглютинаина, кроме подтипов H17 и H18. Ключевые аминокислоты Y₁₉₈ и W₁₅₃ расположены на дне связывающего кармана [37] и окружены четырьмя структурными элементами, а именно 130-петлей, 150-петлей, 190-спиралью и 220-петлей ([рисунк 1–6](#)). Эти элементы присутствуют во всех подтипах НА, однако их длина и аминокислотный состав различаются в зависимости от штамма вируса и часто являются ключевыми факторами в распознавании рецептора [36]. Механизм связывания ключевых аминокислот с сиаловыми кислотами может быть рассмотрен с позиции молекулярного моделирования [27,38]. Теоретическое исследование методами молекулярной динамики показало, что аминокислота Y₁₉₁ на дне связывающего кармана НА₁ образует водородные связи с α-2,3 или α-2,6 связанными концевыми сиаловыми кислотами в различных подтипах белка. При этом специфичность распознавания может также зависеть от подтипа НА [38].

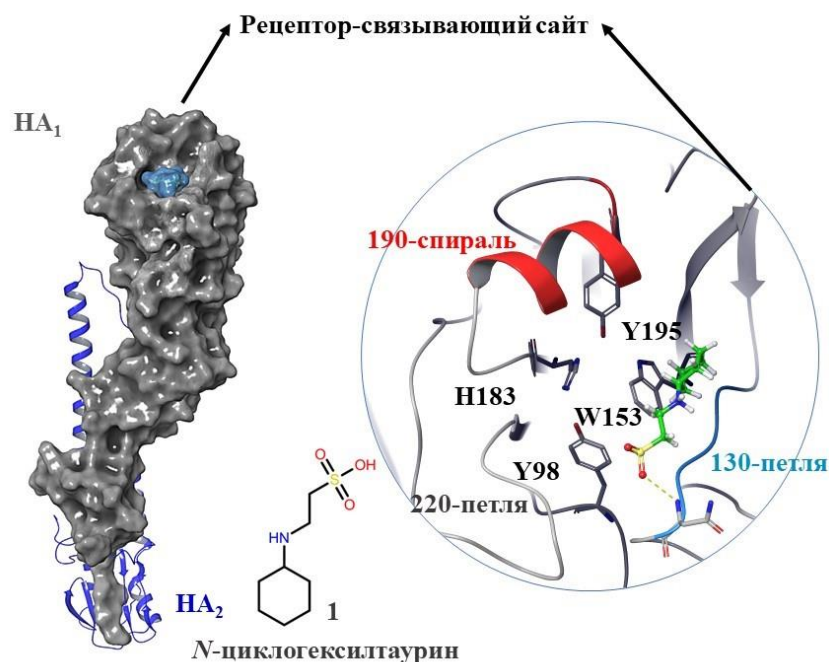


Рисунок 1-6 – Структурные характеристики рецептор-связывающего сайта НА [36]. В полости сайта расположена *N*-ацетилнейраминаовая кислота в Ван-дер-Ваальсовой проекции (голубого цвета). Зеленым цветом показана молекула *N*- циклогесилтаурина (1) [25].

Основываясь на том факте, что сиаловые кислоты являются рецептором НА, ингибиторы на основе кислот могут использоваться в качестве потенциальных агентов против гемагглютинаина [29] (рисунок 1–7). К сожалению, при разработке ингибиторов входа широкого спектра прямая имитация сиаловой кислоты углеводными аналогами не увенчалась успехом [25,30]. Причина заключается в очень слабом связывании самого рецептора сиаловой кислоты: константа диссоциации комплекса лиганд-белок соответствует порядку 3–5 μM [25]. Кроме того, производные (рисунок 1–7, структуры 2 и 3) едва ли могут конкурировать с нативными гликанами [27,39]. Тогда в качестве альтернативы были рассмотрены поливалентные аналоги сиаловых кислот [40] или ингибиторы, не содержащие углеводный остаток. К таким структурам относятся, например, конъюгаты олеиновой кислоты (4) [41], ауреонитол (5) [42] и небольшие пептиды [29], которые могут связываться в кармане рецептор-связывающего сайта. Методами молекулярного докинга для большинства низкомолекулярных ингибиторов оценена их аффинность к РСС и описан характер межмолекулярных взаимодействий. Для разработки потенциального ингибитора рецептор-связывающего сайта, несомненно, будет полезно использование кристаллической структуры гемагглютинаина в комплексе с нативным лигандом. В свободно доступной в сети Интернет базе данных Protein Data Bank [14] представлено два комплекса НА с низкомолекулярным соединением *N*-циклогесилтаурином (1), расположенным

в кармане связывания рецептора (PDB код 6CF5 соответствует штамму A/H5N1, PDB код 6CEX – штамму A/H3N2).

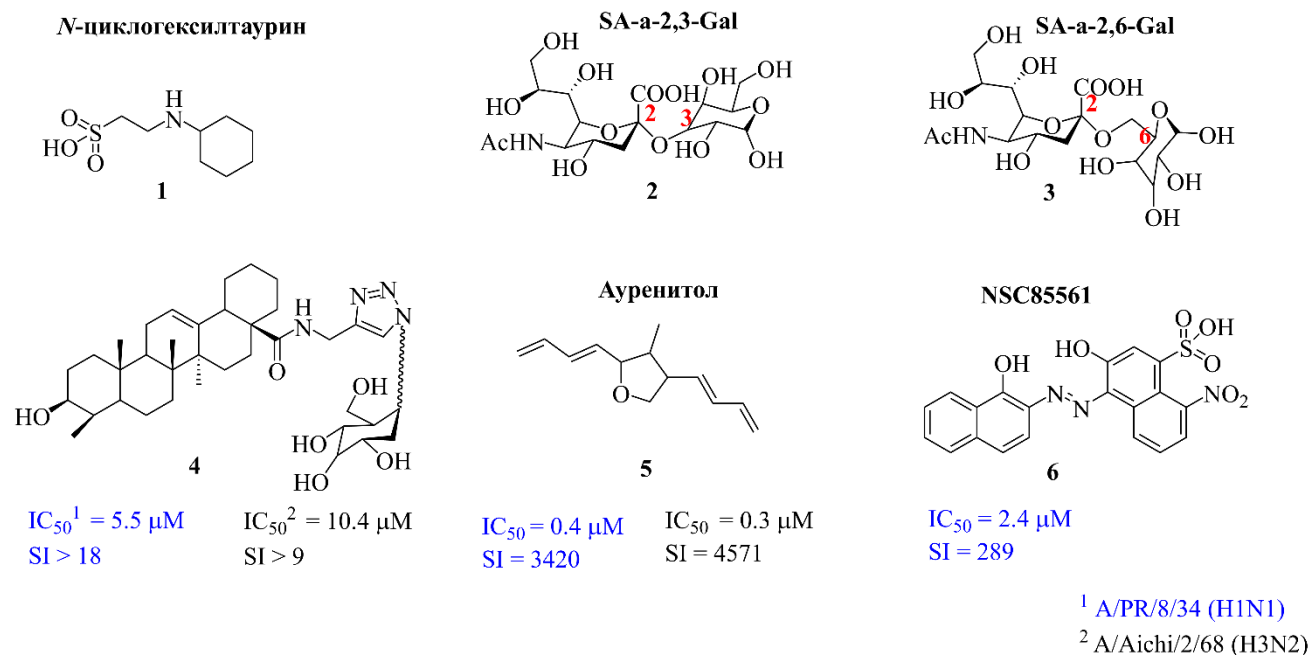


Рисунок 1-7 – Низкомолекулярные соединения – ингибиторы НА, связывающиеся в РСС НА₁.

Согласно результатам исследований, представленным в работе [25], низкомолекулярное соединение *N*-циклогексилтаурин (**1**) имитирует способ связывания природного рецептора сиаловой кислоты и рецептор-связывающего домена НА₁ за счет образования аналогичных водородных связей и межмолекулярных взаимодействий с полярными остатками 130- и 220-петель (рисунок 1–6). Молекула располагается между 190- α -спиралью (на рисунке 1–6 выделена красным цветом) и 130-петлей (синий цвет) и покрывает площадь поверхности сайта связывания порядка $140 \text{ \AA}^2$, что сопоставимо с сиаловой кислотой, для которой покрытие составляет порядка $172 \text{ \AA}^2$. Кадам и Вильсон [25] предполагают, что соединение **1** может быть использовано в качестве структуры-скаффолда, и дают рекомендации структурной модификации *N*-циклогексилтаурина для более плотного заполнения кармана связывания, и, как следствие, увеличения его аффинности. Соединение **1** еще интересно тем, что также может связываться и в стеблевой части домена НА₂. Т. е. данное соединение может с одной стороны препятствовать связыванию НА с рецепторами сиаловой кислоты, а с другой стороны накладывать дополнительные структурные ограничения на фузогенные переходы протеина. В работе [43] использовали методы молекулярного моделирования в совокупности с биологическими тестами для поиска потенциального ингибитора НА. На основании результатов теоретической оценки аффинности к сайту связывания сиаловой кислоты из более 200-х соединений авторы выбрали

соединение-лидер NSC85561 (рисунок 1–7, структура 6). Дальнейшие биологические эксперименты по оценке IC_{50} подтвердили результаты молекулярного моделирования.

Одной из ключевой функцией НА является связывание с клеточным рецептором, при этом область РСС также привлекательна для исследования взаимодействия антител с НА₁, в том числе с НА₁ вируса гриппа разных штаммов. Так, в работе [26] методами *in silico* оценена аффинность ряда антител к потенциальным местам связывания их в глобулярном домене НА (рисунки 1–2А и 1–3А). Подобные исследования [44] представляют больший интерес с позиции рационального дизайна универсальной вакцины. Однако для разработки лекарственных препаратов, в случае НА, чаще всего рассматриваются сайты связывания, расположенные в консервативной области стеблевой части протеина [45–48].

1.2.1.3. Сайты связывания малых молекул в НА₂

Разработка многочисленных низкомолекулярных ингибиторов НА, нацеленных на блокирование механизма слияния вирусных и клеточных мембран, началась еще в конце XX века [30]. Как правило, экспериментальные методы позволяли оценить противовирусную активность соединений и обосновать потенциальную биологическую мишень. Однако место связывания потенциальных ингибиторов НА до некоторого времени оставалось неизвестным, да и сейчас часто является дискуссионным вопросом.

Поиск потенциальных сайтов связывания в стеблевой части гемагглютиниона методами молекулярного моделирования – достаточно сложная задача, безусловно, требующая экспериментального подтверждения. Отсутствие кристаллических комплексов белка с потенциальными ингибиторами существенно осложняло разработку новых лекарственных препаратов. Можно предположить, что одна из первых расшифрованных кристаллических структур НА [28] с малой молекулой трет-бутил гидрохиноном (ТБГХ) открыла возможность исследователям проводить теоретические расчеты с целью поиска соединений, связывание которых в полостях второй субъединицы НА₂ может привести к ингибированию слияния вирусной и клеточной мембран.

1.2.1.3.1. Сайт связывания трет-бутил-гидрохинона и умифеновира

Первые попытки определить место связывания потенциальных ингибиторов НА предпринимались в конце XX века. В 1993 году в работе [49] на основании результатов молекулярного докинга было выдвинуто предположение, что сайт связывания трет-бутил гидрохинона (ТБГХ) (7) располагается в месте пептида слияния НА₂ (вторичная структура окрашена в желтый цвет на рисунке 1–8).

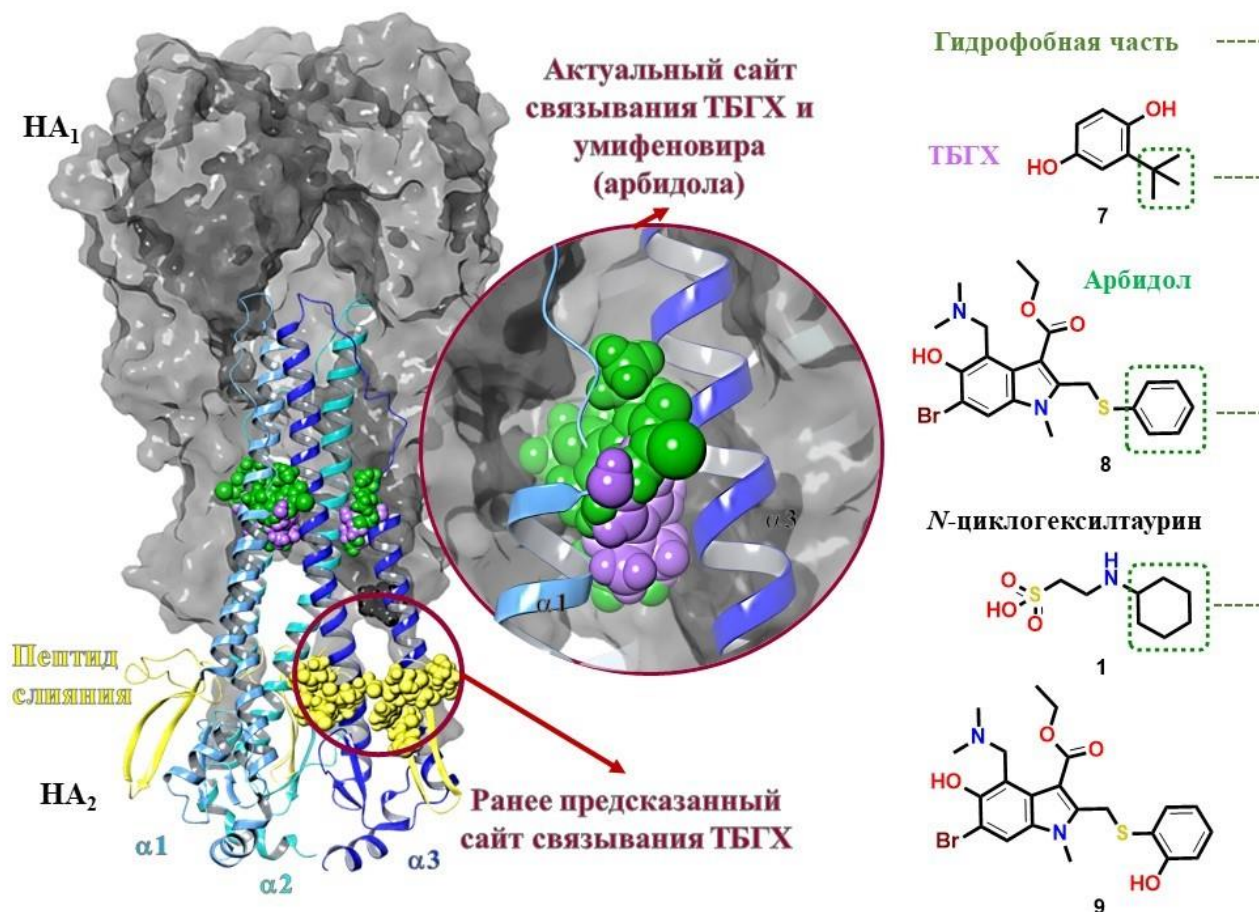


Рисунок 1-8 – Сайты связывания ингибиторов НА: визуализация построена на основании PDB кодов 3EYM – комплекс НА с ТБГХ [28]; 5T6N – комплекс НА с умифеновиром (арбидолом) [50]. Полноценная структура НА построена на основании структуры НА, соответствующей PDB коду 4LXV [51]. Первая субъединица НА₁ показана серым цветом. Вторая субъединица НА₂ представлена в виде вторичной структуры, в которой спирали, относящие к разным протомерам показаны разными оттенками синего цвета. Желтым цветом показана вторичная структура, соответствующая месту пептида слияния. Аминокислоты, расположенные в первом предполагаемом сайте связывания ТБГХ, показаны желтыми сферами. Молекулы Арбидола и ТБГХ и показаны зеленым и фиолетовым цветами, соответственно. Их место связывания, полученное на основании кристаллографических данных, располагается между двумя спиралями (малой и большой) двух разных протомеров.

Гидрофобная полость сайта связывания окружена аминокислотами под номерами 4, 7–19 и 24, 25 НА₂ (аминокислоты на [рисунке 1–8](#) представлены в виде желтых сфер) и Н₁17, Q₁325 (темно-серые сферы). В 1997 Хоффман и соавторы [52] оценили аффинность малых молекул к потенциальному месту связывания, описанному в [49], в том числе и модельного соединения ТБГХ. Однако, расшифровка кристаллической структуры НА с ТБГХ [28] опровергла это предположение [49]. Согласно картам электронной плотности, ТБГХ связывается с НА на границе раздела между двумя протомерами тримера. Другими словами, на один тример НА приходится три молекулы ТБГХ. Сайты связывания ТБГХ образованы остатками длинных α -спиралей одного мономера и коротких α -спиралей соседнего ([рисунк 1–8](#)).

Взаимодействия ТБГХ с НА носят преимущественно гидрофобный характер, так как сайт связывания насыщен гидрофобными аминокислотами: L₁₂₉, L₂₉₈ и A₂₁₀₁ со стороны одного мономера и L₂₅₅, и L₂₉₉ со стороны второго. Кроме того, молекула ТБГХ образует контакты с ионизированными аминокислотами R₂₅₄, Q₂₅₇ и Q₂₉₇. Тогда предположительный ингибирующий механизм действия ТБГХ заключается в увеличении стабильности комплекса. Согласно авторам [28], описанный гидрофобный сайт связывания образуется только в одной из двух филогенетических групп НА, и кристаллические комплексы были записаны только для штаммов H14N5 и H3N2, т. е. для НА, принадлежащих ко второй группе.

Умифеновир, или арбидол (**8**), противовирусный препарат, одобренный в России и Китае к использованию в клинической практике [53], так же, как и ТБГХ, стабилизирует конформацию НА. Молекула связывается между двумя α -спиралями разных мономеров [50] и ингибирует важные конформационные перестройки, связанные со слиянием мембран при низких значениях pH эндосомы. В работе [54] авторы провели ряд структурных модификаций арбидола и получили его структурный аналог (**9**), аффинность которого к сайту связывания на порядок выше значения, характерного для арбидола.

Как было упомянуто выше, согласно работе [25], *N*-циклогексилтаурин (**1**) может одновременно связываться с субъединицами НА₁ как в сайте связывания рецептора, так и в стеблевой части НА₂ домена между короткой и длинной α -спиралями разных протомеров (PDB коды 6CF5 и 6CEX). Авторы работы [50] обращают внимание на гидрофобный фрагмент *N*-циклогексилтаурина – циклогексил, идентифицируя его как аналог гидрофобных фрагментов (рисунк 1–8) трет-бутила- в ТБГХ и ароматического кольца в умифеновире, которые контактируют с одинаковыми гидрофобными аминокислотами L₁₂₉, L₂₉₈, A₂₁₀₁, L₂₅₅ и L₂₉₉.

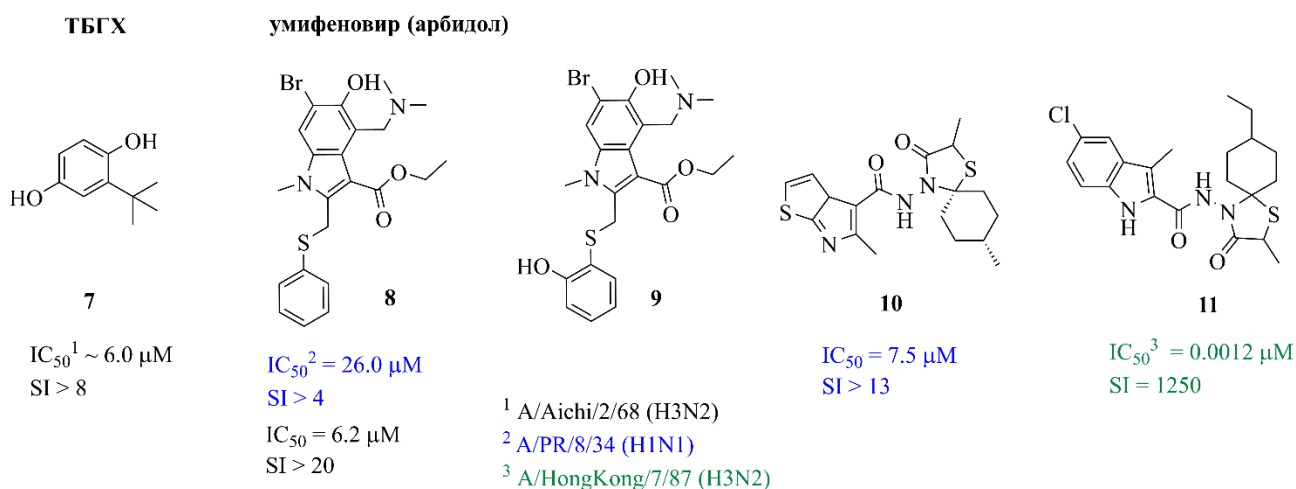


Рисунок 1-9 – Ингибиторы НА, связывающиеся в сайте связывания ТБГХ/Умифеновира.

Пространственные структуры комплексов НА-ТБГХ (PDB код 3EYM) и НА-Арбидол (PDB коды 5T6N и 5T6S), определенные методами рентгено-структурного анализа (РСА), легли в основу теоретических расчетов методами молекулярного докинга с целью оценки аффинности ингибиторов **10–11**, представленных на [рисунке 1–9](#), к сайту связывания ТБГХ/Умифеновира.

На основании результатов молекулярного моделирования в совокупности с данными биологических экспериментов был описан механизм противовирусного действия ряда спиро-гетероциклических соединений **10** [55] и спиротиазолидиноновых производных индола (**11**) [56]. В обоих случаях авторы использовали методы молекулярного докинга, а в качестве потенциального сайта связывания рассматривали гидрофобную полость, заключенную между двумя α -спиралями разных мономеров НА, или ТБГХ-сайт связывания.

1.2.1.3.2. Антигенные эпитопы НА как возможное место связывания ингибиторов

Стадия входа вируса гриппа в клетку может быть заблокирована нейтрализующими антителами широкого спектра, которые связываются с эпитопами НА [57,58], в том числе с теми, что расположены на стеблевой части субъединицы НА₂. Различные антитела, например, MAb C179, CR9114 и FI6v3, контактируют с поверхностью протеина на границе двух субъединиц, образуя межмолекулярные контакты с аминокислотами со стороны НА₁ 38-41, 291-293 и 318-320 и со стороны НА₂ 18-21 и 36, 38, 41, 42, 48, 49, 52, 56 ([рисунк 1–10](#)).

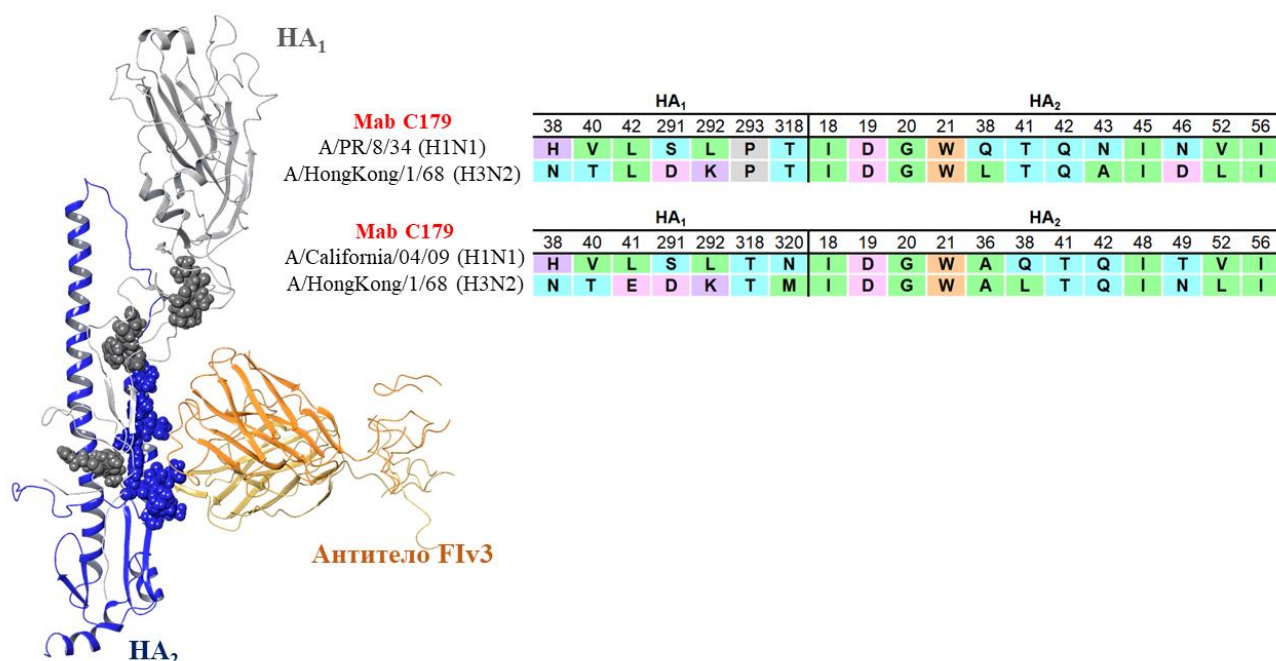


Рисунок 1-10 – Комплекс протомера НА с антителом FI6v3. Визуализация комплекса выполнена на основе PDB кода 3ZTN [59]. В таблице указаны контактные аминокислоты белка, с которыми антитела MAb C179, CR9114 и FI6v3 образуют межмолекулярные взаимодействия.

Данные аминокислоты могут быть рассмотрены в качестве функциональных аминокислот, с которыми ингибиторы НА могут образовывать межмолекулярные взаимодействия. Тогда место контакта НА с антителами можно рассматривать в качестве вероятного сайта связывания ингибиторов белка. Так, в работе [60] область контакта НА и антитела MAb C179 была рассмотрена в качестве потенциального места связывания двух перспективных соединений **MBX2329** (**12**) и **MBX2546** (**13**).

Соединения **MBX2329** (**12**) и **MBX2546** (**13**) (рисунок 1–11) были отобраны среди более 106 тысяч химических структур на основании результатов высокопроизводительного скрининга с использованием псевдовиральной системы на основе лентивируса, имеющего на своей поверхности НА вируса гриппа. Агенты проявляют ингибирующую активность против ряда штаммов вируса гриппа в микромолярных концентрациях, значения IC_{50} попадают в интервал от 0.30 до 3.60 μM в зависимости от штамма вируса. В работе [60] предполагается, что вещества **12** и **13** связываются со стволовой областью НА₂ и приводят к нарушению процесса слияния вирусной и клеточной мембран. Согласно данным ЯМР анализа, структурно похожие агенты **12** и **13** связываются с эпитопами НА на границе двух субъединиц, образуя ряд ключевых контактов с аминокислотами как первой, так и второй субъединицы.

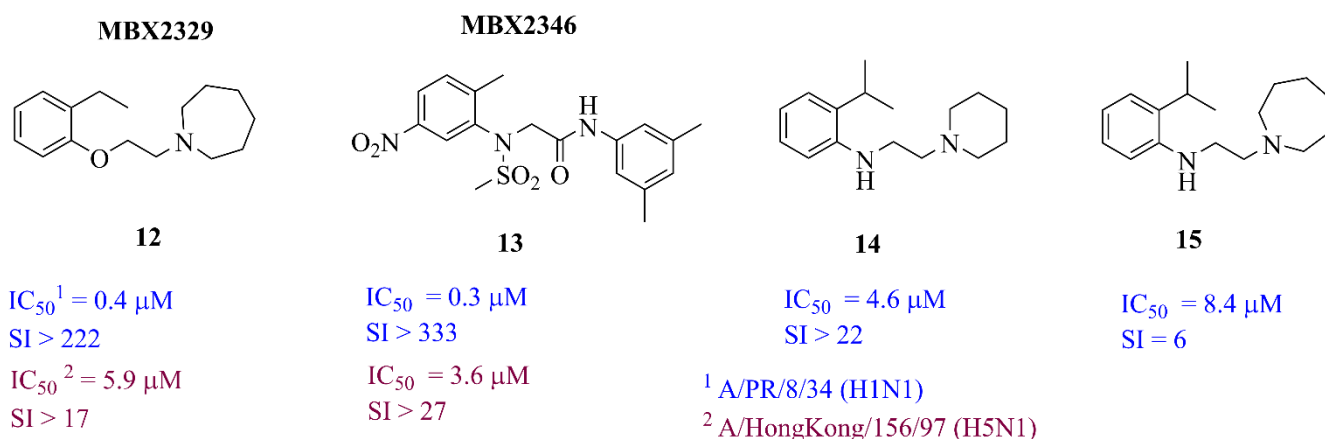


Рисунок 1-11 – Ингибиторы НА, связывающиеся в области контакта протеина с антителом MAb C179.

В дальнейшем в работе [45] провели масштабные теоретические исследования методами молекулярной динамики и показали, что наиболее вероятное место связывания соединения **12** при значении $pH = 7$ расположено на границе двух субъединиц в гидрофобном кармане, окруженном боковыми цепями V₁₃₁, L₁₂₉₀, T₁₃₁₆, НА₂: I₂₄₇, T₂₄₈ и V₂₅₁ (рисунок 1–12А, молекула **12** показана желтым цветом). Примечательно, что при моделировании взаимодействия лиганда с поверхностью НА при пониженных pH предположительное место связывания вещества **12** располагается немного выше (молекула показана оранжевым цветом). При этом, согласно результатам молекулярной динамики [45], соединение, вероятно, может оказывать

существенное влияние на вторичную структуру НА (рисунк 1–12Б), а именно на короткую α -спираль.

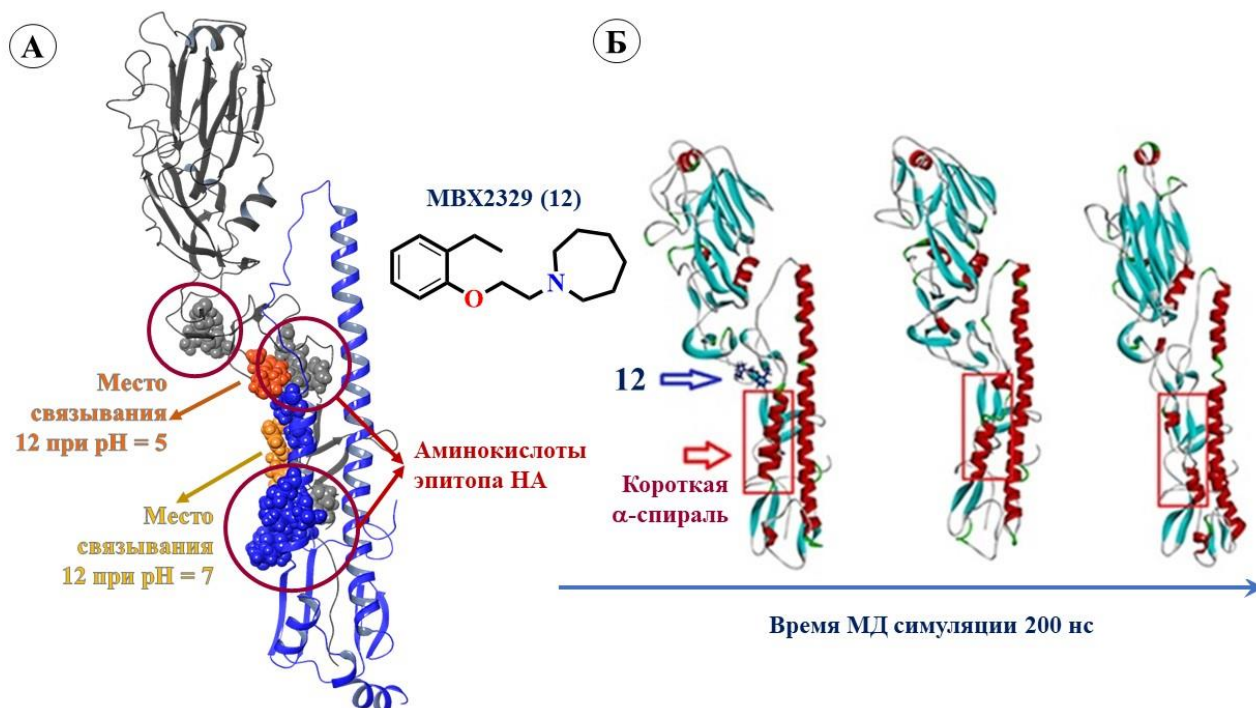


Рисунок 1-12 – Расположение сайтов связывания в области эпитопов НА: А – место связывания ингибиторов 12–13: желтой и оранжевой сферами показаны расположение соединения 12 при различных значениях pH среды; аминокислоты эпитопа НА показаны серыми (соответствуют НА₁) и синими (соответствуют НА₂) ван-дер-ваальсовыми сферами. Б – часть рисунка оригинальной статьи [45], на которой в течение 200 нс молекулярно-динамических симуляций визуализируется заметное влияние агента 12 на вторичную структуру НА, особенно на короткую α -спираль протомера.

Масштабные теоретические расчеты методами молекулярной динамики позволили авторам работы [45] описать возможный механизм ингибирующего действия соединения 12. Модуль гептадных повторов НА играет решающую роль в конформационных перестройках, при которых петля, связывающая короткую и длинную α -спирали, изменяет свою вторичную структуру и приводит к образованию одной длинной α -спирали. Для управления данным переходом необходимо, чтобы молекулы воды непосредственно взаимодействовали с гидрофильными аминокислотными остатками [45,61]. Тогда основное ингибирующее действие агента 12 заключается в стабилизации связи двух субъединиц и предотвращении попадания молекул воды внутрь НА. Интересно, что в работе [62] описываются ингибиторы НА 14 и 15 (рисунк 1–11) – соединения, схожие по своим структурным и фармакофорным дескрипторам с веществом 12. Соединения 14 и 15 активны против вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1) в микромолярных концентрациях. Логично предположить, что связывание этих соединений с НА должно происходить в месте эпитопа, как это происходит с агентом 12. Однако в работе [62]

предполагается, что ингибиторы **14** и **15** связываются в полости ТБГХ ([рисунок 1–8](#)). Резистентный к веществу **14** штамм вируса гриппа содержит аминокислотные замены во второй субъединице T107I и R153I. Авторы работы [62] считают, что замена T107I является наиболее значимой и располагается в полости, близкой к месту связывания ТБГХ. Результаты молекулярного моделирования (докинга в совокупности с молекулярной динамикой) показывают, что исследуемое соединение может связываться в сайте ТБГХ с образованием межмолекулярных взаимодействий с теми же аминокислотными остатками. Почему авторы не рассматривали альтернативные варианты связывания, остается загадкой.

На основе пространственных структур комплексов НА с антителами FI6v3 и CR9114, определенных методами РСА, были разработаны небольшие циклические пептиды [63], которые могут связываться с эпитопами НА. Новые пептиды проявляют наномолярную активность, связываясь с высоко консервативным стволовым эпитопом и блокируя конформационные перестройки белка. Кристаллические структуры комплексов пептидов с НА штамма вируса A/PR/8/34 (H1N1) представлены в Protein Data Bank (список PDB кодов представлен в [приложении таблица 5–1](#)).

В 2009 году в работе [64] описано антитело bnAb CR6261. Антитело связывается с поверхностью стеблевой части НА и нейтрализует большинство вирусов гриппа А. Наличие пространственного комплекса НА-CR6261 (PDB код 3GBN) вдохновило авторов работы [65] на разработку низкомолекулярного ингибитора **JNJ4796 (16)** ([рисунок 1–13](#)). Основная идея создания данного вещества **16** заключалась в поиске малых молекул, имитирующих связывание CR6261 с поверхностью НА. Используя конкурентный хемилюминесцентный анализ связывания лиганда (AlphaLISA), авторы [65] провели высокопроизводительный скрининг более 500 тыс. низкомолекулярных соединений, и в пределах класса бензилпиперазинов идентифицировали соединение **JNJ4796 (16)**. Эпитоп, распознаваемый малой молекулой **16**, оказался аналогичен эпитопам, связывающимся с bnAb, а именно, CR6261, FI6v3 и CR9114. Другими словами, агент **16** связывается в гидрофобном кармане на внешней поверхности НА (H1 – гемагглютинин первой группы) и имитирует аналогичные CR6261 межмолекулярные взаимодействия с аминокислотами H₁₁₈, H₁₃₈, L₁₄₂, T₁₃₁₈, G₂₂₀, W₂₂₁, T₂₄₁-L₂₅₆. Механизм противовирусного действия вещества **16** заключается в ингибировании рН-чувствительных конформационных перестроек, которые запускаются в процессе слияния вирусных и клеточных мембран. Соединение проявляет противовирусную активность против различных штаммов вируса гриппа А в наномолярных концентрациях ([рисунок 1–13](#)).

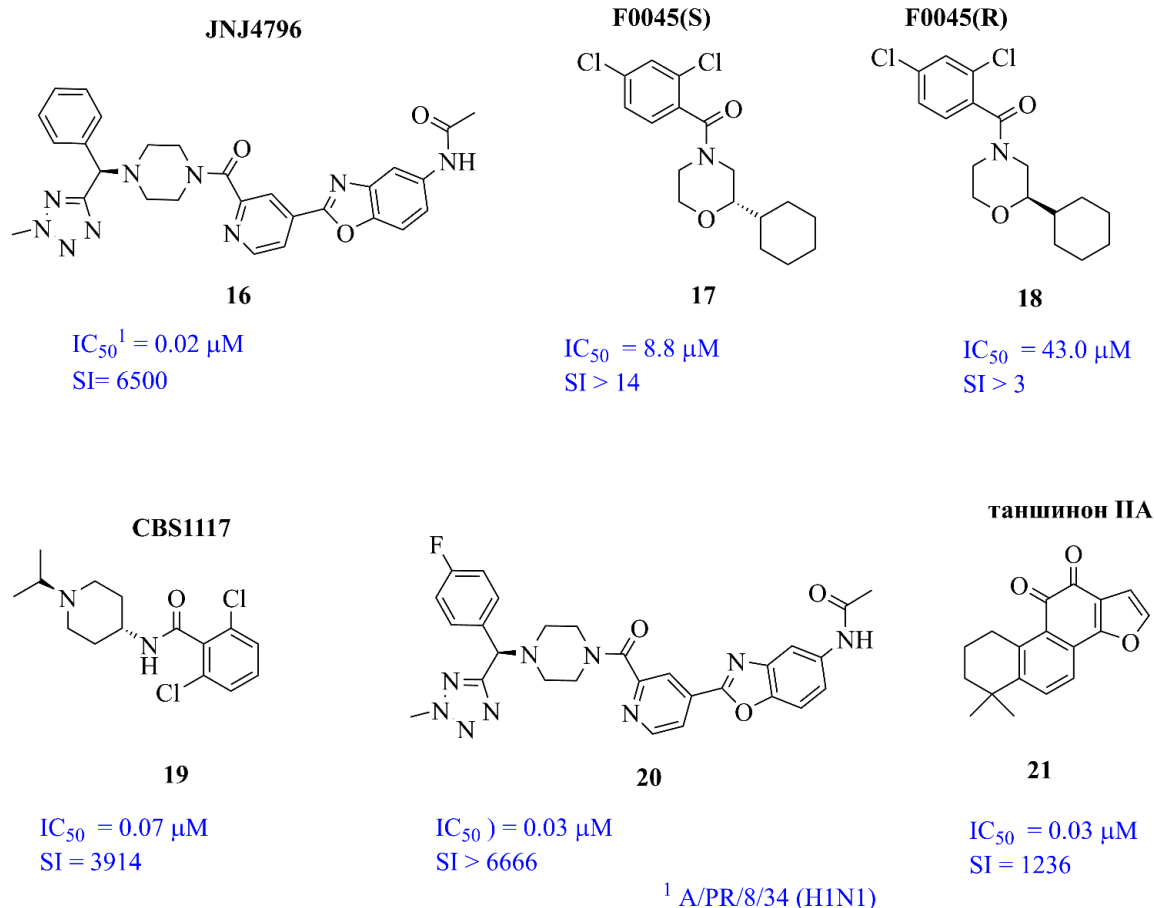


Рисунок 1-13 – Ингибиторы НА, связывающиеся с НА в районе антигенного эпитопа.

Пространственные структуры комплексов НА с лигандами **16–19** легли в основу разработки новых противовирусных соединений, потенциальных ингибиторов НА. Так в работе [66] описываются темпорины – небольшие пептиды, которые предположительно могут связываться в области контакта НА с антителами. Молекулярное моделирование с целью оценки аффинности темпоринов к сайту связывания проведено на основании 3D структур небольших пептидов с НА, описанных в [63].

Применение зонда флуоресцентной поляризации (FP) на основе пептида Р7 позволило авторам [67] провести высокопроизводительный скрининг (HTS) 72 тысяч соединений и идентифицировать новую низкомолекулярную молекулу **F0045(S)**, (**17**) обладающую высоким сродством к стволочному эпитопу НА А/PR/8/34 (H1N1) (рисунок 1–13), для которой методами РСА была записана пространственная структура лиганд-белкового комплекса **НА-17** (PDB код 6WCR). Интересно, что R-стереоизомер **F0045(R)** (**18**) характеризуется менее выраженной противовирусной активностью. Разную противовирусную активность двух стереоизомеров авторы [67] связывают с их различным расположением в гидрофобном кармане эпитопа.

С помощью рентгеновской кристаллографии, ЯМР и экспериментов с использованием направленного мутагенеза была описана область связывания CBS1117 (**19**) [68] с H5 НА. Место

связывания соединений совпадает с описанными ранее областями связывания ингибиторов **F0045(S)** и **JNJ4796** и располагается на поверхности НА в области, включающей аминокислоты, которые играют ключевую роль в связывании с антителами ([рисунок 1–13](#)).

Авторы работы [69] провели структурную модификацию агента **JNJ4796 (16)** и синтезировали ряд аналогов, содержащих заместители в ароматическом кольце. На основании ряда биологических испытаний было выбрано соединение лидер – 4-фтор-производное (**20**) ([рисунок 1–13](#)). Соединение **20** проявляет противовирусную активность против штамма гриппа A/PR/8/34 (H1N1), соизмеримую с активностью агента **16**. При этом введение атома фтора в положение 4 ароматического кольца **16** приводит к снижению цитотоксичности нового соединения **20**, и как следствие, к увеличению индекса селективности. Для молекулярного докинга авторы [69] использовали кристаллическую структуру лиганд-белкового комплекса **НА-16**, оценили аффинность **20** к сайту связывания и описали дополнительное гидрофобное взаимодействие между атомом фтора лиганда (**20**) и дополнительной аминокислотой V₂₁₈.

Согласно работе [70], таншинон ПА (**21**) ([рисунок 1–13](#)) (биологически активное соединение, выделенное из шалфея краснокорневищного (*Salvia miltiorrhiza*) проявляет выраженную активность против вируса гриппа штамма A/H1N1/PR/8/34. Аффинность агента **21** к сайтам связывания гемагглютинина оценивали методами молекулярного докинга и молекулярной динамики. В качестве референсного соединения в теоретических расчетах рассматривали **F0045(S)** и структуру комплекса НА с **F0045**, полученную методом PCA (PDB code 6WCR).

1.2.1.3.3. Альтернативные сайты связывания

В ряде случаев соединения, проявляющие выраженную противовирусную активность против гриппа и демонстрирующие способность ингибировать гемагглютинин, могут связываться в альтернативных сайтах связывания, отличных от места расположения рассмотренных ранее молекул ТБГХ и арбидола, а также от мест контакта антител с поверхностью протеина. Так в [71] авторы описывают противовирусную активность природного метаболита стахифлина (**22**) ([рисунок 1–14A](#)) против ряда штаммов вируса гриппа. Соединение **22** ингибирует репликацию вирусов различных штаммов, таких как A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Narita/1/09 (H1N1) pdm, A/Singapore/1/57 (H2N2), A/duck/Hokkaido/5/77 (H3N2), A/Hong Kong/483/97 (H5N1), A/turkey/Italy/4580/99 (H7N1) и другие. Противовирусная активность соединения **22** была протестирована против различных штаммов вируса, соответствующих 14 типам НА. В результате секвенирования резистентных к агенту **22** штаммов (A/WSN/1933 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/chicken/Ibaraki/1/05 (H5N2) и A/chicken/Taiwan/A703-1/08 (H5N2)) была обнаружена замена аминокислотных остатков в α -спиралях субъединицы НА₂. Молекулярное

моделирование позволило авторам описать вероятный сайт связывания стахифлина: небольшую полость расположенную между двумя α -спиралями одного протомера НА₂ (рисунок 1–14Б). В резистентном штамме вируса аминокислоты D237, K251, T2107, K2121 подвергаются замене и являются ключевыми в сайте связывания (рисунок 1–14Б), образуя ряд межмолекулярных взаимодействий с исследуемым соединением. Предполагаемый механизм ингибирующего действия агента **22** заключается в следующем: молекула располагается между двумя α -спиралями (короткой и длинной), образуя ряд нековалентных связей с аминокислотными остатками и, как следствие, удерживая α -спирали в сжатом состоянии. Связывание вещества **22** увеличивает энергетический барьер, требуемый для данного конформационного перехода и образования одной α -спирали.

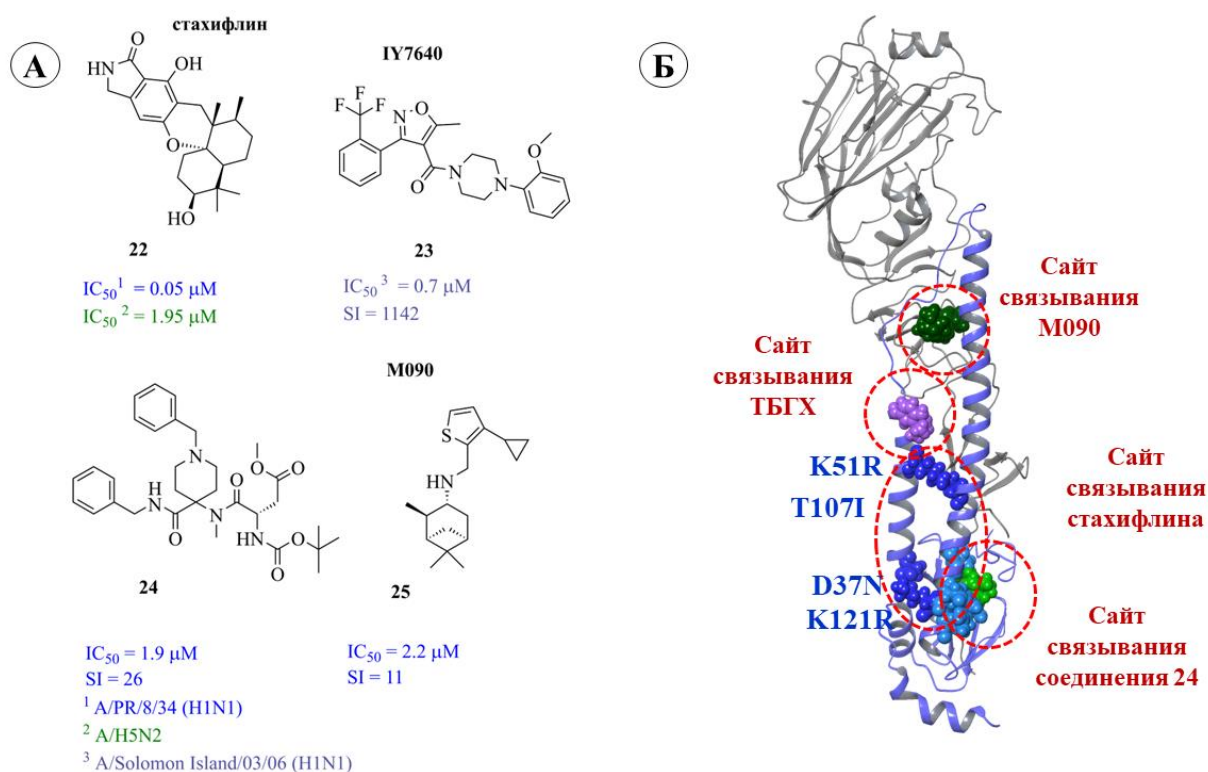


Рисунок 1-14 – Сайты связывания ингибиторов НА: А – ингибиторы НА, связывающиеся в различных сайтах связывания. Б – расположение разных сайтов связывания в протомере НА.

В работе [72] были идентифицированы новые соединения, активные против вируса гриппа. На основании ряда биологических экспериментов авторы [72] выделили одно соединение-лидер **IY7640** (**23**). Молекулярной мишенью агента **23** является высококонсервативная стеблевая область НА. Методами молекулярного докинга авторы провели поиск потенциального места связывания, рассматривая эпитопы CR6261 НА и сайт связывания ТБГХ. Предполагается, что агент **23** располагается между двумя ключевыми α -спиралями, при этом регион связывания располагается ближе к вирусной мембране, чем сайт связывания ТБГХ.

В работе [73] описывается гидрофобная полость, окруженная аминокислотными остатками K₂₁₂₃, Q₂₁₂₀, Y₂₁₁₉, F₁₉, которые расположены в непосредственной близости к месту протеолиза ([рисунок 1–14Б](#)). На основании данных, полученных при помощи молекулярного докинга в совокупности с молекулярной динамикой, предполагается, что соединение **24** будет проявлять свою противовирусную активность именно за счет связывания в описываемом месте протеолиза.

В заключение необходимо упомянуть еще об одном месте связывания ингибиторов НА, на примере вещества **M090 (25)**, расположенном между длинной α -спиралью и петлей, соединяющей короткую и длинную α -спирали [74]. Связывание производного пинанамина **25** ([рисунок 1–14Б](#)) может препятствовать переходу, при котором две α -спирали превращаются в одну. Место связывания **25** также было предсказано на основании молекулярного моделирования.

Выбор места связывания ингибиторов НА – одна из самых сложных задач вычислительной химии при поиске и разработке противогриппозных препаратов. Наличие пространственных структур комплексов НА с ингибиторами, определенных экспериментальными методами, в значительной степени облегчает задачу исследователям. Однако здесь необходимо учитывать разницу в структурных дескрипторах и фармакофорных профилях исследуемых соединений. Другими словами, наличие пространственных структур НА с лигандом в сайте связывания вовсе не гарантирует тот факт, что новое соединение будет связываться именно в этом месте и/или характеризоваться достаточно высоким сродством к данному сайту связывания.

Как правило, в большинстве научных публикаций, описывающих альтернативные сайты связывания, методы молекулярного моделирования представлены в совокупности с данными различных экспериментов, таких как ЯМР исследования, мутагенез, селекция резистентных штаммов с последующим анализом аминокислотных последовательностей, а также оценка фузогенной активности белка-мишени. Конечно, для подтверждения представленных на [рисунке 1–14](#) альтернативных мест расположения потенциальных ингибиторов НА желательно наличие кристаллической структуры комплекса НА-ингибитор.

1.2.2. Гликопротеин (спайк-белок) коронавирусов

1.2.2.1. Структура и функция спайк-белка

Поверхностный гликопротеин S представляет собой трансмембранный белок слияния I типа массой от 180 до 200 кДа. N-конец белка обращен наружу, он удерживается в вирусной мембране через трансмембранный домен с коротким C-концевым сегментом, обращенным

внутри вириона (рисунок 1–2Б). S-белок человеческих коронавирусов играет важную роль в жизненном цикле вируса: регулирует связывание вируса с поверхностным рецептором, проникновение в клетку-хозяина и является основной мишенью для гуморального иммунного ответа хозяина. В вирусной мембране белок участвует в двух важных событиях: связывание с клеточным рецептором и последующее слияние вирусных и клеточных мембран. Описано два возможных варианта входа вируса в клетку, так называемые ранний и поздний вход [75]. После связывания с клеточным рецептором вирион проникает внутрь либо с использованием мембраносвязанных протеаз, таких как трипсин или трансмембранная сериновая протеаза 2 типа человека, по пути раннего слияния, либо по пути эндоцитоза. В эндосоме при пониженных значениях pH активируется катепсин L, который расщепляет S2' сайт и запускает процесс слияния вирусных и клеточных мембран, тем самым высвобождая геном вируса в цитозоль клетки.

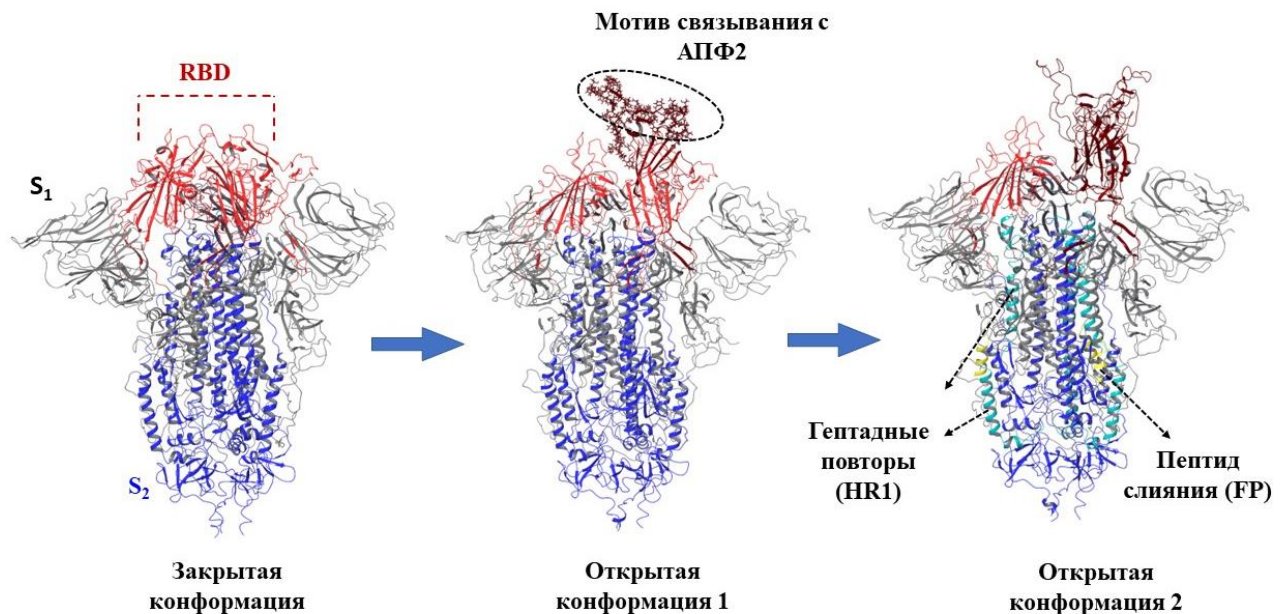


Рисунок 1-15 – Последовательное раскрытие РСД в луковичной головке S-протеина SARS-CoV-2. Вторичная структура субъединицы S_1 и S_2 показаны серым и синими цветами соответственно, РСД – красным цветом. В открытой конформации 2 гептадные повторы (HR1, аминокислоты 910–985) выделены светло-голубым цветом. Пептид слияния (FP, аминокислоты 816–834) показан как желтая вторичная структура. Визуализация конформаций головки S-белка выполнена на основании PDB кодов: 7BNM, 7BNN, 7BNO [78].

Структурное моделирование белковых мономеров коронавируса S-белка показывает, что субъединицы S_1 и S_2 образуют луковичную головку и область стебля соответственно. Субъединица S_1 содержит два субдомена, N-терминальный (НТД) и С-терминальный домены (СТД). У разных коронавирусов фрагменты одного или обоих субдоменов могут формировать рецептор-связывающий домен. Согласно имеющейся на данный момент информации о

пространственной структуре, определенной РСА высокого разрешения [75–78], рецептор-связывающий домен (РСД) перемещается как шарнир между двумя конформациями («вверх» или «вниз»), обнажая аминокислотные последовательности мотива связывания с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ2). При этом согласно кристаллографическим данным [78], раскрытие РСД происходит последовательно (рисунки 1–15). Трансмембранное звено S₂ содержит домены, участвующие в слиянии вирусной и клеточной мембран. К ним относят слитый пептид и два гептадных повтора HR₁ и HR₂ (рисунки 1–2Б, рисунки 1–15). Домены HR состоят из α -спиралей и, как правило, их положение и аминокислотная последовательность для всего семейства коронавирусов консервативна. Как и описанный выше гемагглютинин вируса гриппа, поверхностный S-белок SARS-CoV-2 относится к белкам слияния I типа, что обусловлено структурными характеристиками его домена слияния и необходимостью расщепления протеазой. Реакция слияния вирусной и клеточной мембран, катализируемая S-белком коронавируса, протекает через те же последовательные состояния, что и с участием остальных белков первого типа (рисунки 1–3).

1.2.2.2. Особенности молекулярного моделирования S-белка

Моделирование поверхностного белка SARS-CoV-2 было проведено в работах [79,80]. На основании данных геометрических параметров, полученных методами электронной микроскопии луковичной головки S-белка в закрытой (PDB код 6VXX [22]) и открытой конформациях (PDB код 6VSB [81]), авторы работы [79] смоделировали полноразмерные структуры поверхностного белка SARS-CoV-2, встроенного в мембрану. Изюминкой данной работы является то, что в полученных моделях спайк-белка учтены все сайты гликозилирования. В дальнейшем в работе [80] были проведены расчеты методами молекулярной динамики данных моделей в течении 1 мкс. Результаты подобного моделирования позволяют осознать форму полноразмерного S-белка, его ориентацию относительно поверхности мембраны и понять, как гликаны могут влиять на изменение конформации S-белка при открытии и/или закрытии РСД. Все структуры доступны в онлайн архиве CHARMM-GUI COVID-19: (<http://www.charmm-gui.org/docs/archive/covid19>).

Пандемия SARS-CoV-2 сопровождается большим количеством научно-исследовательских работ, направленных на исследование распространения коронавирусной инфекции, строения и жизненного цикла вириона, разработки вакцины и/или безопасного противовирусного препарата. В последнем случае авторы большинства статей используют методы молекулярного моделирования для поиска активного соединения против SARS-CoV-2. При этом поверхностный вирусный спайк-белок коронавируса является второй по популярности биологической мишенью, после основной протеазы M^{PRO}. Однако, поверхностный S-белок – это

достаточно сложная мишень длиной в 1273 аминокислотных остатка [82], в отличие от M^{PRO} , в составе которой чуть более 300 аминокислот [83]. Кроме того, в Protein Data Bank представлены данные пространственных структур комплексов M^{PRO} с лигандами, что в значительной степени облегчает разработку новых ингибиторов протеазы, и созданию новых противовирусных препаратов. Сайты связывания в протеазе хорошо изучены и описаны во множестве научных публикаций. В случае поверхностного гликопротеина SARS-CoV-2 (а также и SARS-CoV, и MERS-CoV) все значительно сложнее. Геометрические параметры спайк-белка в различных конформациях, соответствующих разным штаммам вируса, а также в комплексе с антителами присутствуют в открытых базах данных. Однако структуры S-белка или его части (например, РСД) в комплексе с лигандом отсутствуют до сих пор. Этот факт, конечно, осложняет поиск ингибиторов входа с использованием *in silico* скрининга, нацеленного именно на S-белок.

Справедливости ради, необходимо отметить, что в базе данных PDB присутствует ряд комплексов поверхностного белка с низкомолекулярными соединениями: биливердина, зелёного желчного пигмента, связанного в N-терминальном домене [84], и линолевой кислоты, расположенной в гидрофобном кармане РСД S_1 субъединицы гликопротеина [85]. Эти соединения не проявляют выраженных противовирусных свойств. В первом случае исследования влияния биливердина на реактивность поверхностного белка, прежде всего, интересны с точки зрения иммунного ответа. Во втором случае сообщается, что связывание незаменимой жирной кислоты стабилизирует закрытую конформацию S-белка. В любом случае, связывание этих соединений с поверхностным белком может оказывать влияние на его вторичную структуру, а значит, данные полости могут быть рассмотрены в качестве потенциальных мест связывания ингибиторов входа.

Как правило, основной выбор потенциальных ингибиторов входа заключается в выборе соединений, одобренных FDA (Food and Drug Administration), из соответствующих баз данных и проведения процедуры молекулярного докинга в вероятное место связывания ингибиторов гликопротеина. Чаще всего рассматривается интерфейс РСД с АПФ2, реже – гептадные повторы второй субъединицы. Молекулярный докинг позволяет оценить аффинность рассматриваемых соединений к потенциальному сайту связывания с последующим выбором соединений-хитов [86–89]. Часто в работах встречаются расчеты методами молекулярной динамики комплекса лиганд – белок [90,91]. К сожалению, в большинстве случаев эти расчеты заканчиваются лишь рекомендациями, какие соединения могут быть рассмотрены в качестве скаффолд-структур. Безусловно, подобные работы несут в себе научную ценность, однако биологического подтверждения результатов расчетов не хватает. Отсутствие геометрических параметров комплексов лиганд-белок безусловно осложняет поиск мест связывания ингибиторов поверхностного белка. В данной главе, прежде всего, будут описаны места связывания

вероятных ингибиторов входа, проявляющих активность против коронавирусов. На данный момент существует ряд замечательных обзоров [92,93], в которых описаны структурные особенности разных соединений, их механизм противовирусного действия и статус клинических исследований. Здесь же представлены и описаны лишь те соединения, которые проявляют активность против S-белка SARS-CoV-2 на основании результатов биологических экспериментов в совокупности с данными молекулярного моделирования.

1.2.2.3. Сайты связывания малых молекул в S_1

Коронавирусы используют широкий спектр рецепторов для проникновения в клетки-мишени. Несмотря на высокую консервативность аминокислотных последовательностей в S_1 , S-белки различных коронавирусов проникают в клетку, связываясь с различными рецепторами. Так эпидемиологически опасные коронавирусы человека HCoV взаимодействуют с N-аминопептидазой (CD13) или с N-ацетил-9-O-ацетилнейраминовой кислотой, расположенных на эпителиальных клетках-хозяина. MERS-CoV проникает в клетку за счет взаимодействия с дипептидилпептидазой DPP-IV; SARS-CoV и SARS-CoV-2 связываются с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ2) [22]. Наряду со связыванием с клеточным ферментом, SARS-CoV-2 может связывать и другие поверхностные белки для проникновения в клетку-хозяина [12]. Нейропилин-1 экспрессируется в нейронах и обеспечивает проникновение вируса за счет связывания с расщепленной формой S-белка [94]. Кроме того поверхностный белок SARS-CoV-2 способен связываться с рецептором CD147, который также опосредует проникновение вируса в клетку [95].

1.2.2.3.1. Сайт связывания в рецептор-связывающем домене S_1

Рецептор-связывающий домен поверхностного белка SARS-CoV-2 связывается с клеточным ферментом АПФ2 с высоким сродством. Этот факт может свидетельствовать о том, что вмешательство в интерфейс связывания РСД-АПФ2 может потенциально снизить риск заражения [92]. Кристаллическая структура комплекса РСД-АПФ2 достаточно подробно описана в работах [96,97]. Петля РСД контактирует с дугообразной спиралью протеолитического домена фермента АПФ2. Интерфейс связывания домена и фермента разделяют на три контактные зоны, в которых аминокислотные остатки с обеих сторон образуют различные межмолекулярные взаимодействия ([рисунк 1–16](#)). Первая контактная зона (зона 1) расположена со стороны N-конца, где аминокислоты домена Q₁₄₉₈, T₁₅₀₀ и N₁₅₀₁ образуют водородные мостики (на [рисунке 1–16](#) показаны желтыми линиями) с а. о. фермента Y₄₁, Q₄₂, K₃₅₃ и R₃₅₇.

Центральная часть $\alpha 1$ спирали фермента и петли домена контактируют посредством образования солевого мостика (фиолетовая пунктирная линия) между K₁₄₁₇ рецептор-

связывающего домена S-белка и K31 АПФ2, и π - π стекинг-взаимодействия (голубая пунктирная линия) между ароматическими кольцами Y₁₄₅₃ (РСД) и H34 (АПФ2). На С-конце (контактная зона 3) Q₁₄₇₄ РСД контактирует с Q24 фермента, а F₁₄₈₆ взаимодействует с M82 посредством ван-дер-ваальсовых взаимодействий [92].

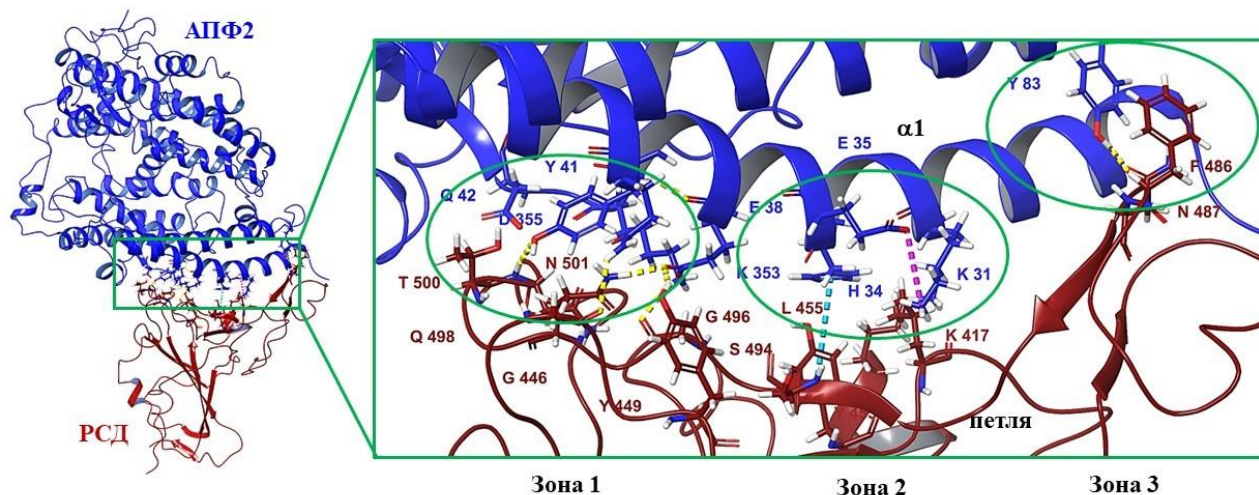


Рисунок 1-16 – Интерфейс связывания рецептор-связывающего домена S-белка коронавируса SARS-CoV-2: водородные связи, солевые мостики и π - π стекинг-взаимодействия показаны желтой, фиолетовой и голубой прерывистыми линиями, соответственно. Визуализация интерфейса связывания построена на основании PDB кода: 6VW1 [97].

В 2013 году авторы работы [98] на основании высокопроизводительного скрининга с использованием псевдовиральной системы среди 3000 соединений отобрали три соединения-лидера. Среди хитов интересна молекула **SSAA09E2** (**26**), которая ингибирует связывание поверхностного белка SARS-CoV-1 с АПФ-2 в микромолярных концентрациях (рисунки 1–17). Согласно авторам работы [98], соединение, вероятно, препятствует взаимодействию РСД с клеточным ферментом. Логичным продолжением исследования агента **26** является работа [99], в которой методами молекулярного моделирования оценивается аффинность вещества **27** и нилотиниба (**28**) при взаимодействии с самым «фармакологически опасным карманом» связывания, а именно в интерфейсе рецептор-связывающего домена и АПФ2. Результаты молекулярного докинга показывают высокую аффинность данных соединений к месту контакта домена и фермента. По мнению авторов связывание агентов **26** и **27** с РСД могут потенциально помешать некоторым важным межмолекулярным взаимодействиям между аминокислотами РСД и АПФ2, а именно Y₁₄₅₃ и H34; Q₁₄₉₃ и Q35; Y₁₄₄₉ и D38. И, если агент **27** действительно проявляет активность против SARS-CoV-2 в концентрациях 1.56 – 2.60 μ M [100,101], то опубликованных данных, подтверждающих активность вещества **26** против SARS-CoV-2 нет. Кроме того, в работе [102] авторы использовали флуоресцентные и магнитно-модулированные биосенсоры для разработки быстрого и чувствительного инструмента для скрининга

ингибиторов взаимодействия S-белка и АПФ2 и показали, что даже при самой высокой концентрации соединения **26** в 100 μM ингибирования взаимодействия РСД SARS-CoV-2 и АПФ2 не происходит.

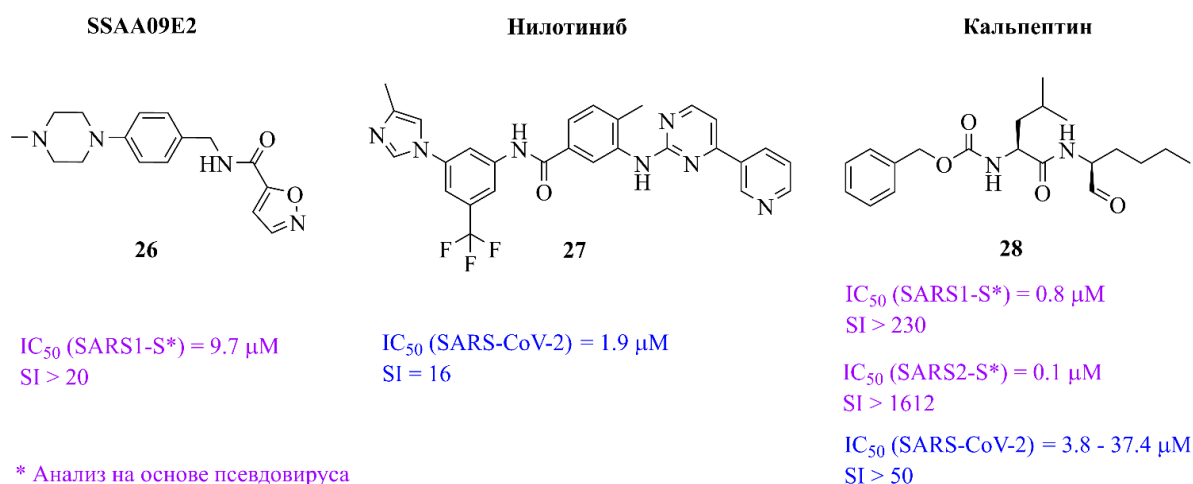


Рисунок 1-17 – Ингибиторы S-белка SARS-CoV-2.

В работах [91,99] на основании данных молекулярного моделирования показано, что биологической мишенью для вещества **27** является именно поверхностный белок, в то время как в работе [101] соединение **27** рассматривается в качестве ингибитора основной протеазы M^{PRO} . Результаты МД расчетов показывают высокую аффинность агента **27** к каталитическому сайту M^{PRO} . А в работе [103] проведен виртуальный скрининг восьми соединений, в том числе **27**, с целью оценки аффинности к комплексу NSP12-NSP7-NSP8, необходимому для репликации вирусной РНК. Авторы также отмечают, что все исследуемые соединения хорошо связываются с рассматриваемым комплексом и рекомендованы в качестве кандидатов для лечения коронавирусной инфекции. К сожалению, в большинстве публикаций об активных ингибиторах входа SARS-CoV-2 встречаются подобные противоречия. При этом, конечно, неправильно отрицать мультитаргетность агента **27** и возможность его двойного воздействия на SARS-CoV-2. Следует учитывать, что ингибиторы тирозинкиназы, к которым относится вещество **27**, показали свою активность в клинической практике [104,105].

В работе [106] авторы провели высокопроизводительный скрининг (HTS) обширной библиотеки лекарств, которые могут быть рассмотрены для поиска потенциальных терапевтических средства против SARS-CoV-2. Используя многоуровневый подход, которых включал в себя молекулярный докинг в совокупности с биологическими экспериментами, авторы описали кальпептин (**28**) (рисунок 1–17) в качестве активного и специфического ингибитора SARS-CoV-2, включая его высоковирулентные штаммы. Соединение **28** ингибирует поверхностный белок, связываясь с РСД с высоким сродством. Расположение лиганда в интерфейсе связывания домена с ферментом характеризуется образованием водородных

мостиков с S₁494, Y₁453; π - π и π -катион стекинг-взаимодействиями с Y₁505 и R₁403 (рисунок 1–18). Упомянутые аминокислотные остатки важны при взаимодействии РСД с АПФ2 [107]. Мутация N501Y, которая встречается во всех патогенных штаммах вируса, несколько ослабляет связывание агента **28** с РСД. Однако, в любом случае вещество **28** ингибирует различные штаммы коронавируса, а энергетические параметры связывания лиганда с доменом коррелируют с результатами биологических экспериментов [106].

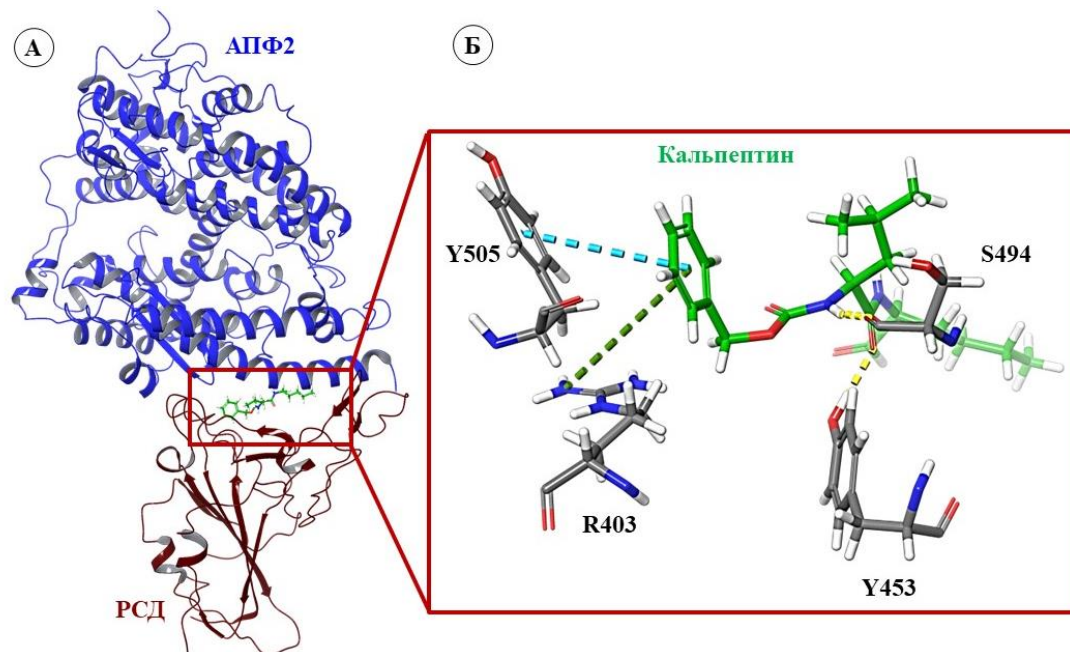


Рисунок 1-18 – Интерфейс взаимодействия РСД с АПФ2: А – место расположения кальпептина (**28**); Б – взаимодействие кальпептина с аминокислотами РСД: визуализация была создана на основании результатов молекулярного докинга, проведенных в условиях, описанных в [106]. Водородные связи показаны желтыми пунктирными линиями, π - π и π -катион стекинг-взаимодействия, синими и зелеными пунктирными линиями, соответственно. Геометрические параметры комплекса РСД-АПФ2 соответствуют PDB коду: 6M0J [107].

В работе [39] *in silico* скрининг 2467 соединений природного происхождения позволил авторам выбрать пять соединений предположительно активных против SARS-CoV-2, среди которых было выявлено природное соединение **H69C2** (**29**) (рисунок 1–19). На основании данных масс-спектропии и с помощью поверхностного плазмонного резонанса авторами показано, что вещество **29** может связываться с РСД с константой $K_D = 0.0947 \mu\text{M}$. На основании результатов процедуры молекулярного докинга объемная молекула **29** располагается в интерфейсе связывания домена и клеточного фермента с образованием водородных связей с ключевыми аминокислотами домена Q₁493 и S₁494, и дополнительно с R₁403 и D₁405. Также наблюдаются и гидрофобные взаимодействия с L₁455, Y₁495 и Y₁505. Кроме того, авторы [39] оценили аффинность агента **29** к РСД мутантных штаммов. В расчетах были рассмотрены четыре ключевых мутации РСД: K417N, L452R, E484K/Q и N501Y, и показано, что

аминокислоты в положении 452 и 484 не контактируют с молекулой **29**, и, следовательно, не влияют на связывание лиганда. Две другие мутации, наоборот, приводят к увеличению аффинности агента **29** к сайту связывания. В итоге авторы предлагают рассмотреть данное соединение в качестве возможной скаффолд-структуры. Однако ввиду его потенциальной гепатотоксичности рекомендуется структурная модификация данного соединения.

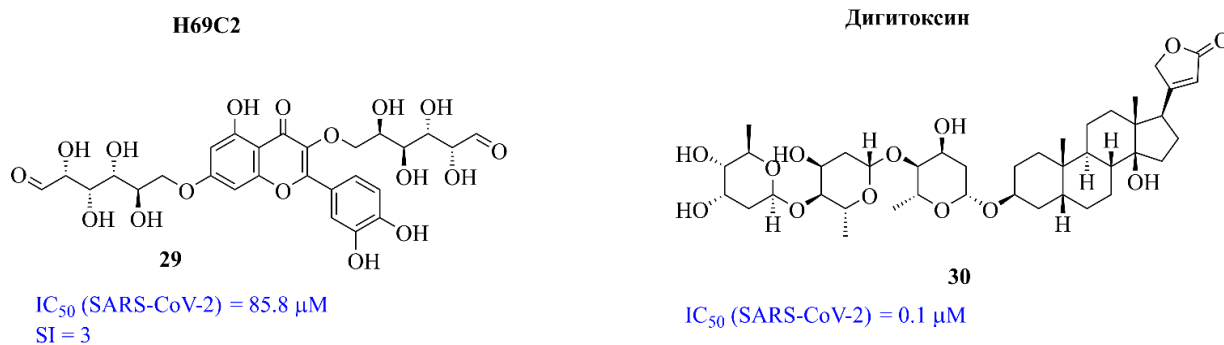


Рисунок 1-19 – Ингибиторы входа SARS-CoV-2.

Практика репозиционирования лекарственных препаратов позволила авторам [108,109] предположить, что сердечный гликозид дигитоксин (**30**) (рисунок 1–19) также может препятствовать связыванию РСД с АПФ2. Сообщается, что соединение проявляет активность против ДНК- и РНК-вирусов, таких как цитомегаловирус, вирус простого герпеса, вирус гриппа и коронавирус [108]. Значения IC_{50} , характеризующие активность гликозида **30** против SARS-CoV-2, колеблются от 0.1 до 0.2 μ M [93]. На основании результатов молекулярного моделирования (процедуры молекулярного докинга [108,109] и молекулярной динамики [108]) предполагается, что агент **30** располагается в РСД с образованием водородных связей с аминокислотами, входящими в мотив связывания домена с ферментом, а именно Y₁₄₅₃, V₁₄₁₇, G₁₄₈₅. Стероидный фрагмент молекулы **30** встроен в гидрофобный карман, образованный остатками Y₁₄₈₉, Q₁₄₈₄, G₁₄₈₅ и F₁₄₈₆.

Несмотря на существенные структурные различия рассматриваемых соединений (рисунок 1–17 и рисунок 1–19), авторы [39,91,99,106,108,109] предполагают, что молекулы (**26–30**) связываются именно в интерфейсе контакта домена и фермента, с образованием межмолекулярных взаимодействий с одинаковыми аминокислотами.

Наконец, в базе данных белков [14] представлены геометрические параметры S-белка SARS-CoV-2 в комплексе с линолевой кислотой (**31**) [85]. Сама линолевая кислота (ЛК) не проявляет каких-либо противовирусных свойств, однако усиливает действие ремдесивира. Результаты биологических испытаний оценки репликации вируса SARS-CoV-2 в клеточной культуре показывают синергизм: доза ремдесивира, необходимая для подавления репликации вируса, заметно снижалась при добавлении указанной жирной кислоты. Линолевая кислота

связывается с S_1 субъединицей поверхностного белка (рисунок 1–20А), в гидрофобном кармане связывания, расположенном в РСД. Соединение **31** располагается таким образом, что гидрофобная часть молекулы образует гидрофобные взаимодействия с окружающими гидрофобными аминокислотами, а карбоксильная группа контактирует с R1408 и Q1409 соседнего РСД (рисунок 1–20Б и 1–20В). Основным принцип действия ЛК заключается в стабилизации закрытой конформации поверхностного белка.

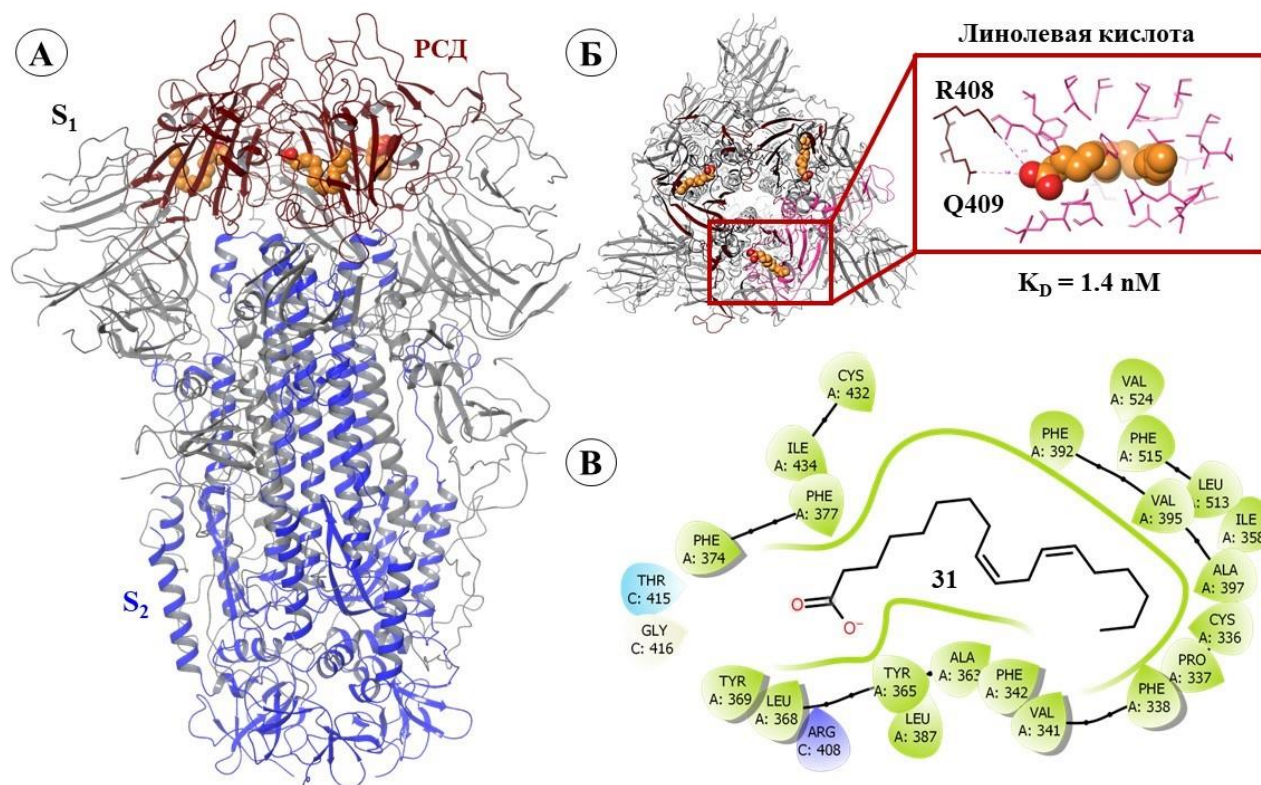


Рисунок 1-20 – Поверхностный вирусный белок SARS-CoV-2: А – третичная структура S-белка SARS-CoV-2 (PDB код 7OD3 [85]: вторичная структура РСД (а.о. 331 – 528) показаны темно-красным цветом; остальная вторичная структура S_1 субъединицы показана серым, S_2 – синим цветом; линолевая кислота (ЛК) показана оранжевым цветом; Б – трёхмерное расположение ЛК в гидрофобном кармане, якорные аминокислоты РСД соседнего протомера показаны темно-красным цветом; В – структурная формула ЛК в окружении аминокислот в радиусе 4Å: гидрофобные аминокислоты показаны зеленым цветом, положительно заряженные – фиолетовым, полярные – голубым, глицин показан кремовым цветом.

Кроме того, результаты расчетов методами молекулярной динамики **31** в открытой конформации белка демонстрируют высокую аффинность молекулы к сайту связывания в течение 500 нс. Здесь необходимо отметить, что гидрофобный карман удален от мотива связывания РСД с АПФ2. Однако, согласно авторам [85], подобный карман связывания присутствует у большинства высокопатогенных коронавирусов, так как существует связь между вирусной инфекцией и метаболизмом жирных кислот. Кроме того, аминокислотные последовательности поверхностных белков SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 демонстрируют

консервативность, включая якорные остатки R₁₄₀₈ и Q₁₄₀₉. Авторы предлагают использовать данный гидрофобный карман связывания для разработки ингибиторов входа.

В конце 2022 года выходит публикация [110] в которой сообщается, что *транс*-ретиновая кислота (**32**), метаболит ретинола (витамина А) демонстрирует выраженную противовирусную активность против SARS-CoV-2 (рисунок 1-21А). Здесь необходимо отметить, что первичный метаболит ретинола, как и сам ретинол также проявляют активность против вируса SARS-CoV-2. Однако индекс селективности у метаболита **32** заметно выше.

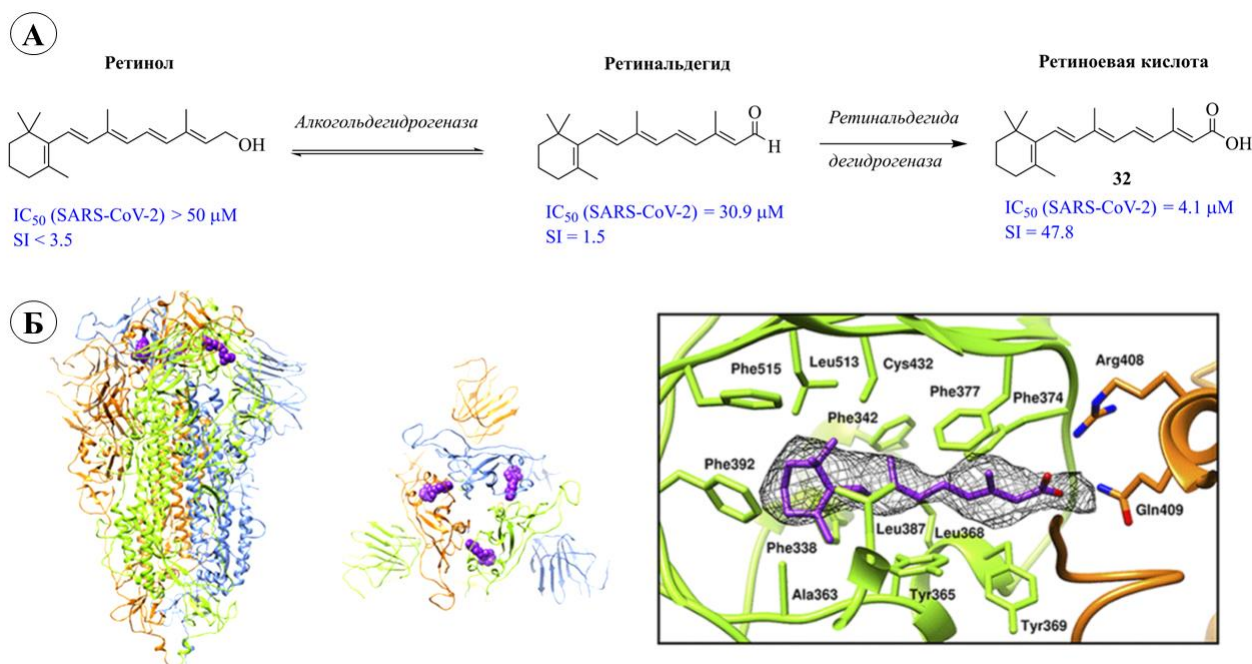


Рисунок 1-21 – *Транс*-ретиновая кислота как ингибитор входа SARS-CoV-2: А – метаболический путь витамина А; Б – связывание ретиновой кислоты в РСД S-белка: рисунки из оригинальной статьи [110].

Результаты твердофазного иммуноферментного анализа показали, что соединение **32** связывается с S-белком с константой диссоциации 3.44 μM (рисунок 1-21Б). Агент **32** мешает контакту домена с АПФ2: расположение вещества **32** блокирует конформационные перестройки домена, которые необходимы для раскрытия мотива связывания. Циклогексановый фрагмент ретиновой кислоты расположен в гидрофобном кармане и окружен боковыми цепями фенилаланинов (F₁₃₃₈, F₁₃₄₂, F₁₃₇₄, F₁₃₇₇, F₁₃₉₂, F₁₅₁₅) и тирозинами (Y₁₃₆₅ и Y₁₃₆₉). Полярная головка нарушает гидрофобные взаимодействия а.о. в интерфейсе связывания домена с ферментом. Замечательным фактом является то, что авторы статьи [110] записали геометрические параметры комплекса агента **32** с S-белком методом криоэлектронной микроскопии. Данные соответствуют PDB коду 7Y42. На конец декабря 2022 года – это пока **единственные** параметры лигандов в белке, которые можно использовать для разработки новых ингибиторов S-белка, связывающихся с РСД.

1.2.2.3.2. Сайт связывания в N-терминальном домене S₁

N-терминальный домен S-белка коронавируса содержит примерно около 290 аминокислотных остатков. На основании данных криоэлектронной микроскопии и рентгеноструктурной кристаллографии авторы [84] определили карман взаимодействия биливердина (33), промежуточного продукта распада гемоглобина, расположенного в N-терминальном домене поверхностного белка (рисунок 1–22А). Согласно авторам данной работы, метаболит плотно прилегает к карману связывания, который насыщен гидрофобными аминокислотными остатками (на рисунке 1–22Б показаны зеленым цветом). Между атомами биливердина и остатками N₁₂₁, R₁₉₀, H₂₀₇ образуется ряд межмолекулярных взаимодействий (рисунок 1–22А). Связывание метаболита 33 с S-белком характеризуется константой диссоциации $K_D = 9.8 \pm 1.3$ nM. Согласно [84] биливердин в физиологических концентрациях ослабляет реактивность S-белка SARS-CoV-2. Кроме того, повышенный уровень билирубина коррелирует с показателями смертности среди пациентов с COVID-19. Эти исследования интересны, с одной стороны, с точки зрения понимания патогенеза COVID-19, а с другой, возможно, могут быть полезными для разработки низкомолекулярных ингибиторов входа.

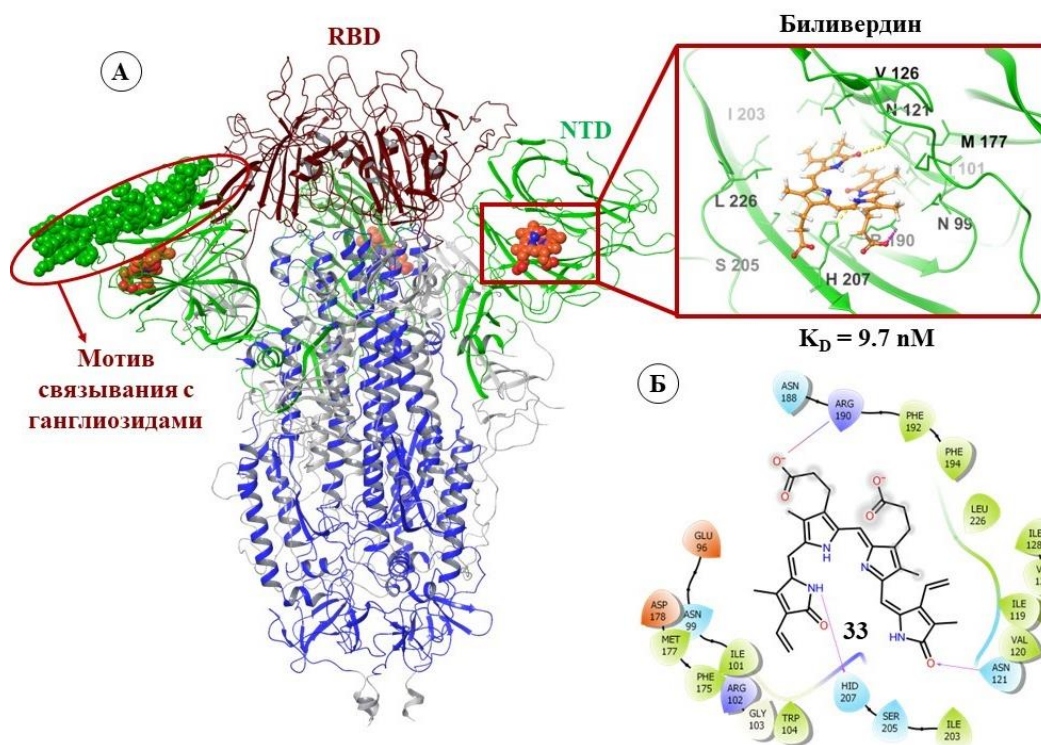


Рисунок 1-22 – Третичная структура S-белка SARS-CoV-2: А – визуализация S-белка (PDB код 7NT9 [84]): вторичная структура РСД (а.о. с 331 – 538) показана темно-красным цветом; вторичная структура NTD (а.о. с 14 по 330) показана зеленым цветом; 111 – 158 а.о., входящие в мотив связывания, показаны зелеными молекулами; остальная вторичная структура S₁ субъединицы показана серым, S₂ – синим цветом; биливердин показан оранжевым цветом;

водородные и солевые мостики показаны желтой и фиолетовой пунктирными линиями; Б – структурная формула биливердина в окружении аминокислот в радиусе 5Å: гидрофобные аминокислоты показаны зеленым цветом, положительно и отрицательно заряженные – фиолетовым и оранжевым цветами, соответственно, полярные – голубым, глицин показан кремовым цветом.

Функция N-терминального домена поверхностного белка недостаточно хорошо изучена [84]. Известно [111], что сегмент домена с 111 по 158 аминокислоту является мотивом для связывания ганглиозидов (рисунок 1–21А). Другими словами, это место прикрепления вируса к липидным рафтам – участкам плазматической мембраны, обогащённым гликофинголипидами и холестерином. Предполагается, что взаимодействие этой зоны с липидными рафтами впоследствии облегчает контакт РСД с клеточным АПФ2. Теоретически ганглиозид-связывающий домен спайк-белка может быть рассмотрен в качестве потенциального места связывания ингибиторов входа [111].

Антибиотик широкого спектра азитромицин (34) проявляет противовирусную активность [93] против SARS-CoV-2 в микромолярных концентрациях (рисунок 1–23). Согласно данным молекулярного моделирования, соединение 34 [112,113] может связываться с консервативными аминокислотными остатками ганглиозид-связывающего N-терминального домена, а именно с E₁₄₃, F₁₃₅ и N₁₃₇. Кроме того в работе [113] показано, что агент 34 может связываться с M^{PRO} с высокой аффинностью. Вывод сделан на основании данных процедуры молекулярного докинга. Помимо азитромицина 34, еще два соединения, хлорохин (35) и гидроксихлорохин (36), активны против SARS-CoV-1 [114] и SARS-CoV-2 [93]. Предполагается, что вероятный механизм их противовирусного действия заключается в ингибировании основной протеазы. Однако полномасштабное молекулярное моделирование позволило авторам [111] предположить, что в присутствии данных соединений вирусный S-белок теряет способность к прикреплению к липидным рафтам.

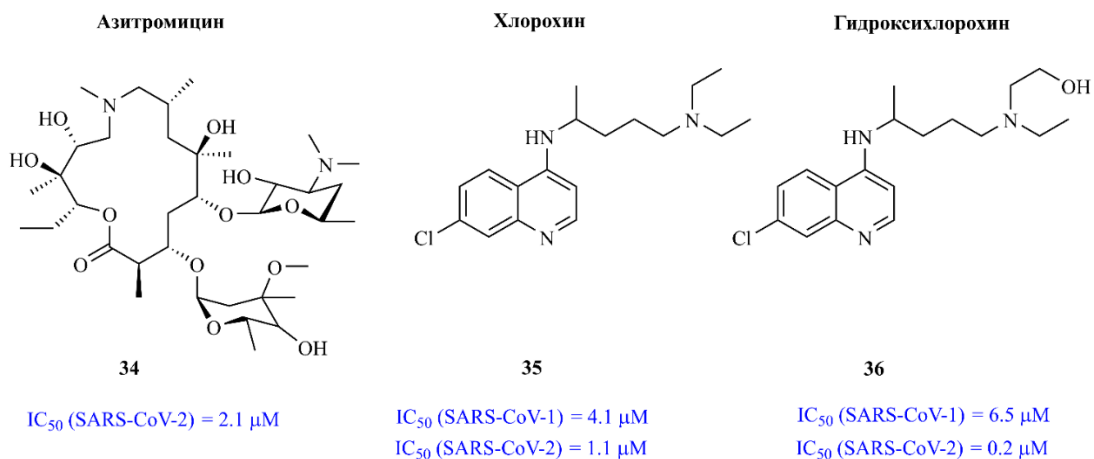


Рисунок 1-23 – Ингибиторы входа SARS-CoV-2

При этом основной механизм действия веществ **35** и **36** заключается в их конкурирующем взаимодействии именно с ганглиозидами, а не с самим поверхностным белком. Несмотря на описанные результаты об активности указанных структур против SARS-CoV-2, в клинической практике их активность оказалась невысока, и оба препарата сейчас **исключены** из рекомендаций по лечению COVID-19.

1.2.2.4. Сайты связывания в S_2 субъединице

С эволюционной точки зрения рецептор-связывающий домен коронавирусов является наиболее мутируемой областью, что сильно затрудняет разработку противовирусных препаратов широкого спектра. Вторая субъединица S_2 гликопротеина коронавируса – гораздо более консервативная часть белка [12]. Область гептадного повтора 1 (HR1) в субъединице S_2 образует гомотримерный комплекс, который в результате конформационных перестроек высвобождает три высококонсервативных гидрофобных борозды на поверхности, связанные с гептадным повтором 2 (HR2). Структура шести спиралей формируется в процессе слияния и помогает сблизить вирусную и клеточную мембраны для формирования поры слияния [76].

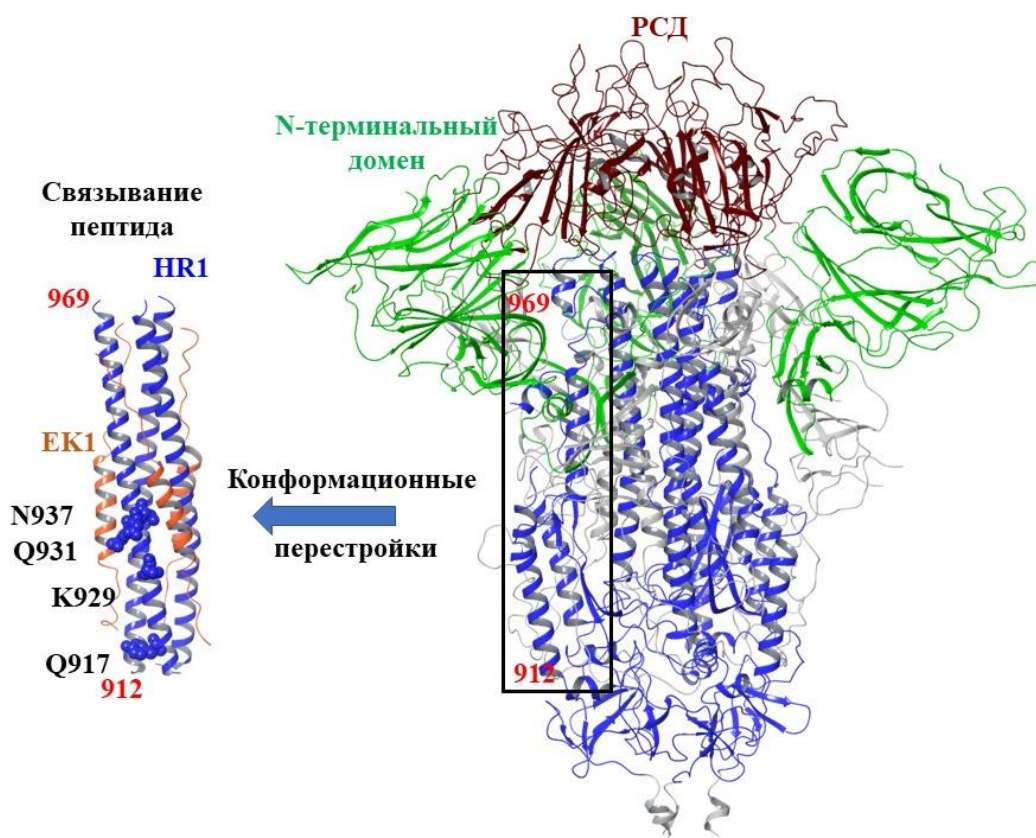


Рисунок 1-24 – Сайты связывания ингибиторов спайк-белка во второй субъединице S_2 : А – связывание пептида ЕК1 с высоко консервативной частью гептадных повторов. Визуализация построена на основании PDB кода 7C53 [116]. Указаны аминокислоты HR1 с которыми пептид образует значимые межмолекулярные взаимодействия.

Пептиды, полученные из области HR2 белков слияния I типа, таких как ВИЧ-1, респираторно-синцитиальный вирус, вирус Эбола и ряд других, могут конкурентно связываться с вирусным гептадным повтором 1 и эффективно ингибировать вирусную инфекцию [92,115]. Связывание пептидов происходит после конформационных перестроек, когда HR1 образует вытянутые α -спирали (рисунок 1–24). В конформационных перестройках гептадные повторы (HR1) до момента активации (понижения pH среды) находятся в сжатом состоянии. Стабилизации «сжатого», или префузионного состояния малыми молекулами может препятствовать конформационным переходам и, как следствие, ингибировать слияние вирусной и клеточной мембран. Однако место связывания малых ингибиторов в S₂ поверхностного белка коронавируса до сих пор является спорным вопросом.

Одним из первых кандидатов в потенциальные ингибиторы второй субъединицы S-белка был рассмотрен умифеновир (**8**) – ингибитор НА вируса гриппа [54]. Умифеновир умеренно активен против вируса SARS-CoV-2 в тестах *in vitro* в концентрациях от 4.1 до 11.0 μ M (рисунок 1–25) [117,118]. На основании данных молекулярного моделирования Ванкадари в работе [119] описывает возможное место связывания **8** в области гептадных повторов S-белка (рисунок 1–25). Как было описано выше, умифеновир (или арбидол) связывается в стеблевой части гемагглютиниона вируса гриппа, препятствуя переходу из префузионной в постфузионную конформацию и, как следствие, слиянию вирусной и клеточной мембран. Гемагглютинин гриппа и S-спайк белок коронавируса SARS-CoV-2 относятся к поверхностным белкам I типа со схожим механизмом слияния. Наличие схожих гептадных повторов в данных белках позволяет предположить похожие гидрофобные полости в пространстве между α -спиралями стеблевой части протеина. На основании анализа аминокислотных последовательностей субъединиц НА₂ и S₂ автор [119] определил потенциальное место связывания арбидола в небольшой области S₂ домена коронавируса. Предполагается, что соединение **8** взаимодействует с ключевыми аминокислотными остатками стеблевой части и эффективно блокирует или препятствует переходу из префузионной в фузионную конформацию. Интересно, что авторы работы [120] описывают альтернативный сайт связывания вещества **8**, расположенный в РСД, в зоне контакта домена с клеточным ферментом (рисунок 1–25). В сети Интернет публикация [120] появилась раньше, чем [119], но долгое время находилась в стадии предварительного просмотра (pre-viewer). На основании каких предположений авторы [120] выбрали РСД в качестве места связывания соединения **8**, не ясно.

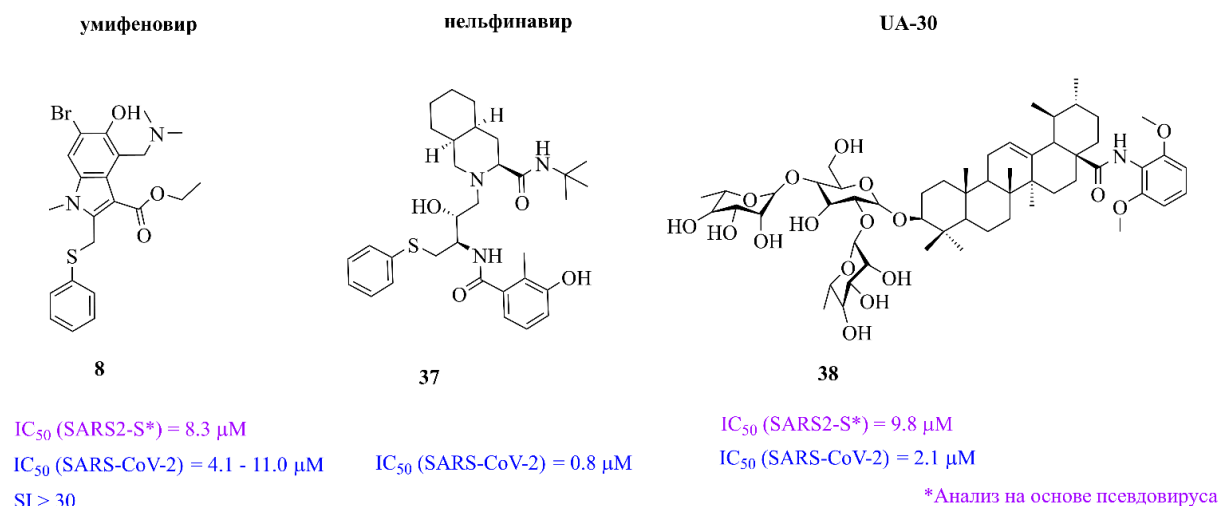


Рисунок 1-25 – Ингибиторы фузогенной активности S-белка коронавируса.

Показано, что пероральный ингибитор протеазы ВИЧ-1 нелфинавир (**37**) ингибирует протеазу M^{PRO} SARS-CoV-1 [93]. Кроме того, соединение проявляет активность против SARS-CoV-2. Весьма логично предположить, что противовирусный агент **37** может ингибировать и основную протеазу M^{PRO} SARS-CoV-2. В работах [121,122] при помощи молекулярного моделирования показано, что соединение **37** проявляет выраженную аффинность к активному сайту M^{PRO}. Кроме того, нелфинавир ингибирует слияние вирусной и клеточной мембран и может быть рассмотрен в качестве ингибитора входа SARS-CoV-2. Результаты процедуры молекулярного докинга позволили авторам [123] определить возможный регион связывания агента **37**, расположенный между спиралями HR1 и нижней части N-терминального домена (рисунок 1–26). Подобное место связывания ингибиторов слияния также описано в работе [124].

Соединение UA-30 (**38**) ингибирует поверхностный белок SARS-CoV-2, связывается в полости между двумя субъединицами, и тем самым стабилизирует префузионную конформацию белка. Место связывания определено не только на основании молекулярного моделирования, но и на основании данных биологических экспериментов.

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 показала необходимость в разработке новых противовирусных препаратов. Поверхностный вирусный белок SARS-CoV-2 – это вторая из самых популярных мишеней. Использование методов молекулярного моделирования здесь оправдано [125] как минимум в рамках поиска места связывания потенциальных ингибиторов входа. В каждой второй статье, посвященной ингибиторам спайк-белка, используются методы молекулярного моделирования.

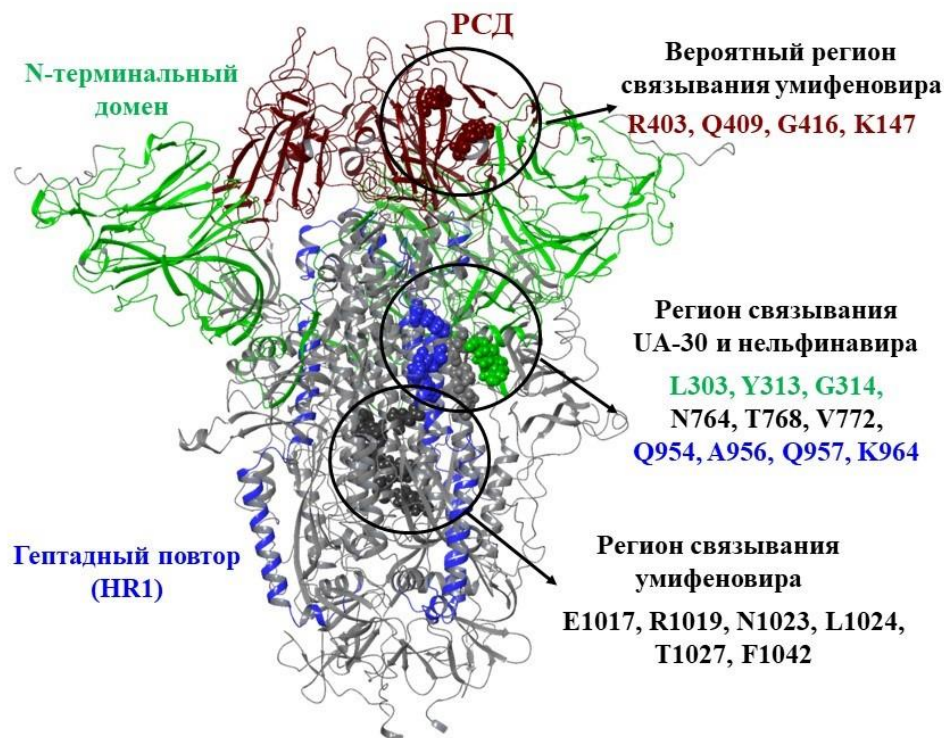


Рисунок 1-26 – Сайты связывания ряда ингибиторов слияния S-белка. Указаны ключевые аминокислоты.

Практика репозиционирования лекарственных препаратов часто начинается именно с *in silico* скрининга библиотеки соединений, одобренных FDA, с последующими биологическими тестами. Однако, следует отметить, что на конец декабря 2022 года в базе данных Protein Data Bank присутствуют геометрические параметры только **одного** комплекса S-белка с лигандом **32**, расположенным в РСД, что в значительной степени затрудняет комплексную работу по поиску ингибиторов и пониманию механизма их противовирусной активности.

1.2.3. F-протеин респираторно-синцитиального вируса (РСВ)

1.2.3.1. Структура и функция F-белка

Обнаруженный более 50 лет назад респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) до сих пор считается наиболее частой причиной острых инфекционных заболеваний у детей младшего возраста и пожилых пациентов. РСВ человека типа А и В относят к семейству *Pneumoviridae*. Структурно вирион представляет собой вирусную частицу диаметром примерно 150 нм [126]. Геном РНК упакован в вирион и кодирует ключевые внутренние структурные белки: матричный белок (М), нуклеопротеин (N), неструктурные белки и экспонированные извне трансмембранные гликопротеины (F-белок, G-белок и SH – малый гидрофобный белок).

F-протеин, один из двух основных гликопротеинов респираторно-синцитиального вируса на поверхности вириона, контролирует начальные фазы инфекции, вызывая слияние вирусных и клеточных мембран. Гликопротеин состоит из 574 аминокислотных остатков, общей молекулярной массы около 70 кДа. Белок существует в виде тримера гетеродимеров, свернутых до слияния в компактную конформацию [127]. Три ковалентно связанные дисульфидным мостиком субъединицы F₂/F₁ образуют конусообразную структуру с шаровидной головкой и удлиненным стеблем (рисунок 1–27А).

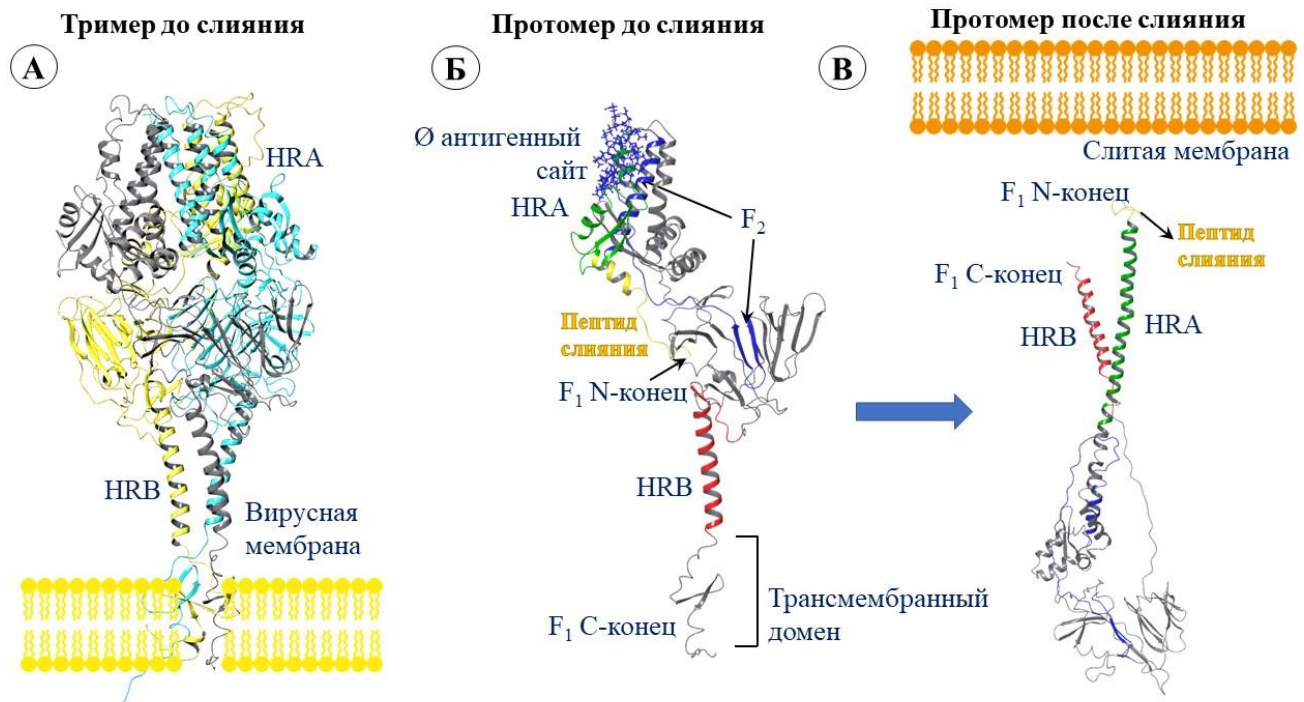


Рисунок 1-27 – Третичная структура F-гликопротеина RSV: А – визуализация полноразмерного тримера; Б – визуализация протомера в конформации до слияния (модель построена на основании PDB кода 7LVW [130]), В – визуализация протомера в конформации после слияния (модель построена на основании PDB кода 6CXC [128]).

Стеблевая часть практически полностью спиралевидная, состоит из гептадных повторов, что характерно для белков слияния I типа [128,129]. N-конец F₁ содержит пептид слияния, который полностью погружен в полость центрального тримера. С-конец F₁ содержит трансмембранный домен (525–550 а.о.) и цитоплазматический хвост (551–574 а.о.) [128]. Два фуриноподобных сайта расщепления располагаются по остаткам 109 и 136. Шесть гептадных повторов состоят из трех α -спиралей в центре белка (HRA) и трех антипараллельных спиралей (HRB) в стеблевой части (рисунок 1–27А). Последовательности F-гликопротеинов штаммов А и В РСВ хорошо консервативны (более 90%) [128,129]. Большая часть варибельности белка (~25%) обнаруживается в пределах антигенного сайта на вершине тримера перед слиянием (антигенный сайт Ø), состоящего из α -спирали из F₁ (196–210 а.о.) и петли (62–69 а.о.) из F₂.

Этот сайт является участком, определяющим специфический противовирусный иммунитет (рисунок 1–27Б) [128–131]. Неизвестный триггер запускает механизм ре-фолдинга гликопротеина, при котором белок претерпевает существенные конформационные перестройки. Гидрофобный пептид на N-конце субъединицы F₁ вытягивается из центральной полости тримера и встраивается в мембрану клетки-хозяина. Образовавшееся промежуточное метастабильное состояние подвергается повторной укладке. При этом гептадные повторы, примыкающие к пептиду слияния HRA приближаются к гептадным повторам (HRB), расположенным вблизи трансмембранной области С-конца F₁ (рисунок 1–27В). В результате формируется «шпилька», чрезвычайно стабильная конформация F-белка, состоящая из шести переплетенных спиралей, которая «сближает» вирусные и клеточные мембраны. Ингибирование любой из этих стадий во время процесса слияния может предотвратить проникновение вируса и заражение клеток-хозяев и, таким образом, может служить мишенью для терапевтического вмешательства [127,129].

1.2.3.2. Сайт связывания ингибиторов F-белка

Согласно авторам работы [129], большинство низкомолекулярных ингибиторов входа РСВ нацелены именно на F-белок. В качестве вероятной причины такой избирательности считают метастабильную природу гликопротеина. Предполагается, что небольшие молекулы, связываясь в центральной полости тримера, могут вызвать либо преждевременные конформационные перестройки, до того, как вирион окажется в непосредственной близости к мембране клетки мишени, либо препятствуют тем же самым перестройкам после контакта F-белка с клеткой хозяина.

В 2004 году на основании скрининга химической библиотеки соединений Bristol-Myers Squibb авторы [132] идентифицировали соединение **BMS-233675 (39)** (рисунок 1–28), активное против РСВ. Структурная модификация привела к созданию более биодоступной молекулы **BMS-433771 (40)**, активной при пероральном введении. Предполагается [132,133], что агент **40** является ингибитором ранней стадии вирусной инфекции. Вероятно, соединение связывается с F-белком в метастабильном состоянии после запуска конформационных перестроек, предшествующих процессу слияния [133]. В тестах *in vitro* блокировка F-белка проявляется в том, что вещество **40** ингибирует образование синцития, еще одного процесса, опосредованного белком F. С целью определения вероятного места связывания агента **40** были получены резистентные штаммы вируса. Секвенирование генов F-белка позволило обнаружить ряд аминокислотных замен, локализованных в пептиде слияния а.о. F140I и V144A; и С-концевом гептадном повторе (D489Y). Также в резистентном штамме вируса была обнаружена замена К на R в положении 394 в субъединице F₁. Подобная мутация приводит к увеличению значения

ингибирующей концентрации соединений **38** и **39** более чем в 1250 раз по сравнению с исходным вирусом дикого типа [132].

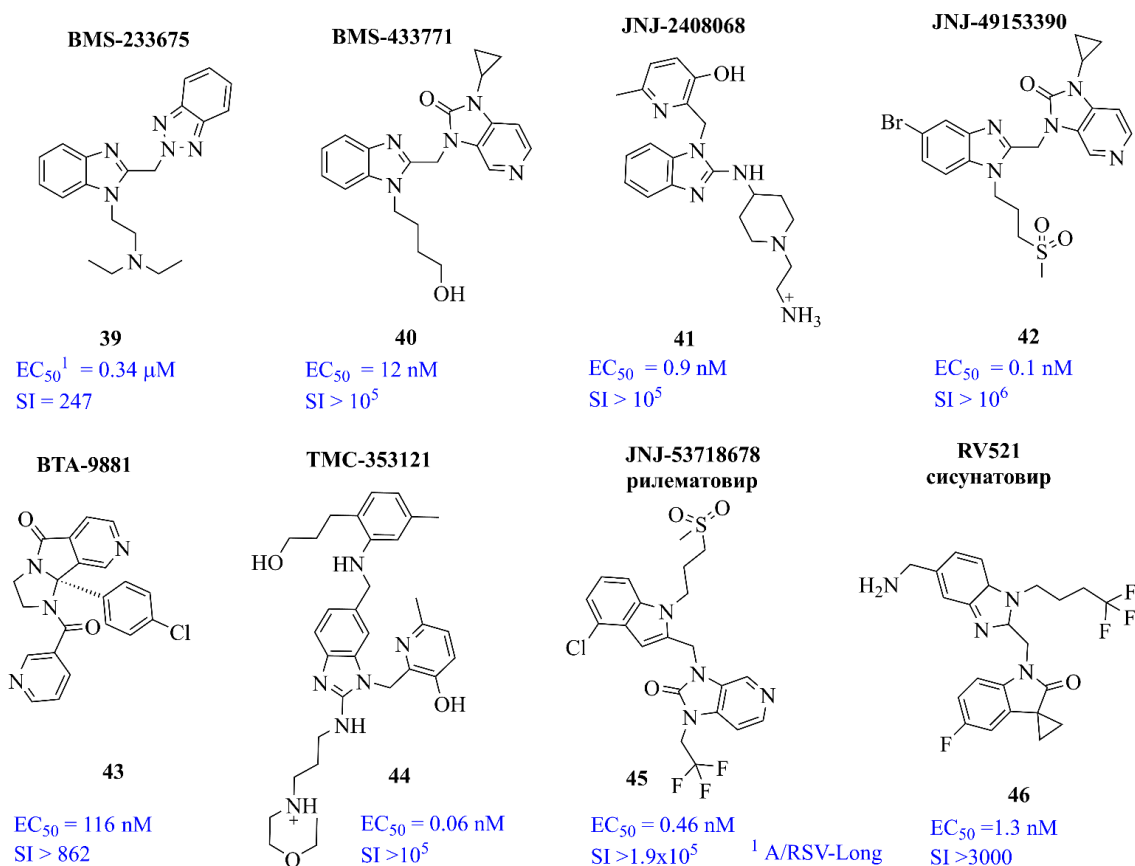


Рисунок 1-28 – Ингибиторы слияния F-белка РСВ.

Нетоксичное производное бензимидазола **JNJ-2408068 (41)** проявляет активность против РСВ в наномолярных концентрациях в первые часы заражения [134]. На основании данных биологических экспериментов, включающих мутагенез, в совокупности с результатами молекулярного моделирования в работе [135] описан механизм противовирусного действия вещества **41**. Предполагается, что соединение может связываться внутри тримера, в гидрофобной полости, образованной шестью аминокислотами двух соседних повторов HRA и HRB. В область связывания попадают а.о. с 486 по 488, с которыми ингибитор может вступать в непосредственные взаимодействия. Замены именно в этих положениях напрямую влияют на взаимодействие F-белка с ингибитором, что и приводит к изменению восприимчивости вируса.

В 2016 году в работе [127] методами PCA представлены пространственные структуры протомера F-белка с ингибиторами **39-44** (рисунок 1–28), проявляющими выраженную противовирусную активность против РСВ [133–136]. PDB коды комплексов протомер-ингибитор представлены в [приложении](#) таблица 5–1. Каждый ингибитор связывается в симметричной полости внутри тримера F-белка (рисунок 1–29A). В сайт связывания входят а.о.

(F140, L141, D486, E487, F488) каждого протомера, которые симметрично окружают соединения **39–44** (рисунок 1–29Б).

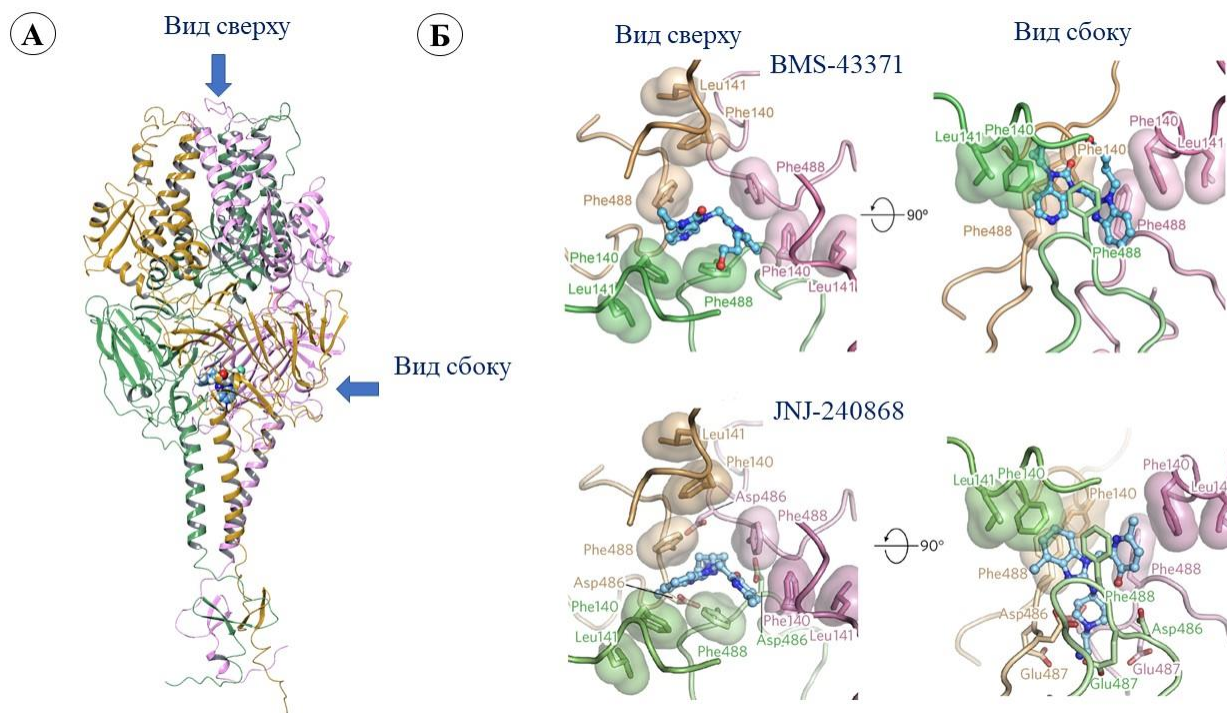


Рисунок 1-29 – Расположение ингибиторов внутри тримера F-белка: А – полноразмерный тример визуализирован на основании PDB кода 7LVW [130], голубым цветом показана молекула ингибитора; Б – расположение ингибиторов **39** и **40** в окружении значимых а.о. сайта связывания (рисунки собраны из оригинальной статьи [127]).

Ароматические кольца ингибиторов образуют π - π стекинг-взаимодействия с фенилаланинами в положении 140 и 488, расположенными в пептиде слияния и в гептадном повторе (HRB), соответственно (рисунок 1–30). Кроме того, положительно заряженные боковые заместители ингибиторов **41** и **44** достигают отрицательно заряженных а.о. D486 и E487.

Пептид слияния, расположенный на конце F₁ субъединицы, и α -спираль гептадного повтора (HRB), расположенная на С-конце F₁ претерпевают в процессе слияния резкие конформационные перестройки. Ингибиторы **39–44** действуют как антагонисты перегруппировки F-белка: соединения связывают пептид слияния с гептадным повтором (HRB), чем стабилизируют конформацию до начала процесса слияния. Согласно работе [127], при связывании в тримере белка ингибиторы, вероятно, изменяют положение F488, D489 и T400. Мутации в F-белке в областях, близких к этим аминокислотам, приводят к увеличению устойчивости вируса к данным ингибиторам. В дальнейшем соединения **40**, **41** и **44** были доведены до поздней стадии доклинической разработки [137]. Однако исследования были прекращены по причине их неблагоприятного фармакологического профиля [138].

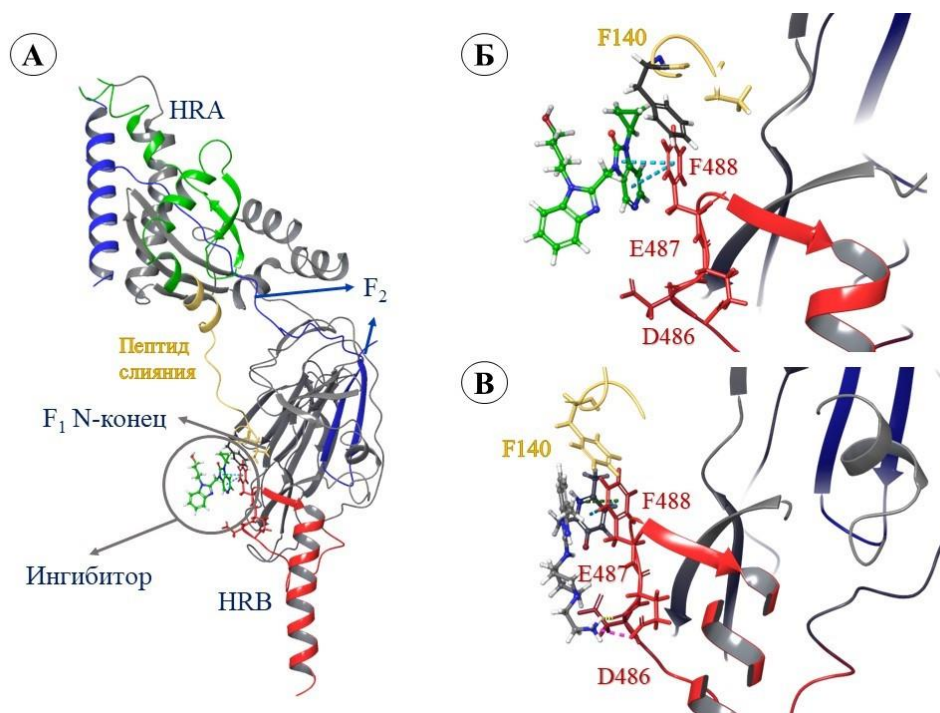


Рисунок 1-30 – Вторичная структура протомера F-белка в комплекса с ингибиторами А – положение ингибитора **40** относительно протомера F-белка: субъединица F₂ (а.о. 22–109) показана синим цветом, пептид слияния (FP) показан желтым цветом (а.о. 137–155), гептадные повторы HRA и HRB показаны зеленым (а.о. 156–214) и красными цветами (а.о. 476–524), соответственно. Б, В – взаимодействие ингибиторов **40** (зеленая молекула) и **41** (серая молекула) с аминокислотами сайта связывания: π - π и π катион стекинг-взаимодействия показаны голубыми и зелеными прерывистыми линиями, солевой мостик – фиолетовым, водородные связи – желтой пунктирной линией. Визуализация связывания ингибиторов **40** и **41** сделана на основании PDB кодов 5EA7 и 5EA3, соответственно.

С точки зрения клинических испытаний производное индола **JNJ-53718678** (рисунок 1–28), или рилематовир (**45**), занимает ведущее место среди ингибиторов F-белка [138,139]. Нетоксичное соединение **45** ингибирует процесс слияния в наномолярных концентрациях, с высоким индексом селективности [140]. На данный момент **45** проходит II фазу клинических испытаний на взрослых и детях [139]. Высокопроизводительный скрининг с последующей структурной модификацией позволил авторам найти бензимидазол **RV521** (рисунок 1–28), или сисунатовир (**46**) [141]. Как и большинство описанных ингибиторов, противовирусный агент **46** ингибирует F-белок в наномолярных концентрациях, в совокупности с низкой токсичностью. Соединения **45** и **46** связываются внутри тримера, в так называемой полости DS-Cav1 [131], образуя ряд межмолекулярных контактов с описанными выше а.о., а именно F140, L141, F488, D489 (рисунок 1–31).

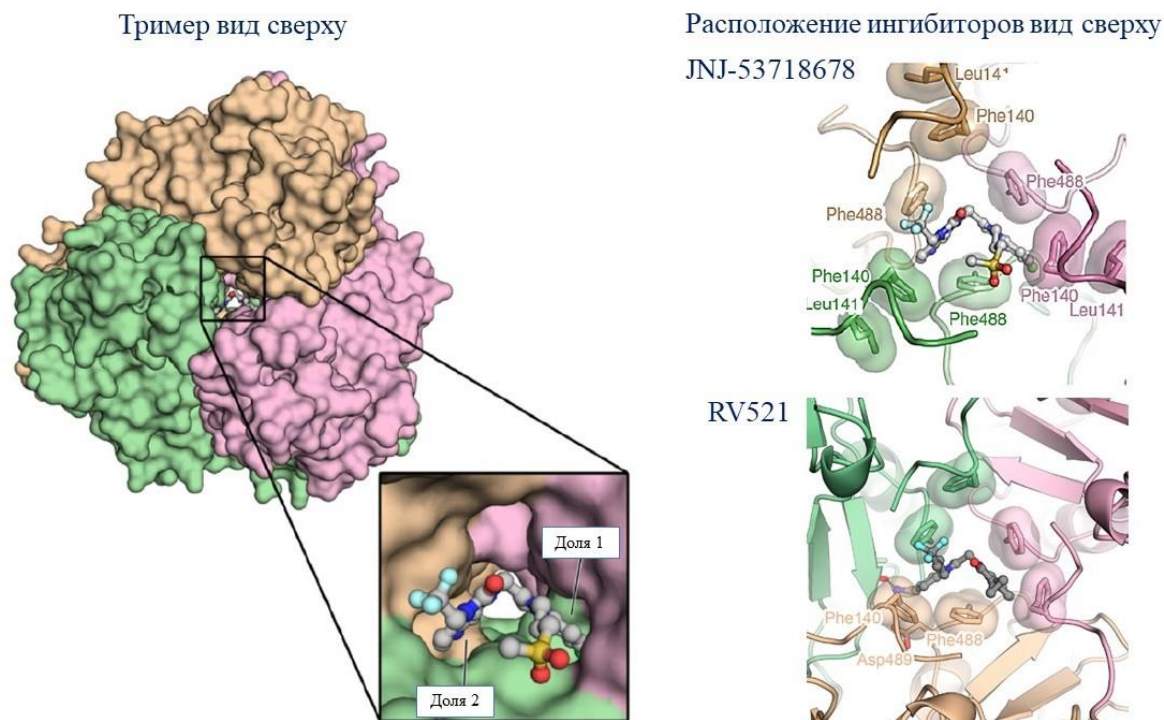


Рисунок 1-31 – Расположение ингибиторов **45** и **46** в полости DS-Cav1 [131]. Рисунок собран из оригинальных изображений из публикаций [140] и [141].

Таким образом, ингибиторы слияния F-белка РСВ **39–46** разнообразного строения (рисунок 1–28) связываются в полости DS-Cav1, образуя ряд межмолекулярных контактов с определенными аминокислотами. При этом ключевыми а.о. являются именно фенилаланины в положении 144 (область пептида слияния) и в положении 488 области гептадного повтора HRB. Механизм влияния описанных ингибиторов схожий: связываясь в полости DS-Cav1, соединения стабилизируют конформацию белка, затрудняя необходимые конформационные перестройки. В отличие от описанных выше ингибиторов НА и S-белка, на один тример приходится один ингибитор, в отличие от гемагглютинирина вируса гриппа и поверхностного белка SARS-CoV-2, где для стабилизации конформации белка в префузионном положении требуется как минимум три ингибитора. На все описанные ингибиторы в базе данных Protein Data Bank представлены пространственные структуры комплексов протомер-ингибитор, которые, безусловно, облегчают задачу для разработки и поиска новых ингибиторов слияния F-белка.

Соединение **47** и его аналог **48** [142] проявляют выраженную ингибирующую активность против РСВ (рисунок 1–32). Впервые эти ингибиторы были описаны в 2015 году. Интересно, что авторы приводят результаты процедуры молекулярного докинга в F-белок. Учитывая очевидную схожесть структур **40** и **47**, авторы проводят докинг обеих структур, но в качестве потенциального места связывания рассматривают область гептадного повтора НВА (а.о. 156–214) или точнее, область антигенного сайта Ø. В качестве ключевых а.о. упоминаются K191,

V192, D194 и L195. В качестве обоснования места связывания авторы [142] ссылаются на работу [143], и это удивительно. В работе [143], действительно, описываются результаты молекулярного моделирования связывания соединения **40** с поверхностным F-белком, и в качестве потенциального места связывания рассматривается гидрофобная полость в области гептадного повтора HBA и полость внутри тримера белка, где ключевыми являются аминокислоты F483, F488 и I492. При этом основным выводом публикации является следующая фраза: *«Расположение данных ингибиторов в сайте связывания нарушает межмолекулярный контакт между а.о. F483 и F488, что впоследствии изменяет конфигурацию «шпильки», которая имеет решающее значение при слиянии вирусных и клеточных мембран»* [143]. Другими словами, для вещества **40** предпочтительным местом связывания является полость внутри тримера, в области, где пептид слияния контактирует с HRB. Почему авторы [142] не рассмотрели другой (наиболее вероятный) сайт связывания ингибиторов, остается загадкой. В любом случае опубликованные геометрические параметры комплексов [127] протомер-ингибитор (**40–44**) поставили точку в вопросе, где связываются ингибиторы F-белка. **GS-5806** или презатовир (**49**), еще один многообещающий эффективный ингибитор слияния РСВ, проходит вторую фазу клинических испытаний и потенциально способен лечить инфекцию, вызванную вирусом у младенцев и взрослых [144,145]. На основании данных молекулярного моделирования [146], ингибитор **49** связывается в области DS-Cav1, в окружении аминокислот пептида слияния F140, L141 и гептадного повтора HRB S398, T400, D486 и E487.

В заключение хочется отметить работу [138], в которой провели ряд молекулярно-динамических симуляций ингибитора **45** и молекулярный докинг собственной библиотеки сильнодействующих бензимидазолсодержащих противовирусных агентов, среди которых соединения-лидеры **50** и **51** (рисунки 1-32). Авторы оценили поведение ингибитора **45** внутри тримера F-белка в течение 20–30 нс симуляции, описали фармакофорный профиль сайта связывания и провели фармакофорный структурно-ориентированный анализ собственной библиотеки соединений и оценку значений ADMET параметров относительно известных ингибиторов **40–46**.

Столь широкомасштабные расчеты позволили авторам сделать весьма ожидаемый вывод: наличие бензимидазольного кольца в структуре ингибиторов F-белка обеспечивает образование π - π и π -катион стекинг-взаимодействий с фенилаланинами сайта связывания. Локализация молекул ингибитора внутри тримера стабилизирует префузионную конформацию белка. Таким образом, именно бензимидазольное кольцо является ключевой основой для создания эффективных ингибиторов слияния РСВ [138].

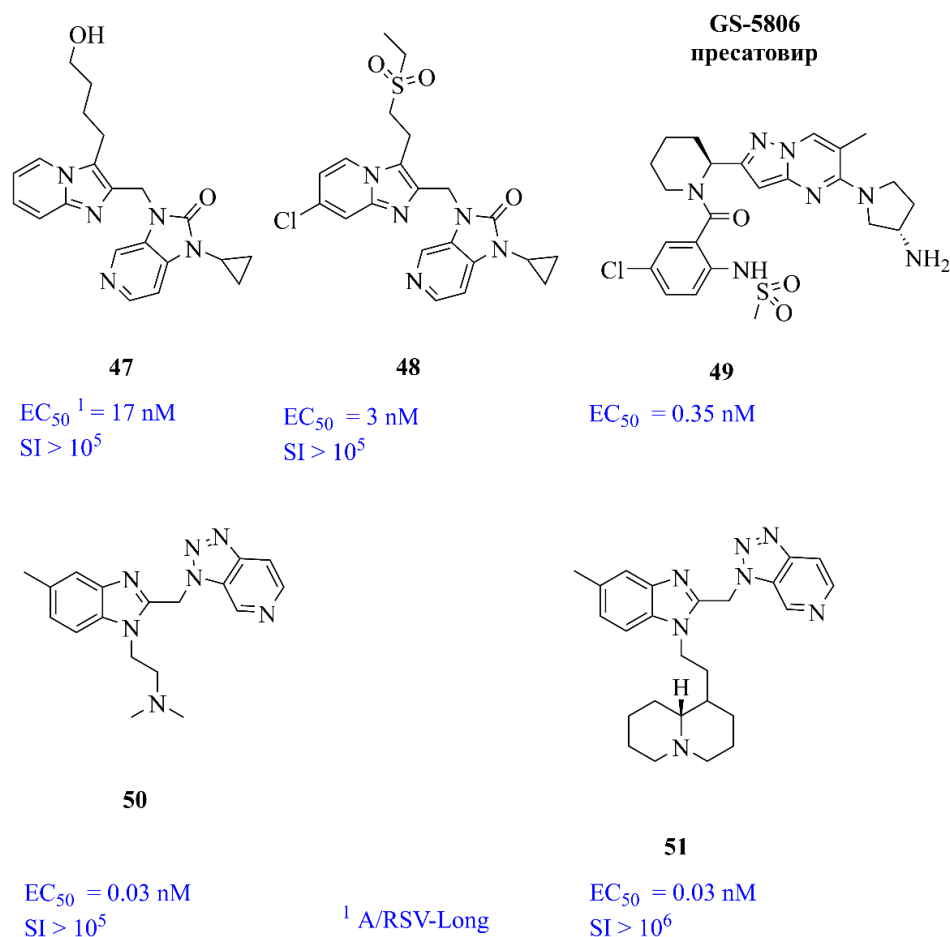


Рисунок 1-32 – Ингибиторы F-белка РСВ.

Все рассмотренные ингибиторы слияния **39–51** имеют общий скаффолд и связываются в одном и том же месте: внутри тримера F-белка. В основном ингибиторы образуют межмолекулярные взаимодействия с а.о. F140, D486, F488. Практически все соединения при культивировании вируса в их присутствии могут приводить к селекции вируса, несущего мутацию F-белка D489Y, что приводит к устойчивости вируса к препарату. Интересно, что на данный белок приходится только один сайт связывания ингибиторов, в отличие от рассматриваемых выше НА и S-белка. Кроме того, в известных ингибиторах F-белка присутствует один общий скаффолд. Другими словами, теоретические исследования F-белка РСВ проводить значительно проще, в отличие от гемагглютинина вируса гриппа и поверхностного белка SARS-CoV-2.

1.2.4. Гликопротеин вируса Эбола

1.2.4.1. Структура и функция GP вируса Эбола

Вирус Эбола – вирус из семейства *Filoviridae*, который вызывает геморрагическую лихорадку Эболы с высокой летальностью. Вирус имеет продолговатую форму длиной до 1400 нм и шириной до 80 нм. Гликопротеин (GP) вируса Эбола (EBOV GP) является единственным

вирус специфическим белком на поверхности вириона, отвечающим за прикрепление к клеткам-хозяевам и последующее слияние вирусной и клеточной мембран. Очевидно, что данный белок является привлекательной мишенью для разработки вакцин, нейтрализующих антител и ингибиторов соединения и слияния мембран. GP представляет собой тример, состоящий из двух основных субъединиц GP₁ и GP₂, связанных между собой дисульфидным мостиком между C₁₅₃ и C₂₆₀₉ (рисунк 1–33А). Внешне тример по форме напоминает чашу с толстым покрытием из олигосахаридов (рисунк 1–33Б). Субъединица GP₁ отвечает за прикрепление к клетке, содержит области рецептор-связывающего сайта (а.о. 54–201) и сильно гликозилированный муциноподобный домен (а.о. 305–485) [147]. Муциноподобный домен напрямую не влияет на проникновение вируса в клетку, однако защищает а.о. рецептор-связывающего домена от иммунного распознавания [148]. Основание GP₁ образует «зажим», который стабилизирует метастабильную конформацию GP₂.

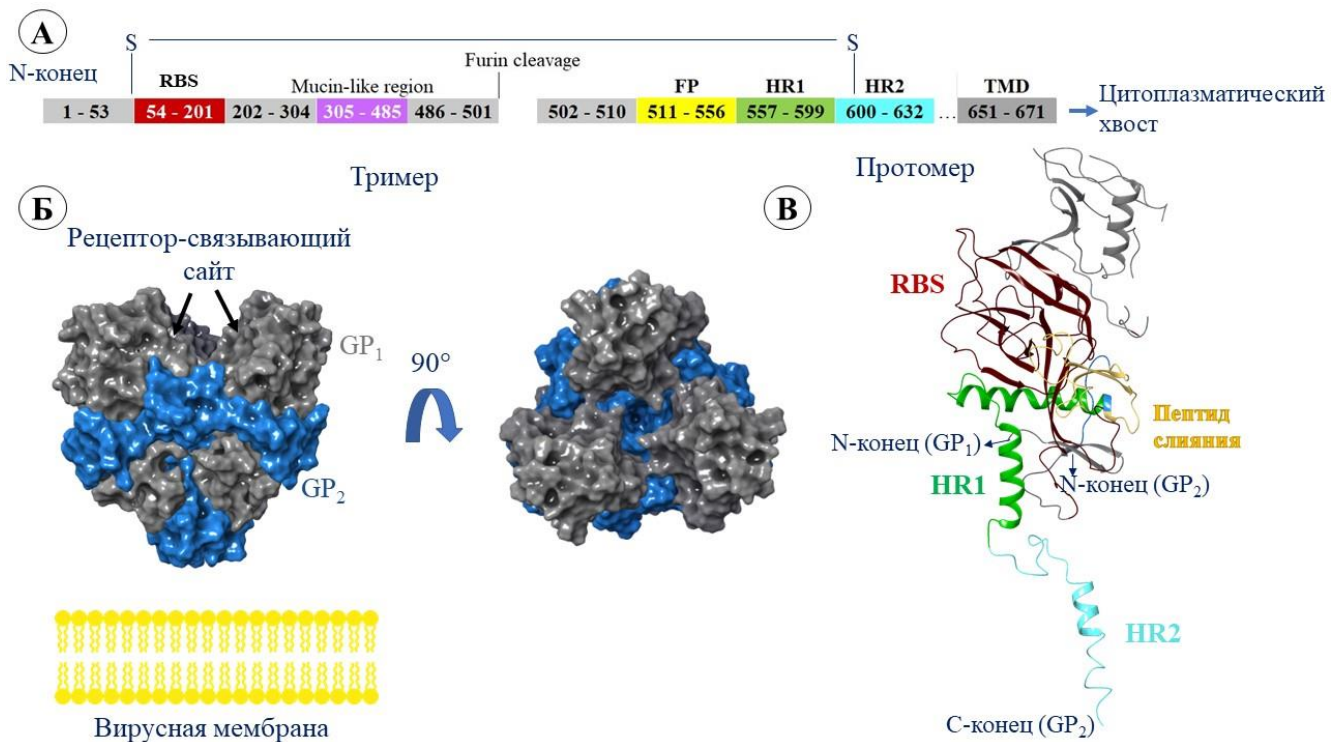


Рисунок 1-33 – Гликопротеин вируса Эбола: А – схематичное изображение а.о. GP EBOV. Б – тример GP EBOV, субъединицы GP₁ и GP₂ показаны серым и синими цветами, соответственно. В – вторичная структура протомера GP EBOV. Визуализация гликопротеинов выполнена на основании PDB кодов 6S8D [150] и 5JQ3 [151].

Субъединица GP₂ похожа на другие вирусные гликопротеины I класса, которые отвечают за механизм слияния мембран. GP₂ состоит из петли слияния (а.о. 511–556), расположенной близко к N-концу (рисунк 1–33В), за которым следует набор гептадных повторов, транс-мембранная области и цитоплазматический хвост [148,149]. Внутренняя петля слияния

содержит серию гидрофобных остатков (L₂₅₂₉, W₂₅₃₁, I₂₅₃₂, P₂₅₃₃, Y₂₅₃₄, F₂₅₃₅ и P₂₅₃₇). В состоянии префузионной конформации петля слияния оборачивается снаружи тримера GP [147].

Основная функция гликопротеина – это проникновение вируса в клетку, которое можно разделить на три этапа: прикрепление, эндоцитоз и слияние мембран. Прикрепление EBOV к клетке опосредуется GP₁, но к каким именно белкам происходит прикрепление вириона, остается не ясным. Очевидно, что на поверхности клетки имеется множество белков, выполняющих данную функцию, например, лектины, β_1 -интегрины или клеточные Fc-рецепторы [152]. Далее происходит поглощение с образованием эндосомы, в которой GP_{1,2} обрабатывается цистеиновыми протеазами в кислой среде. Протеолиз удаляет значительную часть GP₁ и запускает конформационные перестройки GP₂ [148,152], в результате которых неупорядоченные гептадные повторы перестраиваются в α -спирали (рисунк 1–34). Упорядоченный пучок α -спиралей проникает через клеточную мембрану и закрепляет пептид слияния в мембране-мишени. Ключевые а.о., среди которых P₂₅₃₇, запускают дестабилизацию бислоя, с образованием «шпильки» и последующим слиянием мембран. Блокирование различных этапов проникновения вируса в клетку снижает вероятность его распространения. Поэтому GP_{1,2} рассматривается в качестве биологической мишени для разработки моноклональных антител, пептидов, ингибирующих перегруппировку гептадных повторов, а также малых молекул, препятствующих слиянию мембран [152].

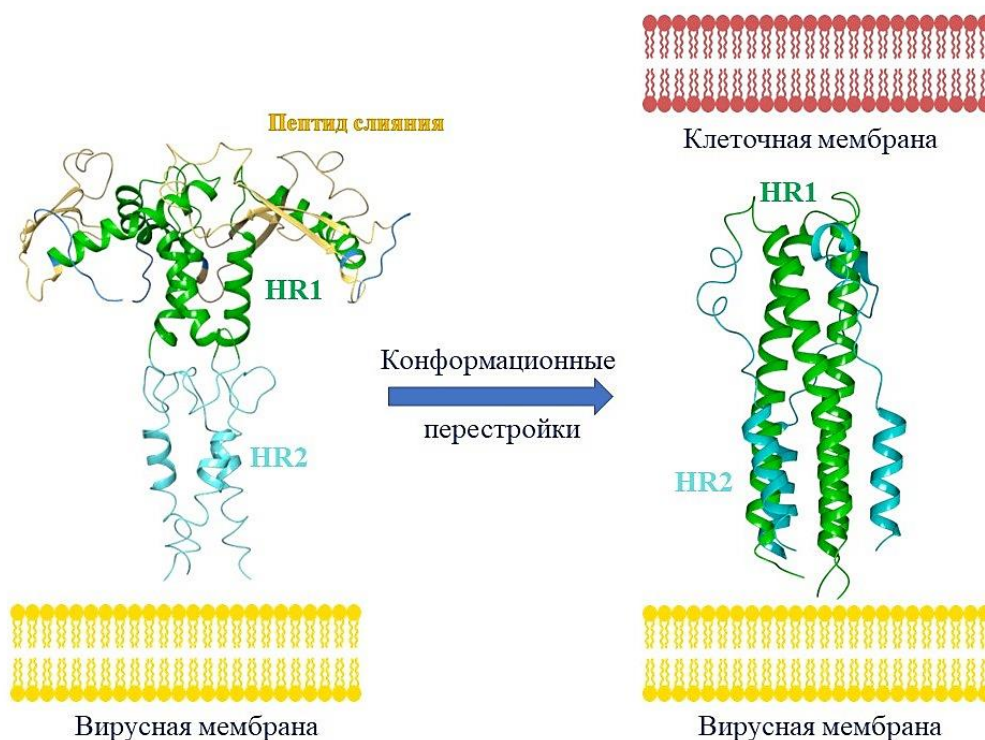


Рисунок 1-34 – Конформационные перестройки гептадных повторов EBOV GP₂. Визуализация построена на основании PDB кодов 5JQ3 [151] и 2EBO [153].

В рамках данной работы интерес представляют молекулы, нацеленные на предотвращение слияния путем взаимодействия именно с GP₂.

1.2.4.2. Сайт связывания малых молекул

В 2011 году авторы [154] провели высокопроизводительный скрининг ряда производных бензодиазепина с использованием псевдовиральной модели. Эксперименты по времени добавления показали, что соединения-лидеры **52** и **53** связываются с EBOV-GP на ранней стадии. Далее авторы использовали методологию идентификации предполагаемых полостей связывания, реализованную в плагине SiteMap [155,156] программного обеспечения Schrodinger Suite, для поиска потенциального места связывания. Авторы описали гидрофобный карман, расположенный на границе раздела GP₁ и GP₂ (рисунки 1–35А), пригодный для связывания малых молекул. Сайт связывания содержит а.о. пептида слияния и GP₁ (рисунки 1–35Б). Дальнейший мутационный анализ подтвердил, что а.о. N₂₆₉, L₂₇₀, L₂₁₈₄, I₂₁₈₅, L₂₁₈₆, K₂₁₉₀ и K₂₁₉₁ являются ключевыми при связывании противовирусных агентов **52** и **53**, расположение которых в гидрофобном кармане может ингибировать заражение клеток EBOV.

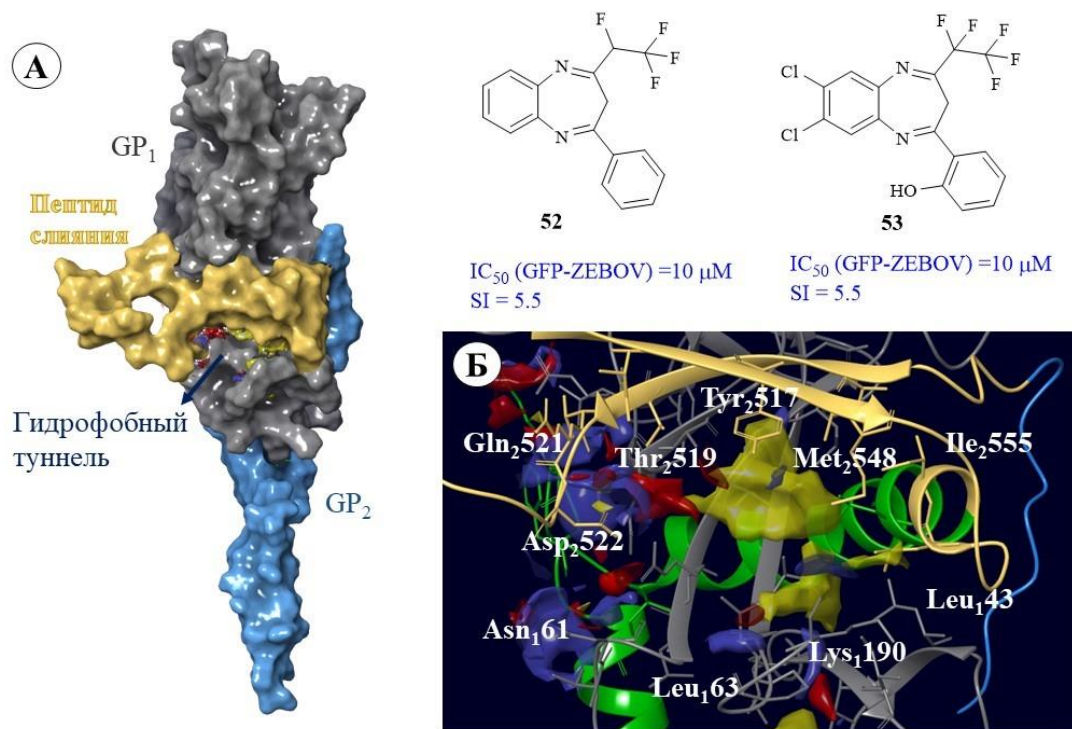


Рисунок 1-35 – Протомер GP_{1,2}: А – показан гидрофобный туннель связывания, расположенный на границе двух субъединиц GP-EBOV: поверхность GP₁ показана серым цветом, поверхность пептида слияния и оставшейся часть GP₂ – желтым и синим цветом, соответственно. Б – результат процедуры поиска сайта связывания, проведенный в условиях, описанных в [154]: желтым цветом показана гидрофобная полость сайт связывания, синим и красным – донорно-акцепторная полость, соответственно.

Дальнейшую историю поиска сайта связывания ингибиторов входа следует начать с упоминания публикации [157], в которой авторы протестировали около 2600 одобренных лекарственных препаратов в отношении их активности *in vitro* против вируса Эбола. Как и в большинстве случаев, авторы использовали псевдовиральные системы. На основании ряда масштабных биологических экспериментов, выраженная противовирусная активность была обнаружена у 80 одобренных препаратов, среди которых ряд соединений продемонстрировали ингибирующую активность в тестах *in vivo* с использованием животной модели на мышах. Соединения-лидеры (рисунок 1–36) относятся к различным клинко-фармакологическим группам. Противоопухолевое средство торемифен (54), нестероидный противовоспалительный препарат ибупрофен (55), антихолинергический препарат бензатропин (56) используемый для лечения болезни Паркинсона, блокатор кальциевых каналов бепридил (57), антидепрессанты пароксетин (58), сертралин (59), имипрамин (60) и клонипрамин (61), селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, и антипсихотический препарат «сбалансированного» спектра тиоридазин (62) рассматривались в качестве кандидатов для лечения болезни, вызванной вирусом Эбола. Полагалось, что эти соединения могут играть роль ингибитора входа [157,158] и напрямую взаимодействовать с гликопротеином вируса Эбола.

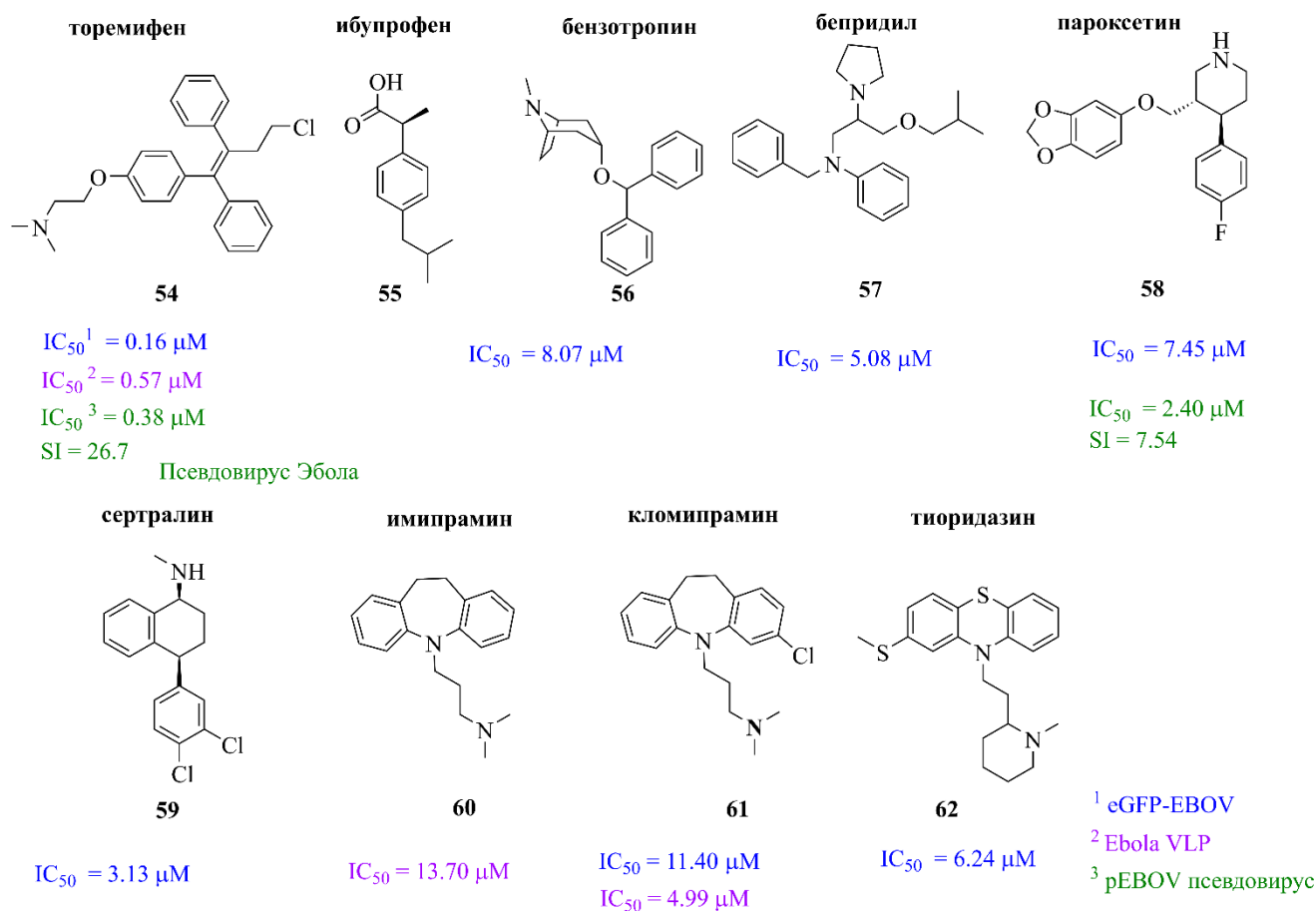


Рисунок 1-36 – Кандидаты в лекарственные препараты для лечения болезни, вызванной вирусом Эбола. Данные противовирусной активности взяты из работ [157–159].

В 2016 году в работе [151] были расшифрованы пространственные структуры комплексов протомера GP с торемифеном (**54**) и ибупрофеном, полученных методом РСА в разрешении до 2.7 Å [151] (PDB коды 5JQ7 и 5JQB). Это событие позволило более подробно описать вероятное место связывания ингибиторов входа. Сайт связывания малых молекул, расположен между N-концом GP₁ и петлей слияния GP₂ (рисунок 1–37А), ровно в том же месте, которое было предсказано в [154] на основании результатов молекулярного моделирования. Гидрофобная полость, привлекательная для расположения малых молекул, окружена остатками β-листов β1-β3, β6, β13 субъединицы GP₁ и α3-спирали гептадного повтора и β19-β20 листов пептида слияния. Гидрофобные а.о. [154] выстилают гидрофобный туннель сайта связывания. А.о. 192-195, соответствующие аминокислотные последовательности DFFS, «закрывают» вход в сайт связывания, тесно взаимодействуя с β-листами пептида слияния [151]. В дальнейшем место связывания ингибиторов слияния GP_{1,2} называется DFF lid [160]. Учитывая тот факт, что гликопротеин вируса Эбола представляет собой симметричную структуру тримера, описанный сайт связывания находится в каждом протомере.

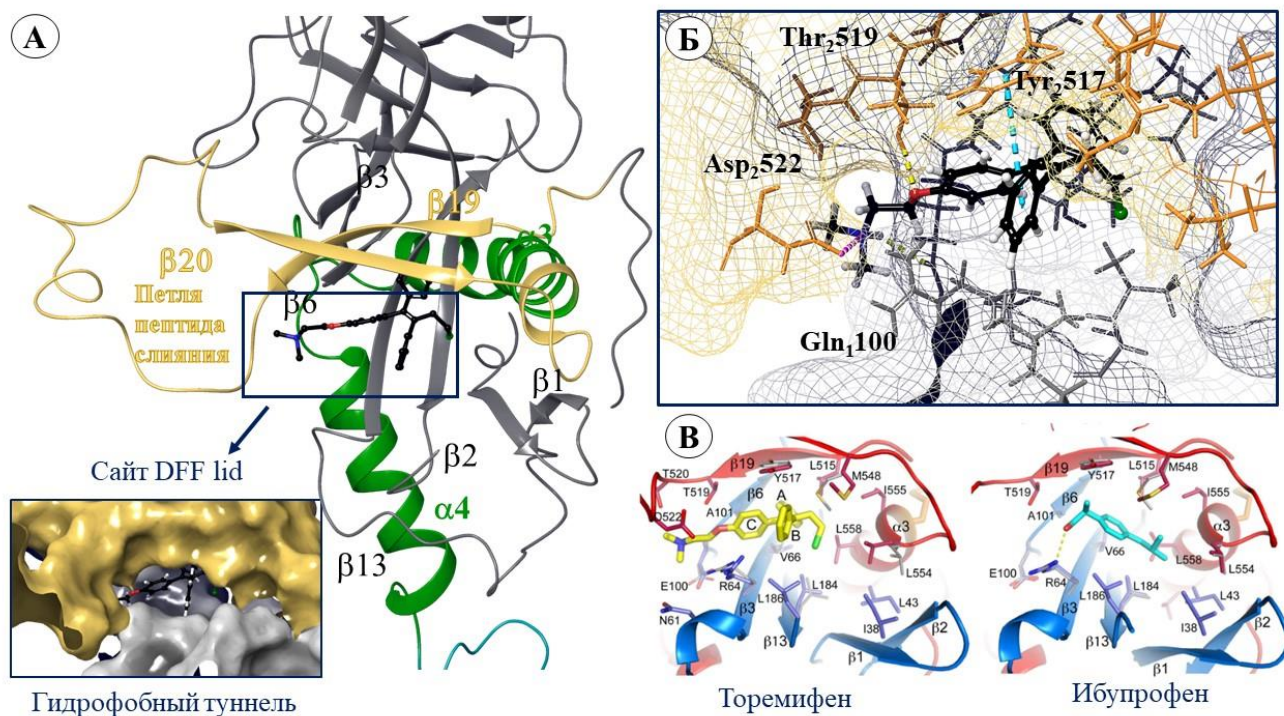


Рисунок 1-37 – Полость связывания ингибиторов в GP вируса Эбола: А – расположение сайта связывания в GP_{1,2}: гидрофобный туннель расположен между двумя субъединицами, поверхность GP₁ показана серым цветом, GP₂ – желтым, в сайте связывания расположена молекула торемифена (**54**). Б – показаны специфичные межмолекулярные взаимодействия между атомами **54** и а.о. сайта связывания: π-π стеклинг взаимодействие показано голубой прерывистой линией, водородный и солевой мостики – желтой и фиолетовой прерывистыми линиями, соответственно. В – расположение торемифена (**54**) и ибупрофена в сайте DFF lid: рисунок из оригинальной статьи [151].

Согласно работе [151] торемифен и ибупрофен связываются в области входа в гидрофобный туннель ([рисунк 1–37Б, В](#)), изменяя конформации боковых цепей а.о. D-F-F GP₁. Ароматические кольца соединения **54** образуют π - π стекинг-взаимодействие с Y₁₅₁₇, гидрофобная часть молекулы взаимодействует с набором гидрофобных а.о. GP₁ (V₁₆₆, L₁₆₈, A₁₁₀₁, L₁₁₈₄, L₁₁₈₆) и GP₂ (L₂₅₁₅, M₂₅₄₈, L₂₅₅₈). Протонированная аминогруппа окружена полярными и заряженными а.о. R₁₆₄, Q₁₁₀₀, T₂₅₁₉, T₂₅₂₀, D₂₅₂₂. Водородная связь и солевой мостик образуются между –NH⁺– группой лиганда и Q₁₁₀₀ и D₂₅₂₂ ([рисунк 1–37Б, В](#)). Небольшая молекула ибупрофена образует гидрофобный контакт с L₂₅₅₄, M₂₅₄₈ и водородный мостик с Arg₁₆₄ ([рисунк 1–37В](#)).

Ранее в работе [161] соавторы описали результаты процедуры разработки лекарства на основе структуры (или Structure-Based Drug Design [162]). Рассмотрели более 500 соединений, рекомендованных для лечения болезни, вызванной вирусом Эбола, среди которых ибупрофен. Используя собственноручно разработанные теоретические критерии отбора, авторы призывают к дальнейшему изучению ибупрофена и ибупрофен-подобных препаратов в качестве недорогих и малотоксичных кандидатов для профилактики и лечения вирусной инфекции. В качестве вероятного места связывания ибупрофена авторы рассматривают карман муциноподобного домена. В отличие поиска и предсказания сайта связывания, описанного в [154], теоретические исследования [161] не нашли экспериментального подтверждения. Кроме того, данные по противовирусной активности ибупрофена в литературе не представлены.

После публикации кристаллических структур комплексов протомер-торемифен и протомер-ибупрофен друг за другом выходят работы, в которых описаны кристаллические структуры соединений **56–59** [163] и **60–62** [160] в сайте связывания GP_{1,2} (PDB коды приведены в [приложении таблица 5–1](#)). Место связывания этих соединений то же, с теми же ключевыми а.о. Однако, согласно авторам, при связывании соединений **56–59** в сайте не наблюдается существенных структурных изменений в конформации боковых цепей а.о. Наблюдаемые взаимодействия белок-лиганд носят преимущественно гидрофобный характер. Кроме того, сообщается, что объем сайта связывания DFF lid составляет примерно 1000 Å³, в то время как объем исследуемых лигандов варьирует от самого малого 188 Å³ (ибупрофен) до наибольшего в 362 Å³ (торемифен). При этом в случае веществ **56** и **60** в гидрофобной полости располагаются по две молекулы лиганда, что увеличивает общий объем связывания до 763 Å³. В любом случае из рассматриваемых соединений торемифен остается лучшим ингибитором с точки зрения аффинности связывания и значения противовирусной активности [160,163].

Наличие пространственных структур комплексов лиганд-белок, определенных методами РСА, в значительной степени облегчает понимание механизма противовирусного действия

активных соединений. Так, в [164] наряду с биологическими экспериментами (скрининг с использованием псевдотипированных вирусов и эксперименты по времени добавления, продемонстрировавшими активность соединения на ранних стадиях вирусного цикла), приводятся результаты молекулярного докинга соединения-лидера **63** (рисунок 1–38) в сайт связывания DFF lid. В качестве базовых геометрических параметров протеина авторы использовали PDB код 5JQ7, соответствующий комплексу протомера CP_{1,2} с торемифеном (**54**). По совокупности полученных результатов был сделан достаточно очевидный вывод: механизм противовирусной активности противовирусного агента **63** связан с ингибированием гликопротеина GP-EBOV.

В работе [165] провели структурный *in silico* скрининг (более 2,5 млн.) соединений из базы данных традиционной китайской медицины в сайт связывания DFF lid. Корреляция результатов QM-докинга и экспериментально полученных значений IC₅₀ позволила авторам выбрать два соединения **64** и **65** (рисунок 1–38), для которых методами PCA были записаны геометрические параметры их комплексов с GP-EBOV (PDB коды 6HS4 и 6HRO, соответственно). Оба ингибитора связываются внутри одной и той же гидрофобной полости, контактируя с описанным выше набором а.о. Соединение **65** является лучшим из ингибиторов GP-EBOV, его эффективность превышает эффективность торемифена в 2 раза.

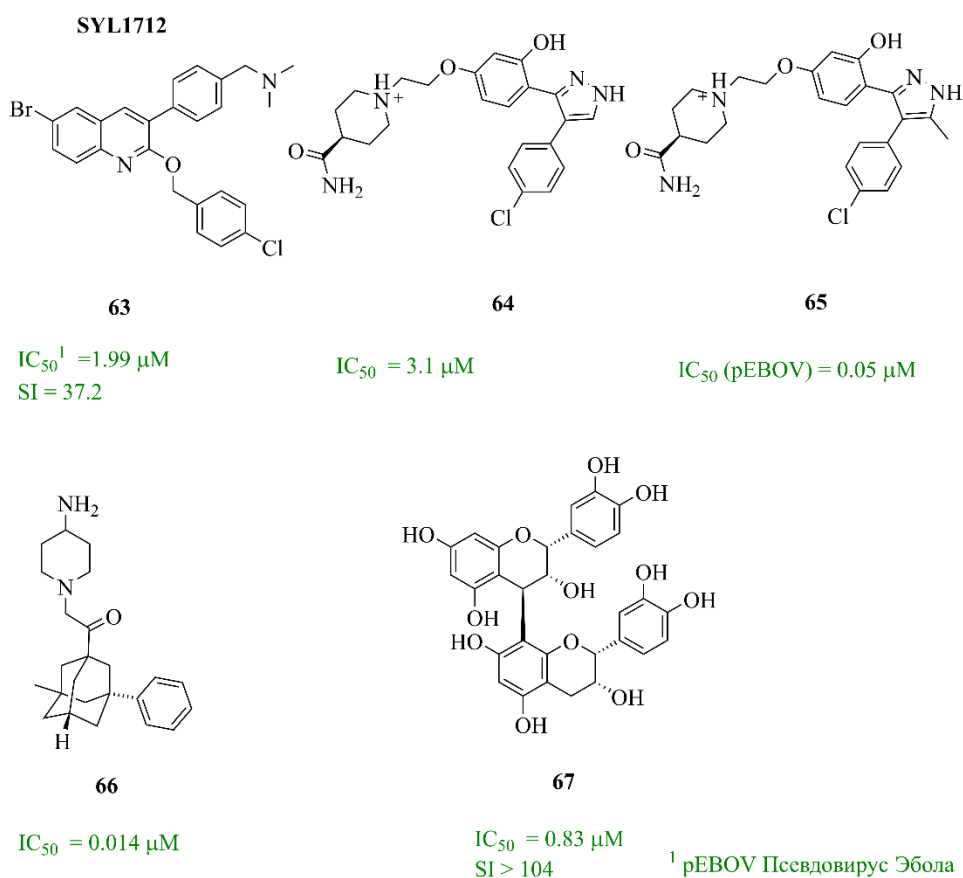


Рисунок 1-38 – Ингибиторы GP-EBOV.

И, наконец, необходимо упомянуть работу [166], в которой описан синтез и противовирусная активность адамантанового карбоксиамида **66**, для которой записаны геометрические параметры комплекса с GP (PDB код 6NAE). Гидрофобный фрагмент адамантана расположен в гидрофобной полости и окружен все теми же гидрофобными а.о. R₁64, V₁66, L₁184, L₂515, Y₂517 и L₂558.

Скрининг экстрактов лигнана, группы фенольных соединений растительного происхождения, на ингибирование активности псевдовируса Эбола позволил авторам выделить соединение **67**, процианидин B2, с индексом селективности более 100. Согласно результатам молекулярного моделирования, противовирусный агент **67** связывается в гидрофобном туннеле с образованием межмолекулярных взаимодействий с а.о. пептида слияния Y₂517, T₂519 и E₂544. Это достаточно свежая публикация [167], в которой для молекулярного моделирования все так же используются кристаллографические данные комплекса GP_{1,2} с торемифеном.

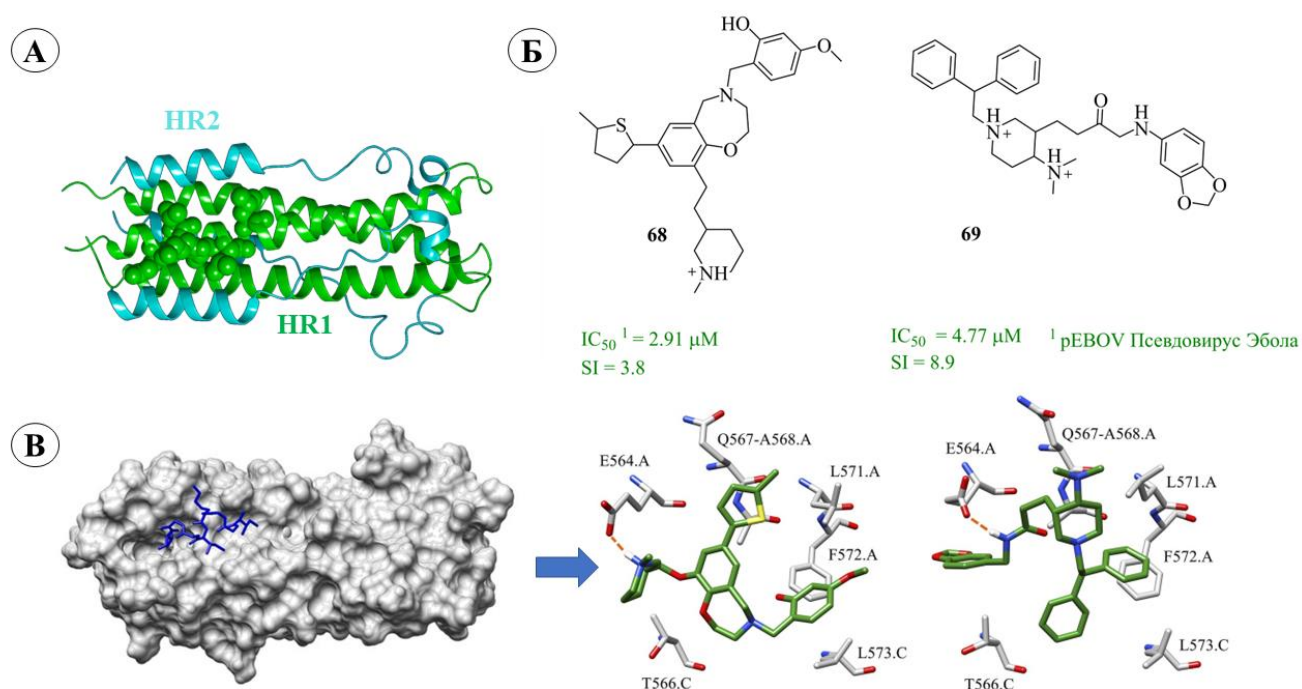


Рисунок 1-39 – Альтернативное место связывания ингибиторов GP₂: А – конформация пре-шпилька, визуализация построена на основании PDB кода 2EBO [153]. Показаны ван-дер-ваальсовы модели ключевых а.о. взаимодействующих с ингибиторами GP, Б – ингибиторы GP, связывающиеся с HR, В – оригинальные вклейки из статьи [168].

Начиная с 2011 года, основным местом связывания ингибиторов входа вируса Эбола рассматривается полость на границе двух субъединиц, насыщенная гидрофобными а.о. пептида слияния. Однако, в 2019 году выходит публикация [168], в которой авторы рассматривают в этом качестве область гептадных повторов (HR) в конформации пре-шпилька (рисунок 1–39А). Широкомасштабный виртуальный скрининг 1,7 млн малых молекул в карман связывания GP₂

позволил авторам определить ряд активных молекул, среди которых соединения **68** и **69** (рисунок 1–39Б, В) стабилизируют метастабильное состояние пре-шпильки GP₂ и предотвращают дальнейшие конформационные перестройки, приводящие к слиянию вирусной и клеточной мембран.

Основные выводы публикации [168] сделаны на основании молекулярного моделирования в совокупности с оценкой противовирусной активности соединений лидеров в тестах с псевдовирусной системой. В публикации отсутствуют результаты экспериментов по времени добавления и оценка влияния мутаций в ключевых сайтах белка, что вызывает некоторые сомнения в выводах. Тем не менее, в работе [169] высказывается гипотеза, что ряд известных малых ингибиторов GP_{1,2} дополнительно могут связываться в области HR2 (рисунок 1–39).

1.3. Другие мембранные белки

1.3.1. Протонный M2 канал вируса гриппа

1.3.1.1. Строение и функция протонного M2 канала

Протонный M2 канал относят к виропоринам – небольшим трансмембранным белкам, содержащим от 60 до 120 а.о. Виропорины встречаются в разных вирусах, в том числе у коронавируса (белки 3а, Е и 8а [170]), респираторно-синцитиального вируса (SH-протеин) [171], ВИЧ (Vpr-белок) [172] и, конечно, вируса гриппа типов А-D (M2) [173]. M2 белки участвуют в нескольких этапах репликации вируса, таких как проникновение, репликация генома, морфогенез и высвобождение из инфицированной клетки [170,174]. На сегодняшний день трансмембранный белок M2 вируса гриппа (M2 IAV) является наиболее изученным виропорином с точки зрения строения, механизма активации и блокирования канала низкомолекулярными соединениями [173,175].

M2 канал экспрессирован в мембране вириона (рисунок 1–40А). Активация канала происходит внутри эндосомы при пониженных значениях pH среды [176] и облегчает направленный поток протонов [175] из эндосом клетки-хозяина, чтобы подкислить внутреннюю часть вириона. Кислая среда эндосомы активирует конформационные перестройки в НА и диссоциацию рибонуклеинпротеина (RNP) из M1 белка, способствуя тем самым слиянию вирусной и клеточной мембран [174]. Активность M2 также играет решающее значение во время созревания вируса в уравнивании значения pH среды транс-мембраны Гольджи для предотвращения преждевременных конформационных перестроек НА [173].

M2 белок, длиной 97 а.о., состоит из четырех протомеров. Трансмембранные спирали образуют канал, в котором ключевую роль играет гистидин в положении 37, контролирующий

активацию [175,177]. Каждая субъединица имеет неструктурированный N-конец на поверхности вириона (а.о. 1–22), трансмембранную часть (а.о. 23–46), короткую гибкую петлю (а.о. 47–50) и С-конец (а.о. 51–59) обращенный внутрь вириона ([рисунок 1–40Б](#)). Трансмембранные спирали собраны в пучок из четырех спиралей закрученных влево на 23° , образуя хорошо выраженную пору. Кольцо из метильных групп V27 сужают конец поры до $\sim 3.1\text{\AA}$, а индольные кольца W41 находятся на ван-дер-ваальсовом расстоянии друг от друга, препятствуя прохождению воды или ионов [177]. В трансмембранной части канала имеется высоко консервативный мотив HxxxW, где H37 отвечает за протонную селективность и активацию, а W41 обеспечивает проводимость протонов от N-конца к С-концу. Другие а.о., окружающие этот мотив, вносят вклад в динамику и равновесный перенос протонов в канале [173]. Протоны являются предпочтительным субстратом M2 канала, однако в работах [174,178,179] сообщается, что протонный канал может также пропускать катионы калия и натрия.

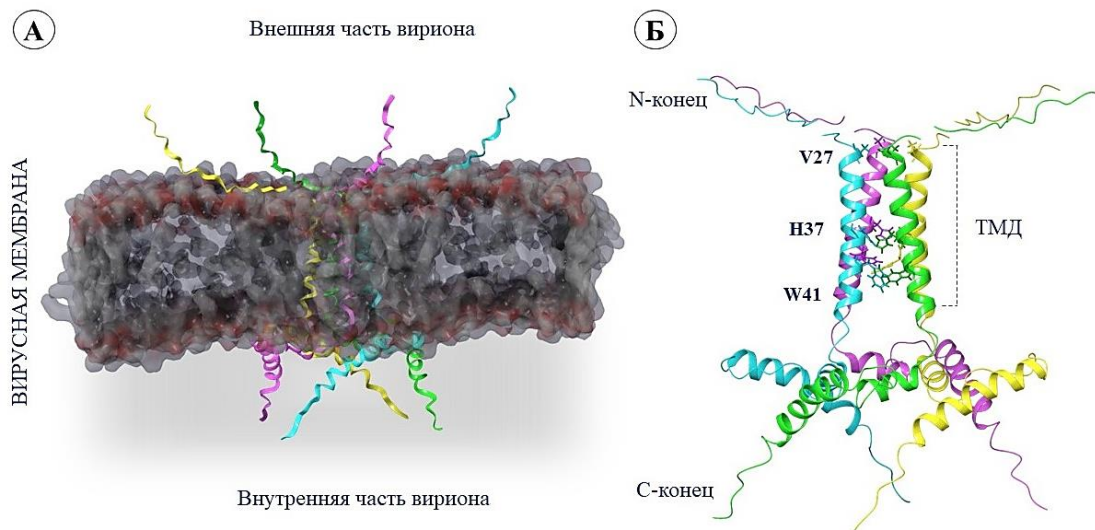


Рисунок 1-40 – Протонный M2 канал (виropорин) вируса гриппа IAV: А – M2 канал, встроенный в вирусную мембрану; Б – третичная структура полноразмерного протонного канала.

Согласно данным, опубликованным в работах [173,177,180,181], при значениях pH среды до 7 до 8 единиц M2 канал находится в закрытом состоянии ([рисунок 1–41](#)). А.о. консервативного мотива плотно упакованы, наблюдается образование π - π стекинг-взаимодействий между ароматическими кольцами соседних гистидинов и/или триптофанов. Снижение pH среды приводит к протонированию имидазольных колец H37, и как следствие дестабилизирует упаковку α -спиралей за счет электростатического отталкивания.

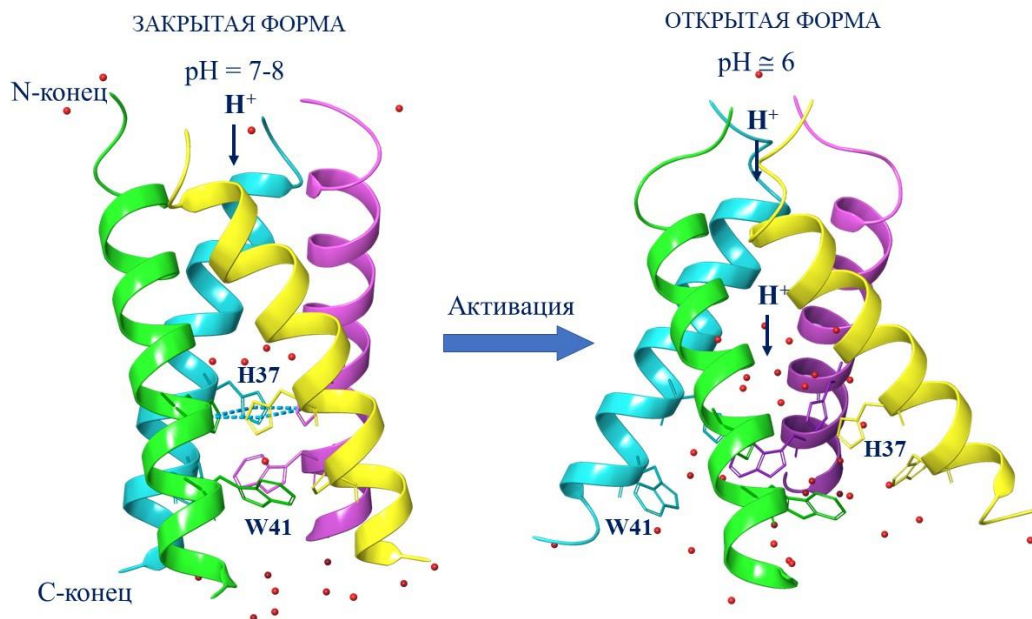


Рисунок 1-41 – Механизм активации M2 протонного канала.

Конформационная перегруппировка H37 приводит к нарушению межмолекулярных взаимодействий между W41 и к открытию канала. С-концевые спирали становятся более гидратированными, что снижает барьер депротонирования H37 и увеличивает протонную проводимость. При дальнейшем снижении значений pH среды канал расширяется и увеличивает подвижность молекул воды в канале. Таким образом протонный M2 канал представляет собой весьма привлекательную биологическую мишень для поиска новых противовирусных препаратов, ингибирующая активность которых может быть связана с закупориванием канала и снижению ее ионной проводимости.

1.3.1.2. Ингибиторы M2 канала

Амантадин считается первым ингибитором протонного M2 канала [182]. Производное адамантана – римантадин был одобрен к применению в 1994 [174]. Однако в XXI веке амантадин (70) и римантадин (71) показали свою неэффективность против различных штаммов ряда вируса гриппа, включая A/H1N1 и A/H3N2 [183]. Тем не менее адамантановый фрагмент присутствует в ряде новых (72-74), более эффективных ингибиторов M2 канала [174,184–187]. На [рисунке 1–42](#) представлены ряд структур, для которых в некоммерческой базе данных Protein Data Bank представлены кристаллографические данные лиганд-белкового комплекса (см [приложение. таблица 5–2](#)).

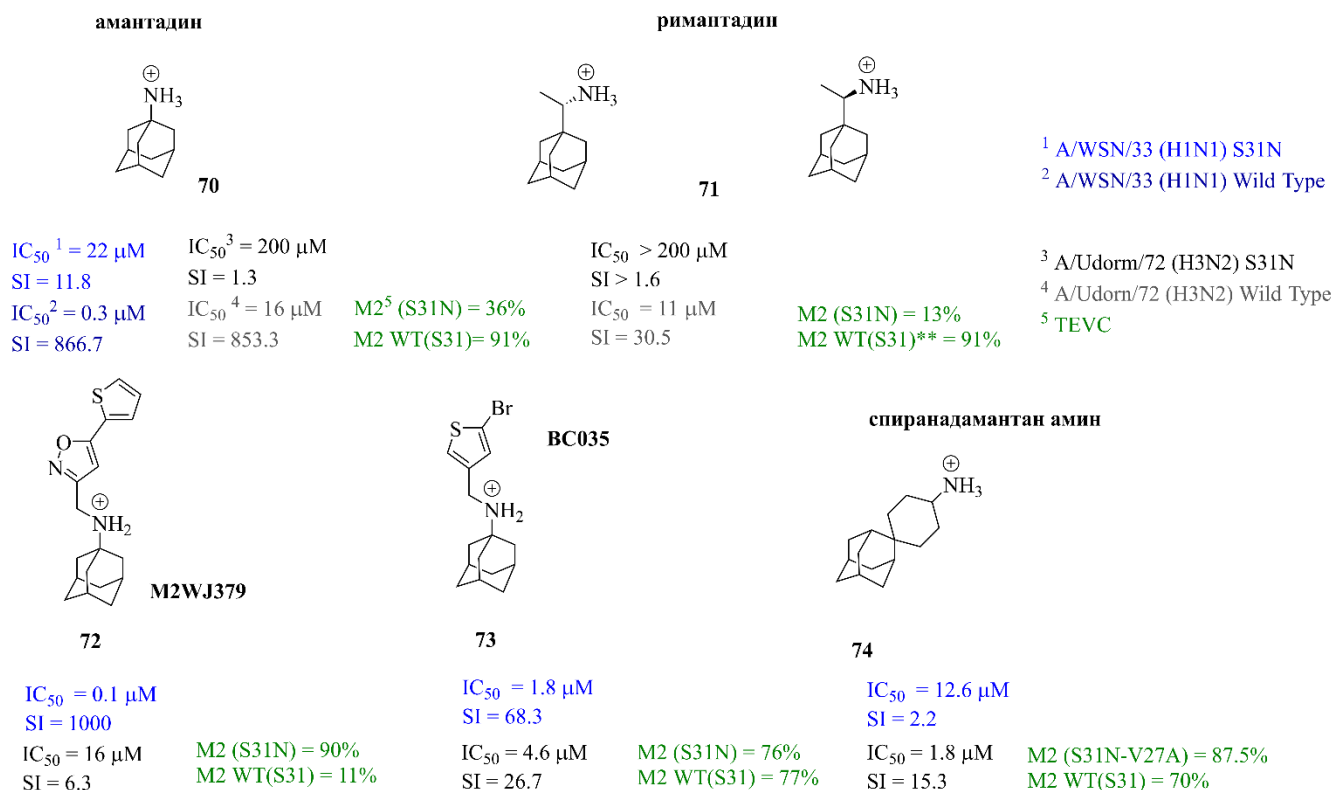
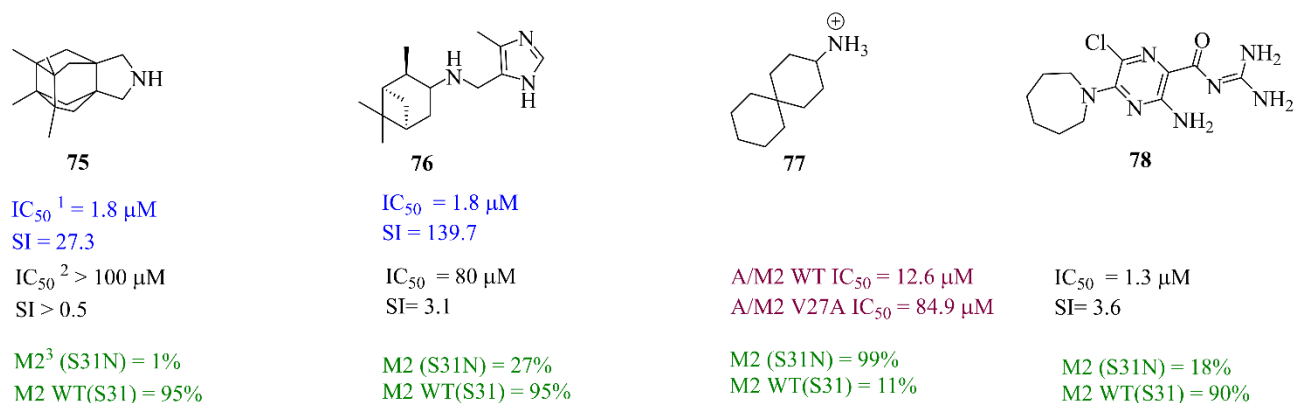


Рисунок 1-42 – Адамантановые ингибиторы M2 канала.

Кроме того в научной литературе описываются малые молекулы, не содержащие в своей структуре адамантановый фрагмент, такие как полициклический амин **75** [188], производное пинанамина **76** [189], спиранимин **77** [190], гексаметиленамилорид **78** [176] и другие [174] (рисунок 1–43). Все структуры объединяет наличие жесткого гидрофобного фрагмента.



¹ A/PR/8/34 (H1N1) = 1.8 μM ² A/HK/7/87 (H3N2) ³ TEVC

Рисунок 1-43 – Ингибиторы M2 канала.

В 2008 году в работе [181] описан способ связывания амантадина внутри трансмембранного домена M2 канала. Кристаллографическая структура лиганд-белкового комплекса соответствует расположению адамантана в открытой форме канала при pH = 5.3.

Амантадин связывается в гидрофобном кармане ближе к N-концу. Жесткий адамантановый гидрофобный каркас молекулы взаимодействует с неполярными боковыми цепями а.о. V27, A30, S31 и A34 (рисунок 1–44А). Основной механизм ингибирующего действия противовирусного агента **70** заключается в закупоривании поры и, как следствие, препятствовании транспорту протонов. Авторы публикации [181], также объясняют устойчивость канала к ингибированию амантадином за счет уменьшения гидрофобного кармана при мутации S31N, которая приводит к снижению аффинности молекулы к сайту связывания. Этот факт объясняет понижение ингибирующей активности амантадина (**70**) по отношению к М2 каналу. Действительно, большинство распространенных штаммов вируса гриппа А несут мутацию S31N, встречающуюся в 95% случаев. Около 1% штаммов несут мутацию V27A, около 0.2% штаммов несут еще более редкие мутации, такие как L26F, A30T, G34E и L38F. Подробно об этом описано в обзорах [173,191].

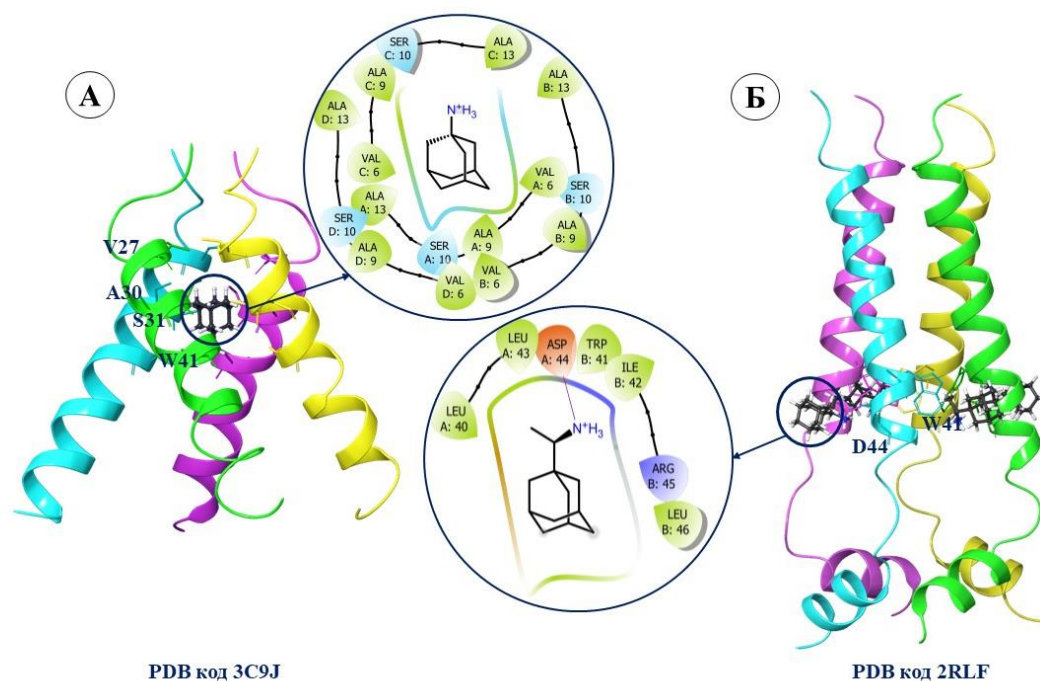


Рисунок 1-44 – Сайты связывания производных амантадина: А – сайт связывания, расположенный внутри трансмембранного домена (нумерация а.о. в вставках соответствует PDB коду 3C9J [181], Б – альтернативный сайт связывания, расположенный вне поры.

Аллостерический механизм ингибирования М2 канала производными адамантана, в частности римантадином, описан в работе [177]. Авторы предполагают, что римантадин связывается вне М2 поры ближе к С-концу канала за счет межмолекулярного взаимодействия с D44 (рисунок 1–44Б). Четыре молекулы римантадина (**71**) стабилизируют инактивированное состояние М2 канала при рН = 7.5 и предотвращают его протон-зависимое открытие. В работе [192] указано, что небольшую полость, обращенную к липидам, рядом с W41 можно

рассматривать в качестве альтернативного сайта связывания. Однако сайт может существовать лишь тогда, когда пучок из четырех α -спиралей ТМД плотно собран в конформацию закрытого канала. Это объясняет более низкое сродство противовирусных агентов **71** и **72** к открытому каналу. Однако здесь не совсем понятна резистентность к соединениям в мутантных S31N штаммах. Мутация S31N ослабляет упаковку спиралей ТМД, и, очевидно, влияет на размер и фармакофорный профиль сайта связывания, расположенного внутри поры. Что касается, внешнего сайта связывания, то авторы [192] также объясняют причину резистентности за счет более слабой сборки канала, которая наблюдается в мутантных вариантах S31N и V27A. Вопрос о месте связывания амантадина и римантадина неоднократно поднимался в научных публикациях, где авторы использовали как экспериментальные, так и расчетные данные. Подробнее об этом можно узнать в обзоре [174]. Следует отметить ряд последних публикаций, в которых Томастон и соавторы [193,194] опубликовали ряд рентгеновских кристаллических структур высокого разрешения трансмембранного домена М2 канала с амантадином (**70**), римантадином (**71**) и спироадаматиламином (**74**). Соединения связываются внутри ТМД с образованием ряда межмолекулярных взаимодействий с окружающими а.о., что приводит к закупориванию поры. Таким образом, в качестве наиболее вероятного места связывания производных адамантана **70–74** необходимо рассматривать внутриканальный сайт связывания. Учитывая наличие жесткого каркаса у соединений **75–78** разумно предположить, что их вероятное место связывания также расположено именно внутри поры М2 канала, аналогично противовирусным агентам амантадину и римантадину. Подобное связывание предполагают авторы работ [176,189,190] для соединений **76–78** (рисунк 1–43). А в публикации [188] приводятся результаты молекулярно-динамических симуляций, описывающих поведение полициклического амина **75** внутри поры М2.

Протонный канал М2 представляет собой небольшую атомно-молекулярную систему. Поэтому в научной литературе встречается множество работ, посвященных молекулярно-динамическим симуляциям канала в присутствии амантадина и римантадина. Теоретические исследования сосредоточены на описании способа входа молекулы в канал и месте связывания. Так, одной из первых работ, описывающих механизм ингибирующего действия амантадина на основании результатов молекулярной динамики, является работа [195]. Согласно авторам протонированная аминокислота **70** создает положительный электростатический потенциал в просвете канала, что приводит к электростатическому отталкиванию протонов. Мутация S31N закупоривает место связывания, стерически затрудняя связывание агента. Более подробно этот механизм изучен и описан в работе [175], где авторы используют методологию многомасштабной реактивной молекулярной динамики. Свободная энергия транспорта протонов через канал дикого и мутантного D44N типов оценивалась в работе [196]. Подобное

подробное изучение механизма функционирования канала, деталей механизмов переноса протонов, а также понимание влияния малых молекул на пору может быть использовано и в других схожих системах, в частности в виropopинах SARS-CoV-2.

1.3.2. Высококонсервативный мембранный белок ортопоксвирусов p37

1.3.2.1 Структура и биологическая функция p37

Ортопоксвирусы составляют семейство вирусов оспы с самыми крупными ДНК, среди которых наиболее известным и опасным патогеном считается вирус натуральной оспы (VAR), вызывающий болезнь с тяжелым течением и летальностью более 30%. На основании результатов мировой вакцинации с 1967 по 1979 год, в 1980 году ВОЗ объявила об элиминации оспы. И хотя вирус натуральной оспы уже не циркулирует среди людей и хранится только в двух лабораториях в мире, остается некоторая опасность биотерроризма [197]. Близкий родственник вируса натуральной оспы, оспа обезьян (MPXV), вызывает заболевание с летальностью до 10% и считается наиболее опасной ортопоксвирусной инфекцией человека в эпоху после ликвидации вируса натуральной оспы [198]. 23 июля 2022 года глава Всемирной организации здравоохранения объявил вспышку оспы обезьян чрезвычайной ситуацией международного масштаба.

Заражение клетки-мишени начинается с адсорбции вируса, слияния вирусной и клеточной мембран и проникновения ДНК в цитоплазму зараженной клетки, где происходит транскрипция и репликация вирусного генома. Вирус осповакцины (*vaccinia virus VV*) является основным прототипом *Orthopoxviridae*, реплицируется в цитоплазме клетки и продуцирует четыре типа вирионов из каждой инфицируемой клетки: внутриклеточный зрелый вирус (IMV), внутриклеточный оболочечный вирус (IEV), ассоциируемый с клеткой оболочечный вирус (CEV) и внеклеточный оболочечный вирус (EEV). Здесь необходимо отметить, что другие ортопоксвирусы включают, не только VAR, MPV, VV, но и вирус экстремелии (ECT), вирус оспы верблюдов (CMPV), вирус оспы енотов и татеропоксвирус. Все эти вирусы морфологически неразличимы и антигенно родственны [199].

Частицы внутриклеточного зрелого вируса (IMV) образуются внутри цитоплазматических вирусных фабрик из, так называемых, неинфекционных предшественников. IMV представляет собой часть вирусного потомства, большинство из которых остается в клетке до ее лизиса. Меньшая часть IMV покидает вирусную фабрику по микротрубочкам и покрывается двойным слоем внутриклеточной мембраны с образованием внутриклеточного оболочечного вируса (IEV). Далее IEV перемещаются на клеточную поверхность с последующим слиянием вирусной и клеточной мембран, обнажая оболочку вириона на клеточной поверхности или, другими словами, образуя клеточно-ассоциированный

вирус (CEV). Высвобождение последнего приводит к образованию внеклеточного оболочечного вируса (EEV) [199]. Образование оболочки IMV происходит благодаря активности p37, высококонсервативного белка периферической мембраны, кодируемого геном F13L [200]. Белок состоит из 372 а.о., массой 41.8 кДа, экспрессируется на поздних стадиях инфекции и направлен на мембраны, происходящие из аппарата Гольджи, где белок включается в вирион в процессе оборачивания IMV. Белок p37 присутствует в оболочечных формах вируса, но отсутствует в IMV. Мембранный белок выстилает внутреннюю поверхность оболочки EEV. Два остатка цистеина в положениях 185 и 186 пальмитилированы ([рисунок 1–45А](#)), что является ключевым моментом для правильного внутриклеточного нацеливания и функционирования белка [201].

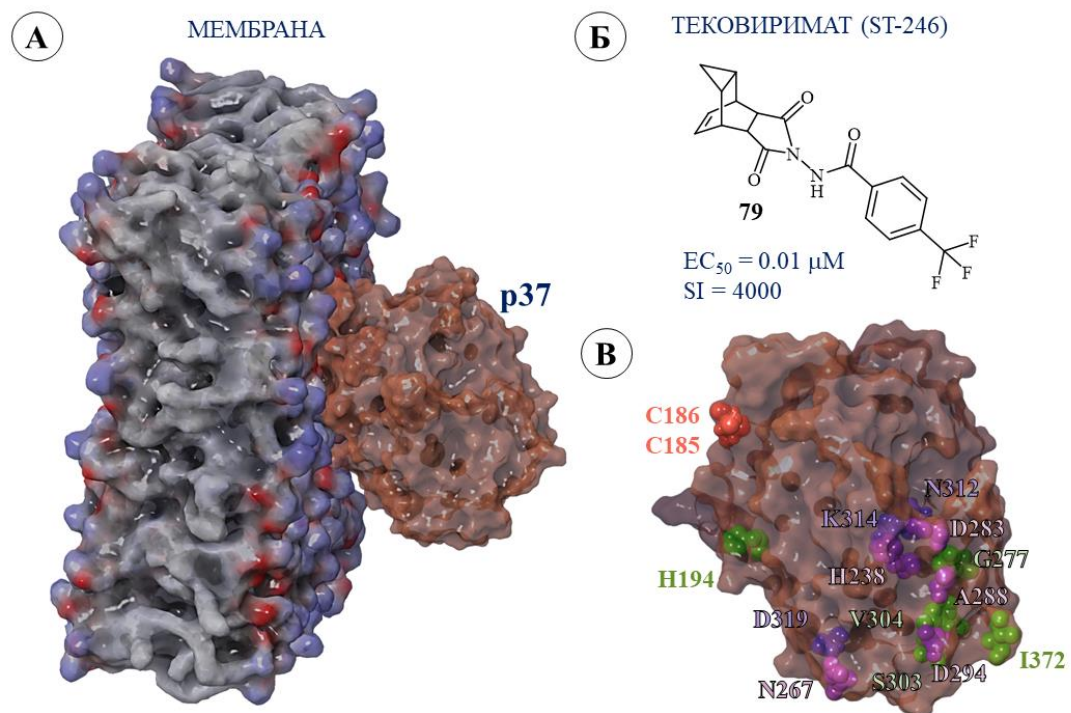


Рисунок 1-45 – Визуализация мембранного белка p37 ортопоксвируса: А – белок p37, погруженный в клеточную мембрану; Б – тековиримат (ST-246) – ингибитор белка p37 [202]; В – ключевые а.о.: оранжевым цветом выделены C185 и C186 пальмитилированные аминокислоты; а.о. фрагмента фосфолипазного мотива N312-K314----D319 показаны фиолетовым цветом; зеленым цветом окрашены а.о. связанные с противовирусной активностью (H194, G277, S303, V304, I372) тековиримата; розовым цветом показаны а.о. одиночных аминокислотных замен в p37, обнаруженных при секвенировании резистентного к противовирусному агенту 79 штамма VV (H238, N267, D283, A288 и D294).

Последовательность p37 содержит фрагмент мотива HxKxxxxD (H – гистидин, K – лизин, D – аспарагиновая кислота, а х – любая аминокислота), характерный для фосфолипаз [203] и состоящий из аспарагина (N вместо H), лизина и аспарагиновой кислоты. Белок проявляет фосфолипазную активность [199,200,203]. Согласно [204], мутагенез цистеиновых остатков

и/или аминокислот в мотиве N_xKxxxxD изменяет внутриклеточное распределение белка и ингибирует процесс образования оболочки IMV.

1.3.2.2. Ингибиторы p37

В настоящее время тековиримат, или **ST-246 (79)**, является одним из наиболее эффективных препаратов против ряда ортопоксвирусов, включая вирус коровьей оспы (CPXV), осповакцины (VV), вирусов MPXV, CMPV, ECT и VAR. Низкомолекулярное соединение **79 (рисунок 1-45Б)** молекулярной массой 376 Да было найдено в результате процедуры высокопроизводительного скрининга 356 240 соединений. Тековиримат подавляет репликацию вируса в концентрациях EC₅₀ = 0.01 μM с индексом селективности, равным 4000 единиц [202]. Пероральное введение препарата **79** мышам в тестах *in vivo* позволило грызунам избежать летальной инфекции при заражении CPXV и впоследствии приобрести стойкий иммунитет к вирусной инфекции. Генетическое картирование резистентных к **ST-246** мутантных вирусов позволило определить аминокислотную замену в гене V061 CPXV. Ген V061 гомологичен гену F13L осповакцины VV. Ген кодирует белок p37, необходимый для образования внеклеточной формы вируса [202,205]. Другими словами, противовирусная активность агента **79** связана с ингибированием p37 и, как следствие, предотвращением обёртывания вириона IMV, что резко снижает распространение вируса в тканях. И, хотя взаимодействие белка p37 с тековириматом не вызывает сомнения, место его связывания остается до сих пор спорным вопросом.

В 2015 году авторы работы [206] получили рекомбинантные вирусы VV с мутацией гена F13L. Секвенирование позволило определить значимые аминокислотные замены в p37 и оценить их влияние на противовирусную активность тековиримата. Ингибирующая активность препарата **79** снижается при наличии мутации G277C в p37 (EC₅₀ = 0.29 μM) и резко падает в случае двойных мутаций G277C + I372N (EC₅₀ > 53 μM) и F25V + I372N (EC₅₀ > 40 μM). Молекулярное моделирование позволило картировать а.о. белка p37, которые могут быть связаны с противовирусной активностью соединения **79**, а именно F25, H194, G277, D283, S303, V304, K305 (**рисунок 1-45В**). Кроме того, авторы идентифицировали ряд аминокислотных замен в p37, которые ответственны за проявление резистентности к **ST-246**: H238Q, N267D, D283G, A288P и D294V.

Сайт связывания лиганда тековиримата (**79**) в белке p37, согласно авторам [206] образован остатками G277, W279, D280, A288, A289, A290, L302, S303, V304, K305, V306 и F307 (**рисунок 1-46А**). Три атома фтора располагаются в небольшом кармане и окружены A288-A290, A290-V304 и V304-W279, а бензамидный фрагмент расположен между W279 и V304. Мотив фосфолипазы H(N)KD локализован на противоположной стороне сайта. С другой стороны, авторы работы [207], основываясь на результатах молекулярной динамики, считают, что сайт

связывания агента **79** содержит в себе а.о. фрагмента фосфолипазного домена N312 и L314, а также F52, L118, C120, S135 и N329 ([рисунок 1–46Б](#)). Здесь необходимо отметить, что вторичная и третичная структуры р37 до сих пор не исследованы. Все теоретические расчёты для данного белка начинаются с создания предполагаемой трехмерной модели. Так, в работе [206] авторы построили модель р37 на основании опубликованной ранее структуры фосфолипазы D [208], имеющей 77 идентичных и 115 сходных остатков (PDB код 1VOW). Поиск сайта связывания тековиримата проводился на основании картирования мутантных а.о.

В 2021 году авторы [207] использовали веб-сервис I-TASSER для моделирования третичной структуры белка. Далее авторы погрузили C185-186 в мембрану POPC (фосфатидилхолин), заполнили молекулами воды (модель TIP3P) и раствором KCl в концентрации 0.15M. Общее время молекулярно-динамических симуляций составило 40 нс. Место связывания определили на основании результатов «слепого» докинга тековиримата. Геометрические параметры лиганд-белкового комплекса в дальнейшем использовались для еще одного этапа молекулярно-динамических симуляций в течение 80 нс. Место связывания агента **79**, определенное на основании теоретических исследований [207], отличается от позиции лиганда в белке, описанного в работе [206].

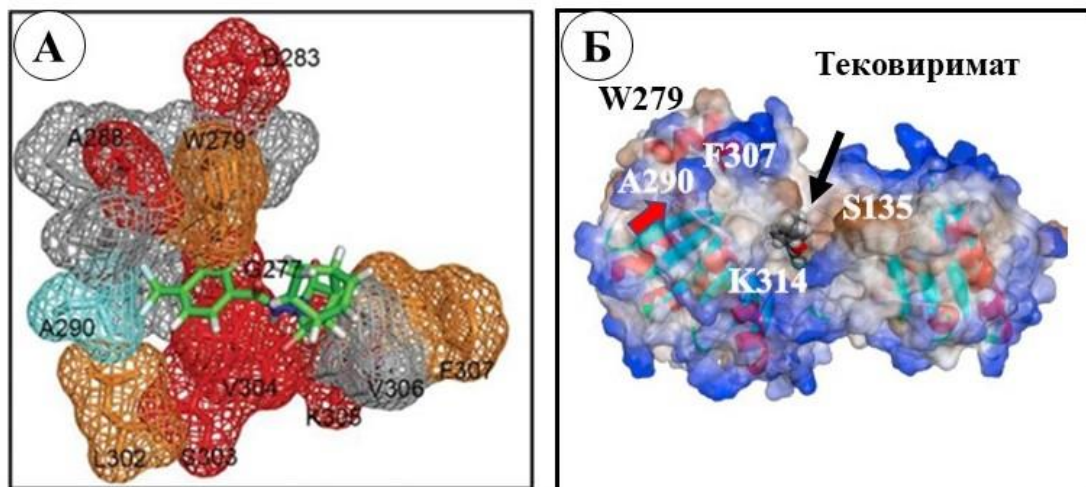


Рисунок 1-46 – Места связывания тековиримата (**79**) в белке р37, рисунки из оригинальных статей: А – сайт связывания, определенный на основании мутагенеза [206]; Б – сайт связывания, определенный в результате молекулярного моделирования [207]: красной стрелкой показано расположение сайта связывания лиганда, описанного в [206].

Анализ научной литературы позволяет сделать ряд важных выводов: противовирусная активность тековиримата или **ST-246 (79)** связана с ингибированием высококонсервативного мембранного белка р37, основная функция которого заключается в участии в процессе выпуска вирусных частиц из зараженных клеток. Белок способствует образованию внеклеточных вирусных частиц, путем связывания с молекулами липидов в мембране клетки-

хозяина. Ключевыми а.о. белка являются цистеины 185 и 186, погруженные в мембрану, а также аминокислоты фрагмента фосфолипазного домена N(H)KD. Мутагенез данных аминокислот оказывает значительное влияние на функционирование белка, ингибируя процесс образования оболочки IMV. Биологическая мишень действия тековиримата не вызывает сомнения, однако место его связывания в белке остается спорным. На данный момент рассматриваются два вероятных сайта связывания, определенных на основании картирования белка p37, соответствующего тековиримат-резистентному штамму ортопоксвируса и молекулярного моделирования, в совокупности с данными о фосфолипазной активности белка. Оба решения кажутся достоверными.

Соединения, содержащие адамантановый фрагмент, проявляют широкий спектр биологической активности, в том числе и противовирусной [209]. Например, в работе [210] описываются производные адамантана, проявляющие противовирусную активность в отношении ВИЧ, вируса герпеса, цитомегаловируса, вируса везикулярного стоматита, и вируса корьей оспы (VV). В исследованиях [211] описываются производные адамантана, среди которых соединение **80** активно против VV в наномолярных концентрациях. В обзоре [212] приводится достаточно большой ряд соединений, содержащих адамантановый фрагмент, активных как против вируса корьей оспы, так и против других ортопоксвирусов (рисунк 1–47).

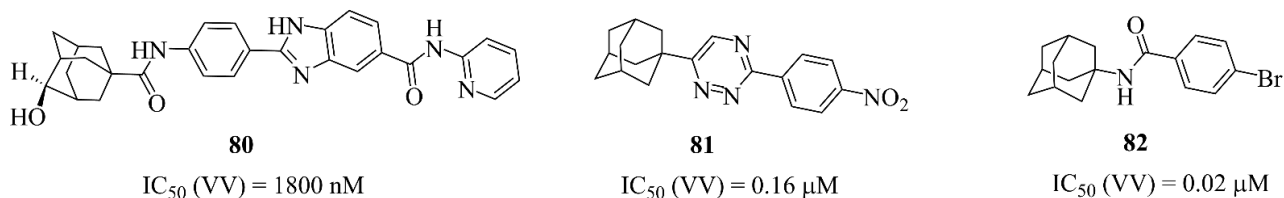


Рисунок 1-47 – Производные адамантана, проявляющие активность против ортопоксвирусов. Большее количество соединений описаны в обзоре [212].

Впервые предположение от том, что ингибирующая активность производных адамантана может быть связана с ингибированием p37, была высказана в работе [207]. Авторы упомянутой работы разработали ряд адамантансодержащих соединений на основании уже описанных в обзоре структур [212]. Авторы использовали адамантановый фрагмент, исходя из соображений ван-дер-ваальсового объема «клетки» по сравнению с фрагментом «клетки» тековиримата (рисунк 1–48).

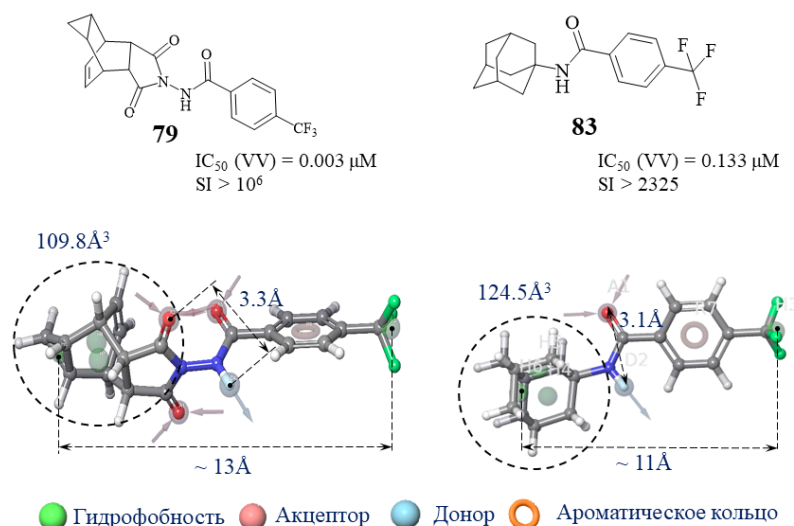


Рисунок 1-48 – Сравнение фармакофорных признаков соединений **79** и **83**: структуры жестких каркасов, или углеводородной «клетки» выделены кругом. Значения противовирусной активности были оценены в работе [207].

Далее в конструкторе молекулы следовал донорно-акцепторный фрагмент и ароматическое кольцо с заместителем в *para*-положении. Использовались результаты структурного исследования тековиримата (**78**) и ряда его аналогов [213], согласно которым электронно-донорные свойства заместителей при ароматическом кольце оказывают влияние на значение EC_{50} . Так, электрон-донорные группы в *ortho*-положении и электроноакцепторные в *para*-положении снижают противовирусную активность (значения EC_{50} увеличиваются), в то время как расположение электроноакцепторных групп в мета- и пара-положениях ароматического кольца тековиримата наоборот, снижают значения EC_{50} . Таким образом, авторы [207] сконструировали набор виртуальных соединений (рисунок 1–49), и оценили их аффинность к сайту связывания белка р37 методами молекулярного докинга. К сожалению, в упомянутой работе не указано количество виртуальных структур. Для синтеза были отобраны 20 активных. Выбор был основан на энергетических параметрах связывания и расположения лигандов в полости белка. Отмечается, что лиганды взаимодействуют с F25, Y150, N312, K314 и F307, что соответствует расположению тековиримата в сайте связывания: углеводородный каркас направлен в сторону F307, $-CF_3$ группа в сторону K314 и N312, карбонильная группа в сторону D361 [207]. Теоретически замена этой группы на акцептор электронной плотности типа $-NO_2$ может привести к образованию дополнительного взаимодействия с заряженными а.о. [213].

Авторы [207] провели процедуру молекулярного докинга ряда производных адамантана (**83–102**), представленных на рисунке 1–49, в предполагаемый сайт связывания тековиримата. Использовали программное обеспечение AutoDock Vina 1.1.2. [214]. Вид докинга – полугибкий, с учетом конформационной подвижности боковых цепей а.о. сайта связывания. Соединения **83–**

100, включая неактивные **101** и **102** (рисунк 1–49) были отобраны как потенциально активные структуры на основании заданного энергетического порога значения аффинности связывания (binding affinity) -7.2 ккал/моль. Результаты молекулярного докинга позволяют ответить на вопрос: связываются ли соединения в сайте связывания. Здесь еще раз следует отметить, что молекулярный докинг, даже в гибких условиях, является весьма грубой оценкой. Между тем результаты биологической оценки подтверждают выбор авторов потенциально активных соединений. Из 20 структур только оказались 2 неактивными (**101** и **102**) и три (**91**, **93** и **94**) показывали умеренную активность против VV и CPXV. Несомненно, это замечательный результат.

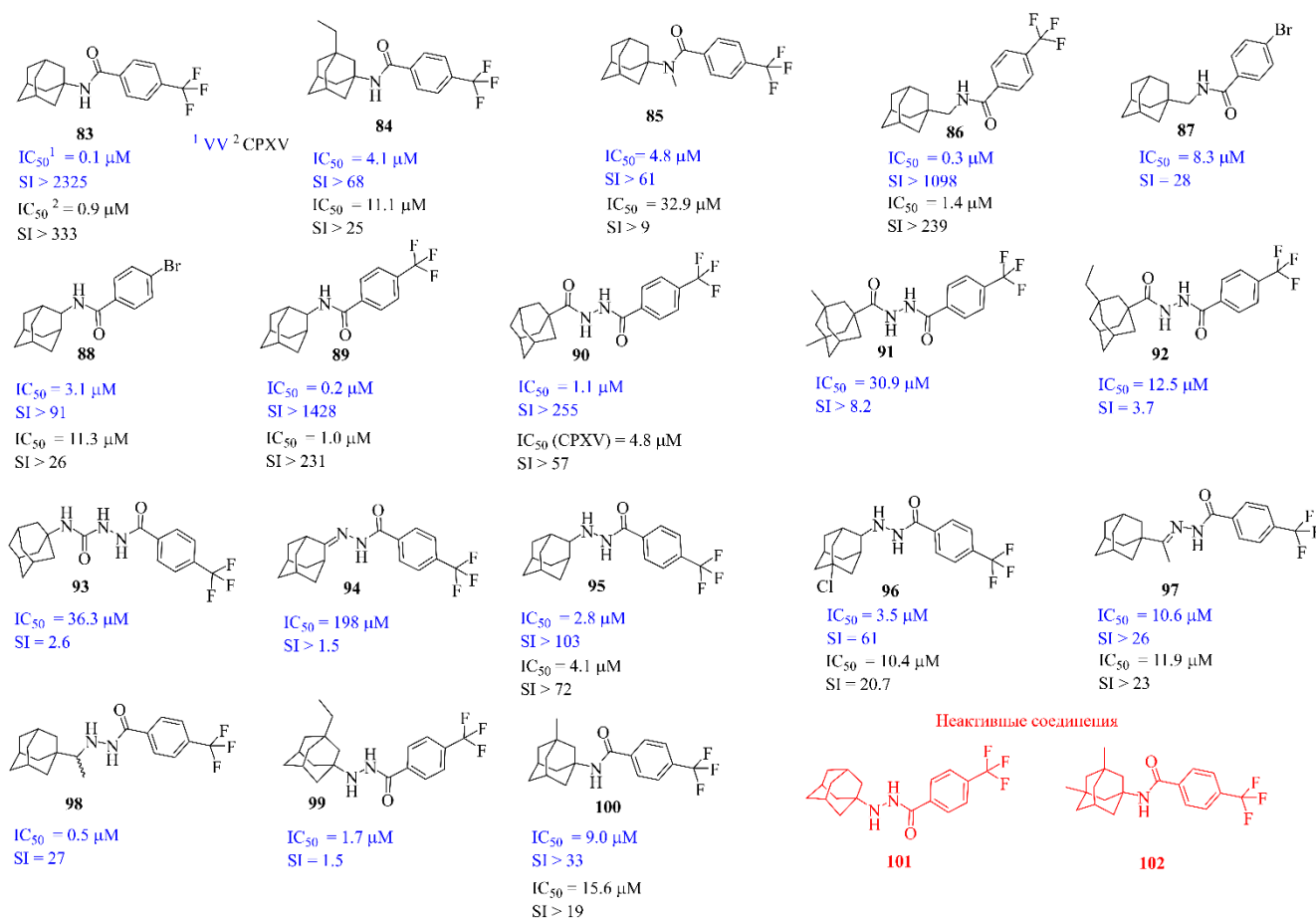


Рисунок 1-49 – Производные адамантана – потенциальные ингибиторы р37.

Для самого активного соединения **83** характерен фармакофорный профиль, схожий с профилем тековиримата, а именно: жесткая гидрофобная «клетка», донорно-акцепторная группа, ароматическое кольцо и электроноакцепторная гидрофобная группа в пареположении.

1.4. Методы молекулярного моделирования

В контексте поиска и разработки новых биологически активных молекул, используются различные методы вычислительной химии, в том числе и методы молекулярного

моделирования. Последние чаще всего применяются для моделирования и описания поведения различных биологических систем, таких как белки, лиганд-белковые комплексы, мембраны и т. д. [215]. Как правило, разработка новых лекарственных препаратов включает в себя дорогостоящие и трудоемкие процедуры экспериментального высокопроизводительного скрининга. В свете этого структурно-ориентированный дизайн биологически активных молекул становится важным инструментом для поиска новых лекарственных препаратов.

Структурно-ориентированный дизайн лекарств (в англоязычной литературе используется аббревиатура SBDD – Structure-Based Drug Design) широко используется в медицинской химии и представляет собой итеративный или циклический процесс, результатом которого является создание лекарственного препарата, готового к клиническим испытаниям. Процесс SBDD состоит из четырех этапов. Первый, или фундаментальный, этап заключается в идентификации потенциальной терапевтической мишени и поиска активных лигандов. Второй этап включает в себя синтез активных соединений и их биологическое тестирование, третий этап подразумевает клинические испытания соединения-лидера, и, впоследствии, регистрацию нового лекарственного препарата [216,217].

Стратегически важный фундаментальный этап SBDD включает в себя методологии виртуального скрининга на основе структуры (SBVS – Structure-Based Virtual Screening), молекулярного докинга и молекулярной динамики. SBVS основан на исследовании структурных и фармакофорных дескрипторов соединений с достоверно известной биологической активностью. На основании анализа данной информации создается система молекулярных фильтров, через которые проходит база данных химических соединений. Например, определение ADMET параметров (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity – адсорбция, распределение, метаболизм, выведение и токсичность) как первоначального этапа оценки биологически активного потенциала соединений, относится к SBVS. Достоинством этого подхода является возможность высокопроизводительного скрининга большого количества химических соединений. Недостатком – сомнительная точность прогнозирования.

К виртуальному скринингу также относят этап обоснования выбора биологической мишени и поиска необходимого белка или лиганд-белкового комплекса, пространственная структура которых расшифрована экспериментальными методами (РСА, ЯМР или ЭМ). Необходимо отметить, что выбор потенциальной терапевтической мишени, как правило, бывает основан на результатах первичных биологических экспериментов. Отсутствие данной информации существенно осложняет использование методов виртуального скрининга, а в ряде случаев делает невозможным их применение. К сожалению, не все пространственные структуры значимых белков расшифрованы экспериментальными методами и доступны в базах данных. В ряде случаев представлена лишь первичная аминокислотная последовательность. Тогда

возникает вопрос о предсказании третичной структуры белка. Одним из подходов является моделирование по гомологии, т. е. предсказание третичной структуры белка на основании информации о структуре гомологичных белков со сходством более 40% [218]. Еще один вариант решения данной проблемы – это моделирование процесса фолдинга исследуемого белка. Впервые проблема сворачивания (или фолдинга) белка была описана еще в 1973 году [219]. Решение данной задачи включает в себя как минимум три основных вопроса: термодинамический (какой баланс межатомных сил определяет вторичную структуру белка из данной аминокислотной последовательности), предсказание третичной структуры белка, и наконец, кинетический вопрос сворачивания [220]. В настоящее время развитие вычислительных методов и компьютерных ресурсов позволило почти разрешить проблему сворачивания белка. Например, в работе [221] описывается новый и достаточно успешный вычислительный подход, способный предсказывать третичные структуры белков почти с экспериментальной точностью. Подход использует нейронную сеть AlphaFold, которая значительно повышает точность прогнозирования структуры за счет включения новых архитектур нейронных сетей и процедур ее обучения. Сеть AlphaFold предсказывает трехмерные координаты всех тяжелых атомов, используя первичную аминокислотную последовательность и выравнивание гомологичных последовательностей из баз данных. Обучение сети происходит на основании данных из Protein Data Bank датированных не позднее 30 апреля 2008 года. В качестве основной метрики используется Local Distance Difference Test (LDDT) – тест на локальную разницу расстояний, который оценивает локальные расстояния между всеми атомами в модели, включая проверку стереохимического правдоподобия [222]. Установка локальной версии требует до 3ТБ дискового пространства и наличие графического процессора NVIDIA. Сеть ColabFold [223] позволяет провести достаточно быстрое предсказание структуры белка за счет сочетания быстрого поиска гомологичных последовательностей с AlphaFold2 [221] и RoseTTAFold [224]. В сочетании с Google Colaboratory ColabFold является бесплатной, доступной и простой в использовании платформой для предсказания структуры белка. В процессе работы плагин дополнительно обращается к базам данных Big Fantastic Database (BFD) и MGnify. Безусловно, в предсказании возможны некоторые неточности ввиду отсутствия той или иной гомологичной структуры в используемых базах данных [221,225,226]. В такой ситуации можно использовать метод гомологичного конструирования в совокупности с ColabFold: предсказание отдельных доменов белка с помощью нейросетей и дальнейшая «ручная» сборка полноразмерной структуры. Далее предсказанная трехмерная структура белка минимизируется методами силового поля AMBER [227] CHARMM [228] или OPLS-AA [229], и проверяются стереохимические свойства белка на графике Рамачандран [230].

Следующим этапом виртуального скрининга является определение целевого места связывания лигандов в белке. В ряде случаев сайт связывания известен, описан и в базах данных представлены лиганд-белковые комплексы. В противном случае необходимо использовать методы идентификации и характеристики полостей в белке пригодных для связывания малых молекул. Наиболее известные инструменты для предсказания сайтов связывания являются Pocket-Finder [231], Q-SiteFinder [232] и SiteMap [155,233]. В первых двух подходах сайт связывания идентифицируется на основании карты потенциалов Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Методология SiteMap, определяет пустые полости пространства в белке путем «прокатки» виртуального сферического зонда, размер которого близок к размеру небольшого лиганда. Далее желательно провести верификацию найденных мест связывания с данными биологических экспериментов, или как минимум аргументировать место связывания на основании структурных и функциональных особенностей исследуемого белка.

Следующий этап виртуального скрининга может включать в себя *de novo* дизайн или молекулярный докинг уже известных химических структур. Дизайн *de novo* представляет собой процесс поэтапного построения модели лиганда внутри сайта связывания модели рецептора или активного центра фермента, пространственные структуры которых описаны экспериментальными методами [234]. Молекулярный докинг позволяет спрогнозировать конформацию и положение лиганда в целевом сайте связывания, с оценкой энергетических параметров. На сегодняшний день – это самый распространенный метод виртуального скрининга. Существует большое количество программных пакетов, которые позволяют быстро оценить аффинность соединений к тому или иному белку. Программы молекулярного докинга используют различные алгоритмы генерации структур лигандов, разные способы описания межмолекулярных взаимодействий и оценки энергетических параметров связывания. Наиболее известными программами являются AutoDock Vina [214] и Glide [235]. В первом случае используется ламарковский генетический алгоритм, имитирующий процесс эволюции путем манипуляций с набором молекул, рассматриваемых в качестве хромосом. Во втором случае используется система иерархических фильтров для поиска возможных местоположений лиганда в области связывания в белке. Анализ результатов молекулярного докинга включает в себя ранжирование энергетических параметров, а также визуальное фильтрование, позволяющего оценить положение лиганда в белке исходя из функциональных и структурных особенностей последнего. В качестве уточняющих пост-докинг расчетов используются методы молекулярной механики в сочетании с методами Пуассона-Больцмана или обобщёнными методами Борна в совокупности с неявным учетом растворителя [236] для оценки энергии связывания. Подобные подходы в значительной степени могут уточнить результаты молекулярного докинга и определить соединения-лидеры.

Геометрические параметры лиганд-белковых комплексов могут быть использованы для построения стартовых моделей с целью проведения молекулярно-динамических симуляций. Методы молекулярно-динамического моделирования дают возможность описать движение белков в атомном масштабе [237] и оценить степень влияния малой молекулы на вторичную структуру белка в лиганд-белковом комплексе. Так же необходимо отметить методы метадинамики, которые позволяют оценить изменение свободной энергии и другие функции состояния системы в зависимости от коллективных переменных [238]. И, наконец, QM/MM подход может быть использован для оценки энергии связывания лиганда и белка, с целью верификации результатов молекулярного докинга. QM/MM подход объединяет в себе сильные стороны методов квантовой химии и молекулярной механики и позволяют получить быстрый и точных результат. Подход заключается в следующем: активная часть модельной системы (например, лиганд и его окружение в радиусе 5 Å) может быть оптимизирована методами квантовой химии. Остальная часть белка оптимизируется методами силовых полей.

Таким образом, развитие методов вычислительной химии в совокупности с ростом индустрии вычислительных мощностей позволяет успешно использовать методы виртуального скрининга для разработки и поиска лекарственных препаратов. Удачные попытки применения методов молекулярного моделирования для поиска новых биологически активных, в частности противовирусных, соединений, описаны в обзорах [239,240]. Согласно авторам работы [239] применение методов молекулярного моделирования позволило описать механизм действия противовирусного препарата дарунавир, ингибитора димеризации ВИЧ-протеазы. Кроме того, один из антиретровирусных препаратов маравирик был создан при помощи высокопроизводительного скрининга в совокупности с методами молекулярного моделирования [241]. А в обзоре [242] описаны возможности крупно-зернистого моделирования процесса формирования вирусов. Представлены особенности процессов сборки вириона, что недоступно, по крайней мере с таким разрешением, для непосредственных экспериментальных наблюдений.

Практически все задачи, описанные в научной литературе и касающиеся использования методов молекулярного моделирования, можно разделить на два типа: первый – определение места расположения лиганда в сайте связывания, и второй – описание возможного механизма действия. Первый тип задач используется для визуализации положения лиганда, биологически активного соединения, в сайте связывания какого-либо белка. Принцип подобных задач достаточно простой: в ряду соединений, проявляющих выраженную противовирусную активность, выбирают соединение-лидер. Выбор, как правило, основывается на значениях IC₅₀ (EC₅₀) и индекса селективности, совокупность показателей активности и безопасности данного соединения. Ряд биологических экспериментов (эксперимент по времени добавления,

клонирование и секвенирование резистентных штаммов вируса) и/или суррогатных моделей (псевдовиральных систем, имеющих на своей поверхности нужный гликопротеин) позволяет предположить биологическую мишень действия и потенциальное место связывания. Тогда задача сводится к визуализации контактов атомов лиганда с а.о. выбранного сайта связывания.

Второй тип задачи заключается в описании механизма противовирусного действия. Здесь требуется не просто обоснование биологической мишени, но и анализ влияния лиганда на функционирование белка. Как правило, в такой задаче рассматривается ряд соединений, как активных, так и неактивных. Отрицательный контроль здесь важен, так как анализ связывания неактивного лиганда в сайте и природа его взаимодействий с окружающими а.о. может помочь понять исследователю причину различной противовирусной активности. Экспериментальные данные в совокупности с методами молекулярного моделирования позволяют обосновать выбор мишени, описать предполагаемый механизм противовирусного действия рассматриваемых соединений, а самое главное, получить рекомендации для структурной модификации лигандов. Кроме того, подобный подход позволяет построить теоретическую модель, которую можно использовать для предсказания активности принципиально новых соединений.

1.5. Заключение

В представленном литературном обзоре рассмотрены мембранные белки вируса гриппа, коронавирусов, респираторно-синцитиального вируса (РСВ), вируса Эбола и ортопоксвирусов. Описаны структурные и функциональные особенности поверхностных белков I типа, а именно: гемагглютинаина вируса гриппа, S-белка коронавирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2, F-белка РСВ и гликопротеина вируса Эбола. В полостях белков аннотированы сайты связывания ингибиторов входа перечисленных вирусов.

Дополнительно анализированы строение и функциональные особенности двух мембранных вирусных белков: протонного M2 канала вируса гриппа и белка p37 ортопоксвирусов. Представлены структурные дескрипторы блокаторов протонного канала и, ингибиторов белка p37 среди которых – тековиримат. Любопытно, что производные адамантана встречаются как среди ингибиторов M2 канала, так и среди ингибиторов белка p37.

Анализ научной литературы позволил выявить ряд нерешенных проблем. Во-первых, достоверно **не определено альтернативное** место связывания малых молекул, подавляющих фузогенную активность гемагглютинаина вируса гриппа. Согласно научным публикациям, соединения, стабилизирующие префузионную конформацию НА, могут связываться в **любом** месте гептадного повтора белка между двумя функциональными α -спиралями. При этом структурные дескрипторы ингибиторов гемагглютинаина весьма разнообразные. Можно ли предположить наличие **альтернативных областей** связывания малых молекул в гликопротеине

вируса гриппа, с учетом возможного их влияния на структуру белка? Вероятно, да. Тогда, какими структурными особенностями могут обладать такие ингибиторы и где они будут связываться?

Во-вторых, до сих пор **не определено** место связывания ингибиторов фузогенной активности поверхностного гликопротеина SARS-CoV-2. В базе данных Protein Data Bank пространственные структуры S-белка в комплексе с лигандами, расположенными в области гептадных повторов, **отсутствуют**. Между тем использование методов молекулярного моделирования может помочь найти полости поверхностного белка пригодные для связывания малых молекул и оценить их степень влияния на конформационные перестройки белка. Подобные исследования могут помочь в разработке новых соединений активных в отношении коронавирусной инфекции.

Несмотря на структурные различия поверхностных белков вирусов гриппа, коронавирусов, включая SARS-CoV-2, РСВ и вируса Эбола, некоторые полости данных белков, рассматриваемые в качестве потенциальных мест связывания ингибиторов, имеют схожий фармакофорный профиль. Это объясняет противовирусную активность ряда соединений, например, умифеновира против гемагглютинаина вируса гриппа и S-белка коронавируса. Этот факт может быть лазейкой для поиска и разработки противовирусных препаратов широкого спектра.

Несмотря на то, что протонный M2 канал вируса гриппа является хорошо изученным виropоринoм, в базе данных Protein Data Bank **отсутствуют** геометрические параметры полноразмерного M2 канала. Между тем, для понимания механизма влияния малых молекул на активацию протонного канала для теоретических расчетов рекомендуется использовать полноразмерную модель.

В базе данных Protein Data Bank **отсутствует** пространственная структура мембранного белка р37 вирусов оспы, полученная экспериментальными методами. В научной литературе приводятся результаты процедуры предсказания третичной структуры с использованием методологии нейросети. И, хотя результат предсказания можно считать удовлетворительным, место связывания тековиримата – ингибитора белка р37 до сих пор является **спорным** вопросом.

Тогда решение вышеперечисленных спорных вопросов методами молекулярного моделирования является основной целью данного исследования.

2. МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве основных объектов данного исследования были рассмотрены следующие мембранные вирусные белки: гемагглютинин вируса гриппа; S-белок коронавируса SARS-CoV-2; F-белок респираторно-синцитиального вируса (РСВ); гликопротеин (GP) вируса Эбола; М2 протонный канал вируса гриппа и мембранный белок р37 ортопоксвирусов.

Для процедур молекулярного докинга были использованы белки и референсные лиганд-белковые комплексы (таблица 2–1), если таковые имелись в базе данных. В случае отсутствия геометрических параметров третичных структур белков была применена процедура предсказания пространственной структуры белка. Для молекулярно-динамических симуляций были использованы полноразмерные структуры поверхностных белков, которые были собраны из их соответствующих протомеров, если полноразмерный тример отсутствовал в базе данных.

Таблица 2-1 – Мембранные вирусные белки

PDB код	Штамм	Наименование белка	Соединение референс	Литература
Вирус гриппа				
1RU7	A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	тример HA	отсутствует	[20]
3EYM	A/Aichi/2/1968 (H3N2)		ТБГХ	[28]
3LZG	A/California/04/2009(H1N1)		отсутствует	[243]
3M5G	A/ /New York/30732-1/2005(H7N2)		отсутствует	[244]
4K62	A/Indonesia/5/2005(H5N1)		отсутствует	[245]
5T6N	A/Aichi/2/1968 (H3N2)		умифеновир	[50]
3C9J	A/Hong Kong/156/1997 H5N1	ТМД M2 канала	амантадин	[181]
2KQT				[246]
SARS-CoV-2				
6VW1	Wuhan virus strain	РСД в комплексе с АПФ2	отсутствует	[97]
7BNM	Wuhan virus strain	тример S-белка	отсутствует	[78]
7W94	Delta B.1.617.2		отсутствует	[247]
7QO7	Omicron B.1.1.529		отсутствует	[14]
7B62	Wuhan virus strain	N-концевой домен	биливердин	[84]
Респираторно-синцитиальный вирус				
7LVW	A/RSV	тример	отсутствует	[130]
7KQD	A/RSV	протомер	сисунатовир (RV521)	[139]
Вирус Эбола				
5JQ7	Zaire ebolavirus (strain Mayinga-76)	протомер	торемифен	[151]
6S8D	Zaire ebolavirus (strain Mayinga-76)	тример	отсутствует	[150]

В качестве биологически активных соединений были рассмотрены малые органические молекулы, структурные особенности которых приведены в каждом отдельном разделе главы 3. Подготовка лигандов и белковых структур к расчетам, процедуры молекулярного докинга и молекулярной динамики были проведены с использованием программного обеспечения Schrodinger Small Molecule Drug Discovery Release 2021–3. В ряде случаев был использован программный комплекс GAUSSIAN C09 [248] для оптимизации геометрических параметров малых молекул методами квантовой химии.

2.2. Подготовка протеина и лиганда

2.2.1. Подготовка протеина

Геометрические параметры белков были загружены из некоммерческой базы данных Protein Data Bank [14]. Модельные структуры белков и/или лиганд белковых комплексов были проверены на наличие ошибок с помощью плагина Schrodinger Protein prepwizard. При необходимости были добавлены недостающие боковые цепи аминокислот, восстановлены кратности связей, удалены молекулы растворителя (при необходимости), добавлены и минимизированы атомы водорода. При подготовке к расчетам поверхностных белков была учтена pH среда, геометрические параметры были оптимизированы методом силового поля OPLS4 [229].

2.2.2. Предсказание третичной структуры белка

В большинстве случаев для молекулярного моделирования были использованы геометрические параметры белковых структур (в том числе в комплексе с лигандами), представленные в базе данных Protein Data Bank [14]. Однако как минимум в двух задачах, представленных в данной работе, третичная структура протеина в базе данных отсутствовала. В подобных случаях трехмерная структура белка была предсказана на основании первичной аминокислотной последовательности вычислительными методами.

В данной работе была использована методология нейросетей AlphaFold2 [221] и RoseTTAFold [224] в совокупности с гомологическим конструированием, в зависимости от белка. Так предсказание третичной структуры белка p37 было полностью основано на результатах решения нейросети AlphaFold. В случае протонного M2 канала, отдельные домены белка были предсказаны с помощью нейросетей, с последующей «ручной» гомологической сборкой канала.

2.2.3. Подготовка лигандов и оценка константы кислотности

Геометрические параметры лигандов были минимизированы методом силового поля OPLS4 [229] с учетом всех возможных конформаций. При необходимости конкретный лиганд был оптимизирован DFT-методом квантовой химии в приближении газовой фазы M05-2X [249] дополненным дисперсионной поправкой GD3 [250] с базисным набором TZVP [251]. В ряде случаев, в зависимости от структурных особенностей малой молекулы, была учтена возможность протонирования атома азота. Расчеты были проведены в квантово-химической программе Jaguar [252], реализованной в программном комплексе Schrodinger Small Molecule Drug Discovery. Была использована методология расчетов, описанная в работе [253]. Константа кислотности была оценена по формулам 2–1 и 2–2

$$pK_a = -\log(K_a) = \frac{\Delta G_{aq}}{2.303RT}, \quad (2-1)$$

где

$$\Delta G_{aq} = \Delta G_s(B) + \Delta G_s(H^+) - \Delta G_s(BH^+), \quad (2-2)$$

Результатом протонирования лиганда может быть формирование дополнительного реакционного центра, который может образовывать дополнительные межмолекулярные контакты (водородные и/или солевые мостики) с атомами аминокислот сайта связывания. В зависимости от значений pH среды, соотношение протонированных и депротонированных форм молекул может изменяться. Данное соотношение было оценено по уравнению Гендерсона-Хассельбаха [254,255] (формула 2–3):

$$pH = pK_a + \log \frac{[B]}{[BH^+]}, \quad (2-3)$$

Процедуры молекулярного докинга были проведены для обеих форм (протонированных и нет), если их соотношения были равные. В анализ энергетических параметров были взяты средневзвешенные значения.

2.3. Поиск потенциального сайта связывания

При наличии пространственной структуры белка с лигандом, описанной методами РСА или ЭМ, процедуру поиска сайта связывания можно опустить. Однако в данном случае крайне желательно оценить схожесть фармакофорного профиля и структурных дескрипторов референсного соединения с исследуемыми молекулами. Это позволяет получить дополнительное доказательство в правильности выбора как биологической мишени, так и вероятного места связывания. Результаты анализа научной литературы, посвященной ингибиторам НА вируса гриппа, изложенные в разделе 1.2.1, данной работы, свидетельствуют о том, что ингибиторы НА – это соединения, которые относятся к совершенно различным классам органических соединений.

В случае отсутствия референсных геометрических параметров лиганд-белкового комплекса можно использовать дополнительные вычислительные инструменты или, основываясь на понимании функционирования того или иного белка (необязательно поверхностного вирусного белка), применить интуитивный подход.

В первом случае можно использовать метод идентификации и характеристики полостей на поверхности белка [155,156], реализованного в плагине Site Map. Как минимум одно доказательство успешного применения данного плагина можно найти в публикации [154], в которой авторы определили сайт связывания ингибиторов гликопротеина вируса Эбола. Теоретические расчеты также нашли свое подтверждение в работах [151,160,163].

Методология Site Map, определяет пустые полости пространства в белке путем «прокатки» виртуального сферического зонда, размер которого близок к размеру небольшого лиганда. Плагин характеризует найденные полости с точки зрения свойств аминокислотных остатков, входящих в потенциальный сайт связывания (гидрофобных, полярных, положительно- и отрицательно заряженных), а также с позиции размера и объема полости. Кроме того, оценивается степень покрытия белком и доступность растворителя. В основе подобной идентификации лежит анализ полостей связывания лигандов в более чем 1000 различных лиганд-белковых комплексов [155], структура которых была расшифрована экспериментальными методами.

На примере гемагглютиниона вируса гриппа результат использования данного подхода позволил определить пять вероятных полостей, подходящих для связывания лигандов ([рисунки 2-1А](#)). Первая крупная полость (сайт 1, [рисунки 2-1А, Б](#)) расположена в области гептадных повторов в HA_2 , вторая – в глобулярной головке HA_1 (сайт 2, [рисунки 2-1А, Б](#)). Небольшие полости регистрируются между протомерами ближе к трансмембранному домену белка (сайт 3, [рисунки 2-1А, Б](#)), на границе двух субъединиц (сайт 4, [рисунки 2-1А, Б](#)) и между двумя α -спиралями гептадных повторов, ближе к петле, связывающей короткую и длинную α -спирали (сайт 5, [рисунки 2-1А, Б](#)). Интересно, что полость рецептор-связывающего домена при использовании, данного плагина не характеризуется как возможное место связывания.

Сайты связывания визуализируются как набор точек (на [рисунке 2-1Б](#) точки, окрашенные в различные цвета, соответствуют разным сайтам связывания), каждая из которых характеризуется комбинацией свойств, вычисляемых в каждой точке сайте. Аминокислотные последовательности, обрамляющие полость сайта связывания, позволяют получить характерные области карты сайта: гидрофобные – на [рисунке 2-1В](#) и [Г](#) показаны желтым цветом, донорно-акцепторные – синим и красным соответственно.

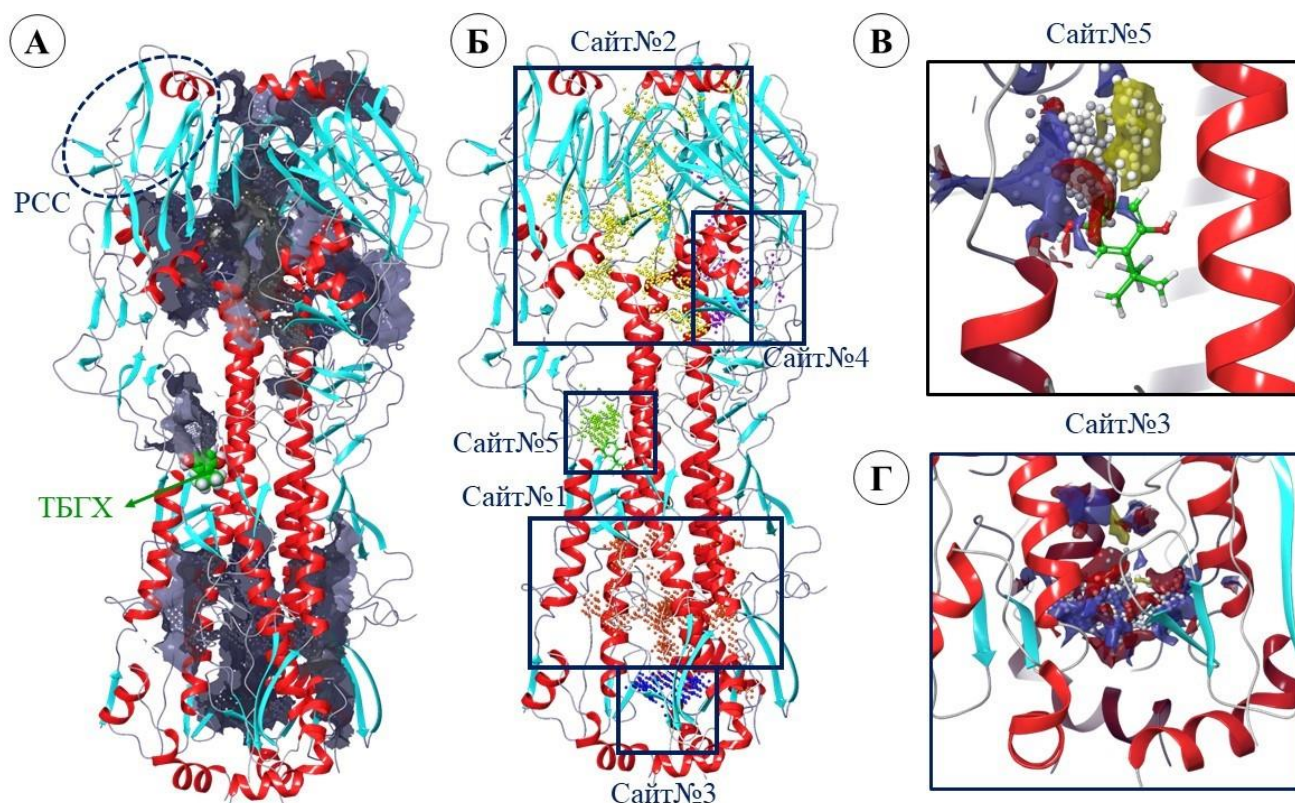


Рисунок 2-1 – Визуализация процедуры поиска сайтов связывания в НА: А – полости, обнаруженные в НА; Б – узловые точки сайтов связывания, физические дескрипторы которых указаны в [таблице 2-1](#); В и Г – картирование двух самых перспективных сайтов: гидрофобные области указаны желтым цветом, донорно-акцепторные – синим и красным соответственно. Визуализация протеина построена на основании PDB кода 3EYM [28]

На основании анализа структурных и физических дескрипторов полости, каждому сайту присваивается балл (или в англоязычной литературе Site Score). Значение параметра Site Score должно превышать 0.8 и оценивается как средневзвешенное значение, которое рассчитывается как:

$$\text{Site Score} = 0.0733\sqrt{n} + 0.6688e - 0.20p, \quad (2-4)$$

где n – это число точек сайта ([рисунок 2-1Б](#)); e – показатель «вложения», значение которого должно быть близко или превышать 0.78; p – показатель гидрофильности. Значение Site Score >1 позволяет рассматривать сайт связывания как перспективный. В случае НА всем областям связывания присвоена оценка выше 1 ([таблица 2-2](#)).

Размер сайта или количество узловых точек сайта также может рассматриваться в качестве индикатора предпочтительного места связывания. Согласно эмпирическому подходу каждому атому связанного лиганда, включая атомы водорода, соответствует от 2 до 3-х узловых точек. Например, для самого предпочтительного сайта № 3 размер лиганда может содержать от 64 до 96 атомов ([таблица 2-2](#)).

Таблица 2-2 – Физические дескрипторы сайтов связывания в НА.

№ сайта	Балл сайта	Размер сайта	Объем, Å ³	Баланс	Донор/акцептор	Место расположения в протеине *
Сайт №3	1.132	193	588.2	0.076	1.066	НА ₂ между тремя протомерами, а.о. 119-138, 170, 171
Сайт №5	1.117	131	269.3	1.097	2.566	Полость рядом с петлей, соединяющей короткую и длинную α-спирали: а.о. НА ₁ – 293, 274, 305–307, 310–311; НА ₂ – 55–59, 90–99.
Сайт №1	1.049	637	1744.5	0.412	0.811	Область гептадных повторов НА ₂ : а.о. 1–159
Сайт №2	1.029	629	2444.5	0.296	0.506	Глобулярная головка НА ₁ : а.о. 65–302.
Сайт №4	1.019	169	533.0	0.332	0.540	Между двумя субъединицами НА ₁ : а.о. 65, 86–91, 101–110, 209–212, НА ₂ : а.о. 63–81.
* аминокислотная последовательности соответствует штамму вируса гриппа A/Aichi/2/1968 (H3N2) (PDB код ЗЕУМ [28])						

Балансы гидрофильности или гидрофобности также являются важной характеристикой. Чем больше значения этого параметра, тем большей гидрофобностью и меньшей гидрофильностью обладает сайт связывания. Средняя оценка для исследуемых сайтов связывания составляет 1.6 единиц. Значение, указанное в колонке «донор/акцептор», определяется размерами и интенсивностью донорных и акцепторных областей сайта. При этом чем больше значение, тем лучше в этом сайте свяжется лиганд, являющийся донором водородных связей (или акцептором электронной плотности).

Результат поиска потенциальных мест связывания в НА весьма неоднозначен. Очевидно, что выбор места связывания лигандов должен быть основан на понимании механизма функционирования белка. Рассмотрим два перспективных места связывания: сайты №3 и №5. Полость сайта №3 расположена между тремя протомерами белка во второй субъединице НА. Размер сайта предполагает связывание сравнительно небольших лигандов (не более 100 атомов). Сайт №3 имеет гидрофильные признаки и равномерный донорно-акцепторный баланс (таблица 2–2). Т. е. в данном случае лиганд должен быть гидрофильным, и содержать, в равной степени группы-доноры и акцепторы водородной связи. Однако расположение сайта кажется несколько некорректным: область гептадных повторов заканчивается на 174 а.о., далее идет линкер и трансмембранный домен (рисунок 1–2). Вероятно, что попадание лиганда в данную полость, скорее всего, затруднено стерическими эффектами тех частей белка, которые просто не вошли в кристаллические данные. Кроме того, непонятно, какой может быть эффект от связывания лиганда в этой области.

Второй по перспективности сайт связывания, сайт №5, находится в весьма важной области белка, рядом с петлей, связывающей две α -спирали, короткую и длинную. Эта спираль подвергается серьезным конформационным и структурным изменениям. Связывание лиганда в этой области, может оказаться существенной для перегруппировки НА при переходе из post- в pre-fusion конформации. Сайт совпадает с местом связывания ТБГХ, размер небольшой: подходит для связывания малых молекул, состоящий из не более чем 65 атомов. Сайт содержит гидрофобные полости, и предполагается, что лиганд должен содержать преимущественно атомы (или группы), являющиеся донорами водородной связи. Остальные сайты связывания можно не рассматривать вовсе, так как их размер и место расположения в белке не коррелирует с данными о функциональных особенностях последнего.

2.4. Молекулярный докинг

2.4.1. Алгоритм молекулярного докинга

Все процедуры молекулярного докинга, описанные в данной работе, были проведены с использованием протокола принудительной стыковки (IFD – induced fit docking) на основе алгоритма Glide [235]. Glide использует серию иерархических фильтров для поиска возможных местоположений лиганда в области связывания в белке. Оценочная функция (Glide score) основана на эмпирической функции ChemScore [256], включает в себя термы статического столкновения, гидрофобного включения и т.д. Принудительный докинг учитывает гибкость белка при стыковке лиганда в активном сайте путем многократного комбинирования результатов жесткой стыковки с последующим уточнением структуры белка. Данный протокол учитывает влияние лиганда на конформацию боковых цепей а.о. сайта связывания. Согласно работе [257] IFD протокол учитывает небольшие релаксации основной цепи белка и значительные конформационные изменения боковых цепей. Другими словами IFD-докинг – это классический пример гибкого докинга.

Молекулярный докинг ряда лигандов был проведен с использованием QM (квантово-механический) протокола докинга, в основе которого также «лежит» алгоритм Glide. При этом геометрические параметры лиганда и частичные заряды атомов оцениваются квантово-химическим способом с использованием DFT функционала B3LYP [258] с базисным набором 6-31G* [259].

В данной работе во всех случаях размер расчетной grid-матрицы составил размер до 15 Å. Геометрические параметры а.о., расположенных в радиусе 5–7 Å от лиганда ограниченно минимизировались. В ряде случаев были использованы позиционные ограничения по расположению лигандов относительно контрольного соединения (соединения-референса).

2.4.2. Выбор оптимальной докинг позиции

Как правило, результатом молекулярной стыковки является получение ряда докинг-позиций – различных положений лиганда в сайте связывания. Для создания корреляционной модели необходимо сделать выбор оптимальной докинг-позиции. Ранжирование решений докинга было проведено путём оценки следующих энергетических параметров:

- ✓ значения docking score (на основе скоринг-функции Glide Score (GS) за вычетом штрафов, в ккал/моль);
- ✓ эффективности лиганда (ligand efficiency, LE) (где учитывается поатомное распределение скоринг-функции);
- ✓ параметра модельного значения энергии (E_{model}) (включающего значение GS, энергию несвязанных взаимодействий и параметры энергии, затрачиваемой на формирование укладки соединения в сайте связывания).

Эффективность лиганда была оценена по [формуле 2–5](#):

$$|LE| = \frac{GS}{N}, \quad (2-5)$$

где N – количество тяжелых (не водородных) атомов.

Кроме того, обращали внимание на значение IFD score (ккал/моль), включающее в себя энергию белка (PE – prime energy), скоринг-функцию GS и терм кулоновского взаимодействия ($Glide_E_{\text{coul}}$) ([формула 2–6](#)).

$$IFD\ score = 1.0 \cdot PE + 0.057 \cdot GS + 1.428 \cdot Glide_E_{\text{coul}} \quad (2-6)$$

При наличии позиционных ограничений была выбрана позиция по совокупности с данными RMSD, т. е. среднеквадратичного отклонения положения атомов лиганда по сравнению с расположением атомов соединения-референса. Использование данного значения имеет смысл только в случае наличия общего скаффолда в соединении-референсе и лиганде.

Оценочные функции в используемом программном обеспечении [235] базируются на эмпирическом подходе оценки энергетических параметров связывания лиганда и белка. Главным недостатком таких функций является необходимость создания некой обучающей выборки. И, вероятно, что эмпирическая функция будет хорошо работать для тех белков, которые использовались в обучающей выборке, и хуже для других. В таком случае основной выбор оптимальной докинг-позиции был основан на результатах визуального фильтрования. Визуальный анализ позволил убедиться, во-первых, в том, что лиганд расположен в сайте связывания, ближе к центру, не на периферии; во-вторых, конформация лиганда разумна и физико-химически осмыслена, и, наконец, лиганд взаимодействует с ключевыми а.о. сайта связывания.

Для выбранной, оптимальной докинг позиции была проведена оценка свободной энергии связывания лиганда и белка $\Delta G_{\text{MM-GBSA}}$ (далее по тексту ΔG_{bind} [260]) с использованием диэлектрической модели Борна, где в качестве растворителя была учтена вода. Ранжирование лигандов, основанное на рассчитанных энергиях связывания, достаточно хорошо согласуется с ранжированием экспериментальных данных, особенно в случае с соединениями со схожим скаффолдом.

2.4.3. Ранжирование результатов расчетов и результатов экспериментов

Должны ли результаты молекулярного докинга коррелировать с результатами биологических экспериментов? Если речь идет о результатах жесткого или полугибкого докинга, то, очевидно, что нет. Однако в работах [167,261] авторы строят корреляционные зависимости между значениями pIC_{50} и docking score или точнее Binding Affinity (ккал/моль). При этом индекс корреляции в работе [167] составляет 0.8445, а в [261] 0.9043. Это достаточно хороший результат. Тем не менее смущает методология проведенного докинга, и выбор оптимальной позиции и количество точек в выборке. В [167] авторы приводят данные зависимости pIC_{50} противовирусной активности против вируса Эбола и значений Docking score, полученных в результате процедуры стыковки 9ти лигандов со сайтом связывания ингибиторов GP вируса Эболы. Выбор оптимальной докинг-позиции основан на совокупности значений энергетических параметров связывания и анализа межмолекулярных взаимодействий между атомами лигандов и а.о. сайта связывания. Здесь обращает на себя внимание не только малая выборка, но и попытка построить зависимость от значений, характеризующих энергию связывания с конкретной мишенью и общими значениями противовирусной активности. В последнем смущает высокий индекс корреляции, учитывая, что под алгоритмом AutoDock Vina подразумевается полугибкий докинг. Тем не менее авторы не ставят целью построить предсказательную модель, а лишь используют результаты расчетов в качестве дополнительного доказательства обоснованного выбора биологической мишени. В работе [261] высокий индекс корреляции оправдан поиском зависимости между значениями ингибирующей активности фермента ЦОГ-1 в тестах *in vitro* и аффинностью лигандов к активному сайту фермента. Авторы также использовали AutoDock Vina. Выбор оптимальной докинг позиции основан на ранжировании энергии связывания в совокупности с данным о расположении ключевых а.о. R120, Y355 и S530. В расчете также фигурирует небольшая выборка (12 точек). Основной вывод работы также заключается в обосновании выбора мишени и рекомендации увеличить количество соединений, как активных, так и неактивных для улучшения модели.

Теоретически, использование более точной процедуры молекулярного докинга, как например QM докинг с алгоритмом Glide, должно улучшить ранжирование результатов докинга

в совокупности с экспериментальными данными. Так авторы [262] приводят корреляционную зависимость значений docking score (QLPD Glide XP – квантово-химический докинг, основанный на алгоритме Glide с дополнительно улучшенными предсказаниями (extra prediction XP) и значений IC_{50} ингибирования фосфатидилинозитол-3-киназы PIK3CA. Выбор оптимальной докинг позиции был сделан на основании значения RMSD по сравнению с укладкой соединения-референса. В выборке участвовали только соединения-лидеры (6 точек), индекс корреляции составил 0.828.

В статьях [263,264] оценивают уже энергии связывания лиганда и белка в лиганд-белковой комплекс на основании совокупности результатов молекулярного докинга и молекулярно-динамических симуляций. Корреляционная зависимость между экспериментальной оценённой энергией связывания 10 лигандов с сайтом связывания гликогенсинтазы-3 GSK-3 β и значениями энергии связывания, полученными в результате последовательных процедур молекулярного докинга и динамики, соответствует значению индекса корреляции 0.828 единиц. Другими словами, авторы данной работы [263] выбирали оптимальные докинг позиции, проводили для них молекулярно-динамические симуляции и вычисляли значения энергии связывания усредненное по всем фреймам симуляции. Схожий подход применили и в работе [264]: сначала процедура молекулярного Glide докинга лигандов в сайт связывания гистон диацетилазы (HDAC), потом выбор оптимальной докинг позиции по значению RMSD и энергетическим параметрам связывания и молекулярно-динамические симуляции с последующим расчетом энергии связывания. Здесь авторы строят прогностическую модель и валидируют ее на ряде соединений. Необходимо отметить, что предсказание значений pIC_{50} весьма точное: различия между экспериментальными и теоретическими данными не превышают 1.5 единиц.

Таким образом, построение корреляционной зависимости результатов молекулярного докинга (или точнее сказать результатов молекулярного моделирования) и экспериментальных значений pIC_{50} встречается достаточно часто в научной литературе. Целей таких зависимостей может быть как минимум две: 1) обоснование выбора биологической мишени, особенно если речь идет о противовирусной активности, где определение мишени достаточно трудоемкая процедура; 2) построение прогностической модели. Очевидно, что для достижения второй цели необходимы более точные процедуры молекулярного моделирования. Результатов только молекулярного докинга даже в гибких условиях с учетом влияния лиганда как на конформацию боковых цепей а.о. сайта связывания, так и на расположение основной цепи **недостаточно**.

В рамках данной работы были использованы графики корреляционной зависимости. Для обоснования выбора мишени в выборку были включены данные docking score, полученные в результате процедуры гибкого молекулярного докинга. Выбор оптимальной докинг позиции

основывался на визуальном фильтровании и значениях энергетических параметров связывания. В случае наличия соединения-референса в анализ также было включено значение RMSD, если скаффолд исследуемого лиганда и референсного соединения имел схожие дескрипторы. Для построения прогностической модели для оптимальной докинг-позиции дополнительно была оценена энергия связывания (ΔG_{bind}) [265]. Расчет был проведен для нескольких позиций с учетом средневзвешенного значения.

2.4.4. Оценка константы диссоциации

Если основная цель теоретического исследования заключается в описании механизма некоторой биологической активности, то для сравнения теоретических и экспериментальных данных целесообразно оценить значение константы диссоциации. Тогда процесс ингибирования, или точнее связывания лиганда в сайте связывания можно иллюстрировать математическим способом (рисунок 2–2), по реакции:



где $[P + L]_{\text{eq}}$ – лиганд $[L]_{\text{eq}}$ белковый $[P]_{\text{eq}}$ комплекс в некотором уравновешенном состоянии.

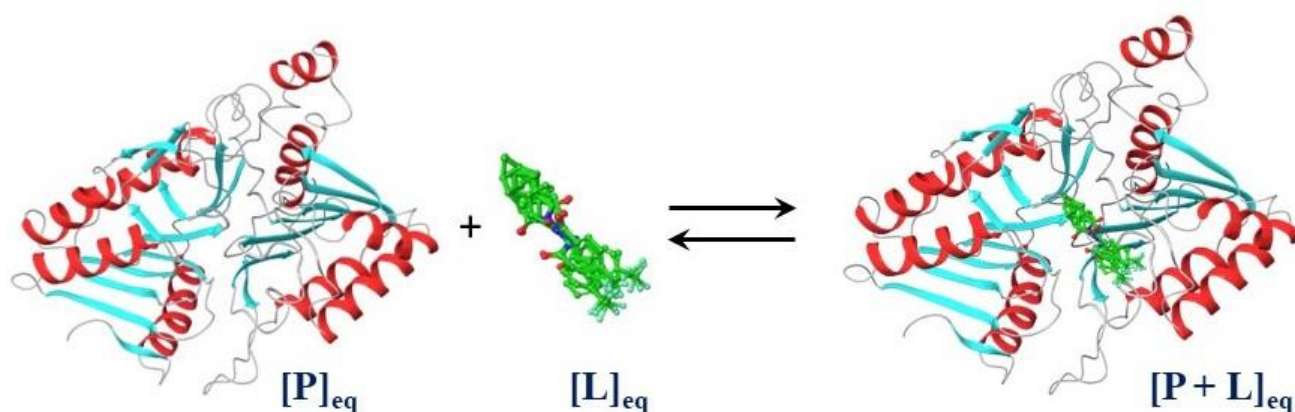


Рисунок 2-2 – Взаимодействие протеина $[P]$, на примере мембранного белка р37, и лиганда $[L]$, на примере ингибитора р37 тековиримата, с образованием лиганд-белкового комплекса.

Тогда свободная энергия связывания зависит от константы диссоциации по формуле 2–8:

$$\Delta G_{\text{bind}} = -RT \ln K_D, \quad (2-8)$$

где R – универсальная газовая постоянная, равная 8.314 Дж/(моль·К), T – температура в К и K_D – константа диссоциации:

$$K_D = K_i^{-1} = \frac{[P + L]}{[P][L]} \quad (2-9)$$

Используя формулы 2–8 и 2–9, можно оценить константу диссоциации из теоретически рассчитанных значений энергии связывания. В оригинальном выражении зависимости ΔG_{bind} от K_D , физический смысл величины относится к K° – стандартной константе равновесия –

безразмерной величине, которую следует перевести в размерную величину концентрационной константы из соотношения:

$$K_c = K^o \left(\frac{RT}{P} \right)^{-\Delta\nu} \quad (2-10)$$

Как правило, этот пересчет авторами ряда научных публикаций не делается [266], или константа диссоциации заменяется на значение IC₅₀ как в работе [267], где экспериментальное значение энергии связывания рассчитывалось по формуле 2-11:

$$\Delta G_{exp}(\text{ккал/моль}) = \frac{RT \ln(IC_{50}(nM) \times 10^{-9})}{1000} \quad (2-11)$$

В дальнейшем, полученные таким образом значения, сравнивались с энергией связывания лиганда и белка в лиганд-белковый комплекс ΔG_{bind} ($\Delta G_{MM-GBSA}$). При этом авторы использовали ковалентный докинг в основе которого лежит также Glide-алгоритм с последующей оценкой $\Delta G_{MM-GBSA}$. И несмотря на то, что соотношение $K_i \sim IC_{50}$ – это достаточно сложная математическая зависимость [268], авторы получают удовлетворительный результат при сравнении теоретических и экспериментальных энергий связывания. Тем не менее такой подход следует применять с **осторожностью**.

В данной работе в ряде задач были использованы формулы 2–8–2–10 для оценки значения константы диссоциации.

2.5. Молекулярная динамика и метадинамика

2.5.1. Подготовка системы к расчетам

Для подготовки стартовых систем к расчету были использованы геометрические параметры лиганд-белковых комплексов, полученных в результате процедур молекулярного докинга с использованием протокола принудительной стыковки. Для молекулярно-динамических симуляций были рассмотрены оптимальные докинг-позиции, выбранные на основании значений энергетических параметров в совокупности с особенностями расположения лиганда в сайте связывания и природы взаимодействия с ключевыми а.о. В ряде случаев обращали внимание на значение RMSD по сравнению с референсным соединением.

Комплексы были помещены в кубическую или орторомбическую коробку с буфером от 15 до 25 Å в зависимости от размера лиганд-белкового комплекса. Коробка была наполнена водным 0.15 М раствором NaCl. Во всех случаях была использована модель воды TIP3P. Для выравнивания заряда системы были добавлены противоионы (Na^+ и/или Cl^-). Трансмембранные домены F-белка РСВ и протонного М2 канала, а также пара цистеинов С185-С186 белка р37 были помещены в вирусную мембрану модели POPC (фосфатидилхолин). Согласно [269,270] фосфатидилхолин входит в состав большинства клеточных мембран вируса. Все модели

предварительно были подвержены процедуре релаксации в течение 2 нс с целью минимизации внутренних напряжений, был использован алгоритм временного шага (RESPA integrator) с шагом 2 фс, термостат Нойзе-Хувера. Время симуляции составляло от 100 до 300 нс в зависимости от задачи. Количество анализируемых фреймов было от 3000 до 10000. Были использованы термодинамический ансамбли NPT или NPAT, если в системе присутствовала мембрана.

Для двух задач была использована методология метадинамики, позволяющая оценить значение свободной энергии Гиббса в зависимости от коллективных переменных. Для оценки степени влияния камфецина [271] на доменные движения гемагглютинаина дикого и мутантного типов гриппа (подробнее описано в разделе [3.1.4.](#)) была проведена серия симуляций в течение 300 наносекунд при 5.0 и 7.0 значениях pH среды. В качестве коллективных переменных были выбраны расстояния между пептидными цепями и двугранный угол дисульфидного мостика (C637-C8), который соединяет субъединицы гемагглютинаина HA₁ и HA₂. Влияние pH среды было учтено посредством расчёта протонированных форм аминокислотных остатков, их таутомерных форм, а также распределения парциальных зарядов по поверхности белковой структуры рецептора.

Для оценки профиля поверхности энергии Гиббса связывания разных стереоизомеров кумарина в качестве коллективных переменных были заданы расстояния от центра масс лиганда и а.о. с которыми в течение молекулярно-динамических симуляций регистрировали частые и продолжительные по времени контакты (подробнее в разделе [3.3.3.](#)).

Методы метадинамики использовались для обоснованного выбора оптимальной докинг-позиции, после процедуры молекулярного докинга. Стабильность каждой рассматриваемой докинг-позиции оценивалась на основании колебаний значений RMSD лиганда с учетом сохранения межмолекулярных контактов между атомами лиганда и окружающими а.о. Совокупной (или коллективной) переменной является RMSD лиганда начиная с геометрических параметров, соответствующих его начальному положению. Для улучшения статистики выполнялось несколько МД симуляций, результаты которых усреднялись.

2.5.2. Анализ результатов расчетов

Основным критерием корректности расчета является результат анализа среднеквадратичного отклонения положений атомов (RMSD), т. е. измерения среднего изменения положения атомов лиганда и протеина относительно геометрических параметров стартовой позиции. Расчет проводится по всем заданным (x) фреймам динамики по [формуле 2–12](#):

$$RMSD_x = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r'_i(t_x) - r_i(t_{ref}))^2}, \quad (2-12)$$

где N – количество атомов, t_{ref} – референсное время – первый фрейм вычисления, r' – положения выбранных атомов в x -ом фрейме симуляции.

Анализ RMSD показывает, уравнилась ли белковая система к концу времени симуляции. Изменение этого значения в интервале от 1 до 3 Å считается приемлемым для большинства небольших глобулярных белков. В рамках данной работы были исследованы достаточно крупные поверхностные вирусные белки, однако во всех случаях колебания RMSD не превышали 5Å. Для лиганда значение RMSD также было оценено в течение всего времени симуляции, после выравнивания его геометрических параметров в сайте связывания. Если наблюдаемые значения значительно превышают RMSD, характерные для белка, то это может свидетельствовать о том, что лиганд либо свободно перемещается в сайте связывания и его положение существенно отличается от стартовой позиции, либо лиганд и вовсе диффундирует в растворитель. В данной работе графики изменения значений RMSD для белковых систем представлены в [приложении](#).

Для характеристики оценки локальных изменений в основной белковой цепи оценивались значения среднеквадратичной флуктуации для каждого i -а.о. по [формуле 2-13](#):

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{i=1}^N \langle (r'_i(t_x) - r_i(t_{ref}))^2 \rangle}, \quad (2-13)$$

где T – время симуляции, t_{ref} – референсное время, r_i – позиция i -а.о., r' – положение атомов а.о. по сравнению с референсным положением.

Дополнительно проводился анализ по количеству межмолекулярных взаимодействий (в частности водородных связей [272]) между атомами лиганда и окружающих а.о. Взаимодействия белка и лиганда отслеживаются на протяжении всего времени симуляции. В результате строились гистограммы, в которых все межмолекулярные контакты были разделены на четыре типа: водородные связи, гидрофобные контакты, ионные (или солевые) мостики и контакты, опосредованные водой. Гистограммы накопления учитывали все возможные контакты в течение всего времени симуляции, в том числе и многочисленные. Имеется в виду, что атом лиганда может образовывать более двух контактов с группой атомов конкретной аминокислоты. Геометрические критерии регистрации водородных связей белок-лиганд соответствовали расстоянию между атомами в 2.5 Å (D–H...A, где D – донор, A – акцептор), валентный угол D–H...A $\geq 120^\circ$, а H...A–X $\geq 90^\circ$. Гидрофобные контакты включали в себя π - π стекинг, π -катион стекинг-взаимодействия на расстоянии до 4.5Å и другие неспецифические

контакты с гидрофобными а.о. на расстоянии не более 3.6 Å. Ионные взаимодействия регистрировались между заряженными группами на расстоянии 3.7 Å при условии отсутствия водородных связей. Критерии контактов, опосредованных водой, следующие: расстояние D–H·····A составляло 2.8Å, валентный угол D–H·····A равен 110°; а H·····A–X = 90°.

В ряде случаев анализ траектории молекулярно-динамических симуляций включал в себя процедуру кластеризации фреймов для получения статистически значимых лиганд-белковых комплексов и последующей оценки энергии связывания лиганда и белка. Использовалась методология, описанная в работе [273]. Кластерный анализ фреймов симуляции проводился начиная со времени уравнивания системы согласно графикам RMSD.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Ингибирующая активность малых молекул в отношении мембранных белков вируса гриппа

3.1.1. Фармакофорный профиль сайта связывания ТБГХ/умифеновира

Методология идентификации и картирования сайтов связывания может быть использована как для анализа белковых поверхностей, так и для изучения лиганд-белкового комплекса. В последнем случае использование методологии позволяет описать полость связывания лиганда с учетом его влияния на размер этой полости, расположения окружающих а.о. и конформацию их боковых цепей. Согласно анализу структурных особенностей гемагглютинаина вируса гриппа в комплексах с ТБГХ (PDB код 3EYM) и арбидолом (PDB код 5T6N), расшифрованными экспериментальными методами, и на основании результатов процедуры молекулярного ре-докинга, ингибиторы связываются между короткой α -спиралью одного и длинной α -спиралью другого протомера гликопротеина (рисунок 3–1А).

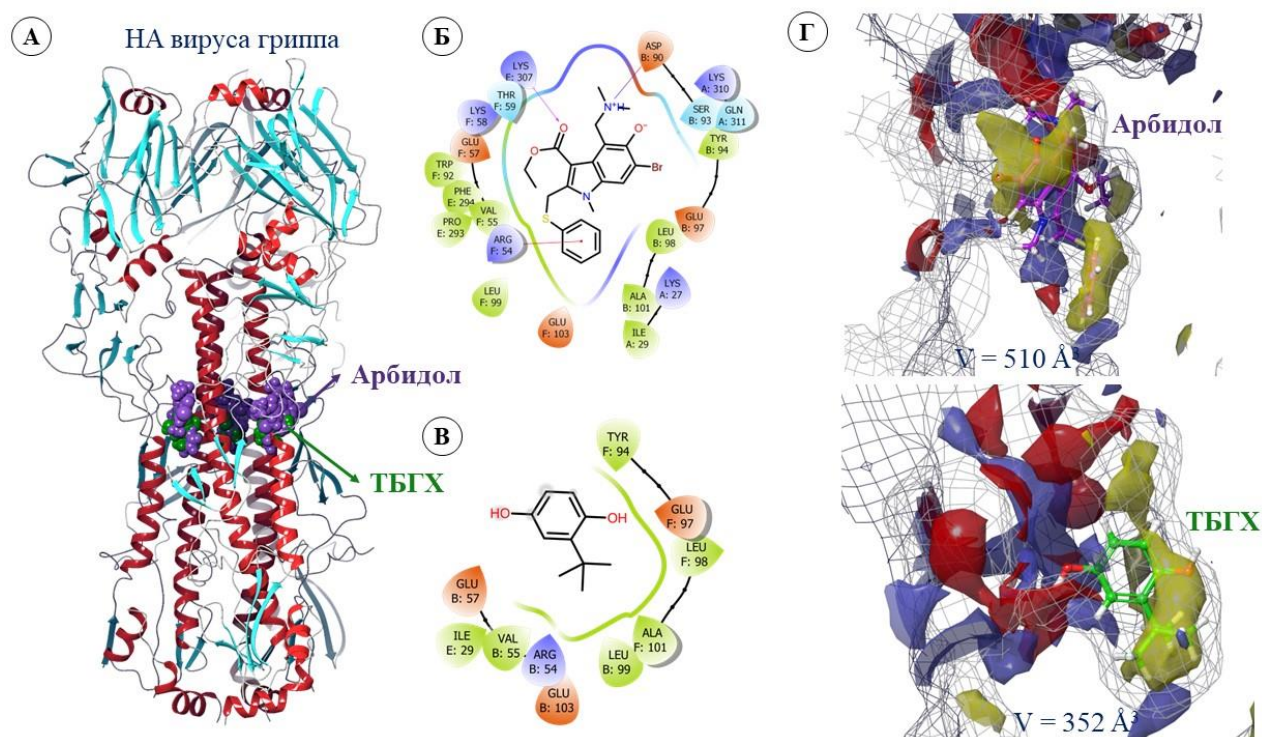


Рисунок 3-1 – Аннотирование сайтов связывания ТБГХ/умифеновира в НА вируса гриппа: А – третичная структура НА вируса гриппа штамма A/Aichi/2/1968 (H3N2) (PDB код 3EYM [28]); Б, В – аминокислотное окружение арбидола и ТБГХ в сайте связывания: гидрофобные а.о. окрашены в зеленый цвет, положительно и отрицательно заряженные – в фиолетовый и оранжевый соответственно, голубым цветом показаны полярные а.о. Г – картирование сайтов связывания: области предпочтительные для гидрофобных контактов окрашены в желтый цвет, для донорно-акцепторных – в синий и красный цвета.

Расположение умифеновира в сайте связывания сопровождается формированием водородной связи между кислородом эфирной группы и K2307, солевого мостика между протонированной аминогруппой и D290 и π -катион стекинг-взаимодействие между ароматическим кольцом лиганда и атомом боковой цепи R254 (рисунки 3–1Б). Связывание ТБГХ сопровождается, в основном, гидрофобными контактами с окружающими его а.о. (рисунки 3–1В). Несмотря на то, что оба соединения располагаются примерно в одной области поверхностного гликопротеина, фармакофорный профиль полостей связывания несколько различается. В обоих сайтах в равной степени преобладают гидрофобные и донорно-акцепторные области (рисунки 3–1Г). Баллы (таблица 3–1), присвоенные обоим сайтам, превышают 1 и близки к значению балла, присвоенному сайту №3, определенному ранее и описанному в разделе 2.3. Размеры и объемы сайтов фактически зависят от расположенного внутри них лиганда, ввиду его влияния на окружающие а.о. сайта. Сайт №3 без лигандов представляет собой небольшую полость, которая может увеличиваться в зависимости от размеров лиганда. Это наблюдение может быть важным при создании новых соединений на основании фармакофорного профиля рассматриваемого сайта связывания. Сайт ТБГХ более гидрофобный, значение «баланс» близко к значению, характеризующему сайт №3, в то время как донорно-акцепторные составляющие примерно равны, и, в отличие от сайта №3, близки к 1.

Таблица 3-1 – Физико-химические дескрипторы сайтов связывания ТБГХ/умифеновир.

Сайт	Балл сайта	Размер сайта	Объем, Å ³	Баланс	Донор/акцептор	Место расположения в протеине *
Сайт №3 **	1.117	131	269.3	1.097	2.566	Полость рядом с петлей, соединяющей короткую и длинную α -спирали: а.о. HA ₁ – 293, 274, 305–307, 310–311; HA ₂ – 55–59, 90–99 (рисунки 2–1)
Сайт ТБГХ	1.111	163	352.3	1.193	1.071	Между двумя субъединицами: HA ₁ : 27–29, 291–294, 307–314; HA ₂ : 51–60, 92–103 (рисунки 3–1).
Сайт Арбидола	1.116	300	510.7	0.708	1.125	Между двумя субъединицами: HA ₁ : 27–29, 291–294, 307–314; HA ₂ : 51–60, 92–103 (рисунки 3–1).
* аминокислотная последовательность соответствует штамму вируса гриппа A/Aichi/2/1968 (H3N2) (PDB код 3EYM [28])						
** сайт, найденный при анализе всего белка гемагглютинина (таблица 2–1).						

Другими словами, применение методологии идентификации SiteMap позволило достаточно достоверно определить область связывания ингибиторов, расположенную в месте пептида слияния. Анализ расчетов позволяет ответить на вопрос, какими фармакофорными

признаками и структурными дескрипторами должны обладать малые молекулы для связывания в рассматриваемой полости белка. Учитывая размеры сайта, потенциальный лиганд должен содержать от 45 до 150 атомов, включая атомы водорода. Желательно наличие гидрофобных групп и групп, в равной степени являющихся донорами и акцепторами водородных связей. Фармакофорный профиль сайтов связывания, расположенных в гемагглютининовых разных типа, различается ввиду различия в а.о., входящих в рассматриваемую полость ([рисунок 3–2А](#)).

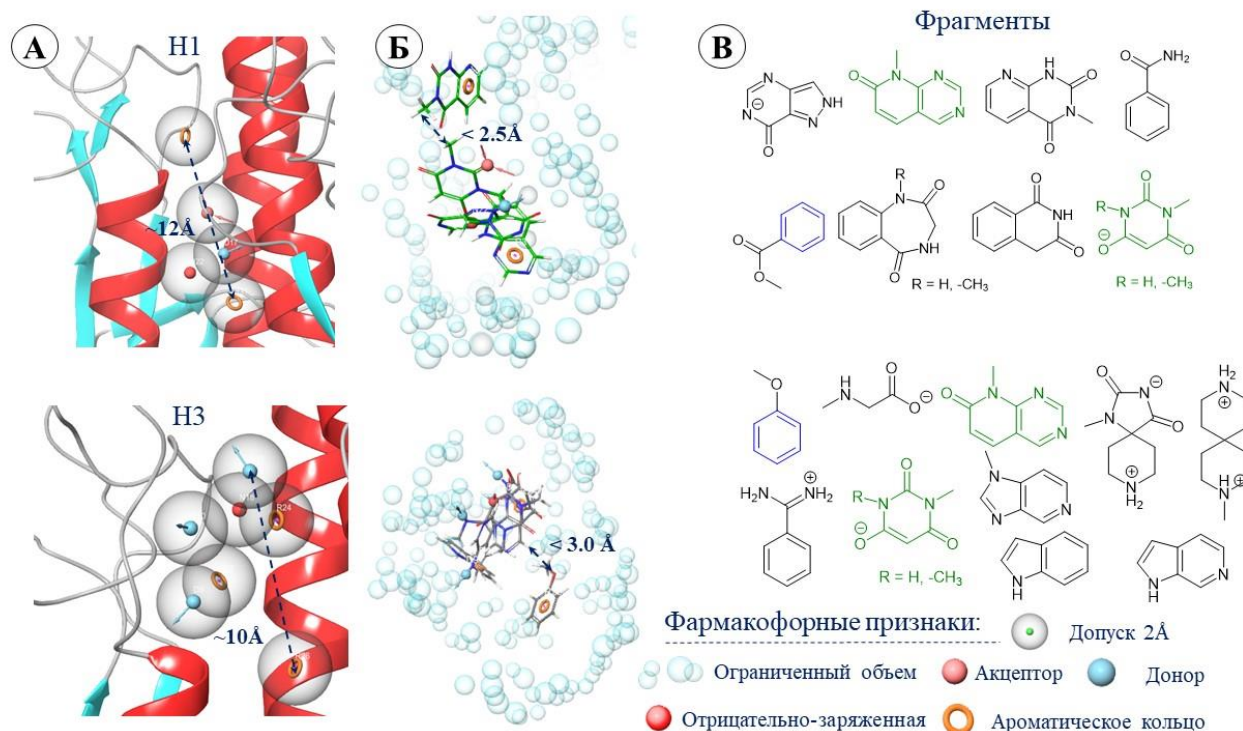


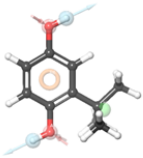
Рисунок 3-2 – Анализ сайтов связывания ингибиторов НА: А – фармакофорный профиль сайта связывания НА подтипа Н1 и Н3; Б – структурные дескрипторы вероятного лиганда с наложением фармакофорного профиля сайта связывания; В – структурные дескрипторы, которые должны присутствовать в «идеальном» лиганде.

Так, для НА 1-подтипа (Н1) сайт связывания подходит для лиганда, содержащего как минимум два ароматических кольца, донорно-акцепторную группу и отрицательно заряженный фрагмент. Для НА 3-го подтипа (Н3) лиганд также должен содержать ароматические группы, отрицательно заряженный фрагмент и до трех групп, доноров водородной связи. При этом максимальное расстояние между двумя удаленными фармакофорными признаками в обоих случаях превышает 10Å. Различия в фармакофорных признаках сайтов разных подтипов гемагглютининов объясняются разной аминокислотной последовательностью: в положениях аминокислот 52, 54, 59, 93, 101, 105 и 106 наблюдаются следующие замены V52L; S54R; M59T; T93S; E105Q; L101A; R106H. Ввиду удаленности основных фармакофорных признаков друг от друга, при конструировании лиганда возможно присутствие линкера, связывающего основные группы молекулы, длина линкера в обоих случаях **не должна** превышать 3Å ([рисунок 3–2Б](#)). На

основании данных фармакофорных профилей были сгенерированы основные структурные фрагменты, которые должен содержать лиганд. В основном это ароматические циклы, гетероцилические фрагменты и спиро-циклы, amino- и сложноэфирные группы (рисунок 3–2В).

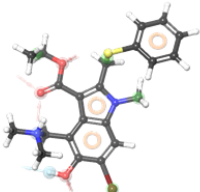
Таким образом, анализ полости связывания, расположенной между короткой и длинной α -спиралями гептадного повтора гемагглютинаина позволяет сделать вывод, что молекулы, обладающие следующими характеристиками: сравнительно небольшой (не более 150 атомов) размер, наличие не менее двух доноров и не менее одного акцептора водородных связей, не менее двух ароматических групп, не менее одного отрицательно заряженного и гидрофобного фрагмента, могут связываться в описанном сайте связывания. В рамках данной работы было проверено, как эти признаки согласуются с описанными в литературном обзоре известными ингибиторами НА [53–56] (рисунок 3–3).

ТБГХ

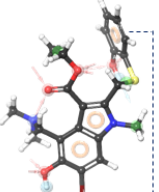


7
 $IC_{50} \sim 6.0 \mu M$

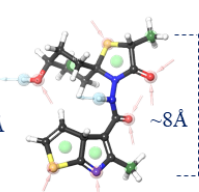
умифеновир/арбидол



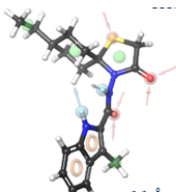
8
 $IC_{50} = 6.2 - 26.0 \mu M$



9
 $\sim 11 \text{ \AA}$



10
 $IC_{50} = 7.5 \mu M$
 $\sim 8 \text{ \AA}$



11
 $IC_{50} = 0.0012 \mu M$
 $\sim 11 \text{ \AA}$

Соединение	«Идеальный кандидат»	7	8	9	10	11
Кол-во атомов	40-150	26	55	56	46	51
AlogP	×	2.70	3.64	3.37	0.47	4.27
Донор ВС	> 2	2	1	2	2	2
Акцептор ВС	> 2	2	3	4	6	3
Отрицательно-заряженные	> 1	0	0	0	0	0
Положительно-заряженный	0	0	1	1	0	0
Гидрофобные	> 1	1	4	4	6	5
Ароматические кольца	> 2	1	3	3	0	2

Рисунок 3-3 – Набор структурных дескрипторов и фармакофорных признаков ингибиторов НА, связывающихся в сайте связывания ТБГХ/умифеновир.

Все рассматриваемые ингибиторы **7–11** частично соответствуют требуемому набору фармакофорных признаков. Так, ТБГХ «не проходит» по количеству атомов, ни в одном из соединений **7–11** нет отрицательно заряженных фрагментов, и в каждом из рассматриваемых соединений присутствуют от 1 до 6 гидрофобных групп. Максимальное удаление фармакофорных групп друг от друга не превышает $11 \text{ \AA}$ (рисунок 3–3). Тем не менее, в научной литературе показано, что механизм противовирусной активности соединений **7–11** связан с подавлением фузогенной активности гемагглютинаина [53–56].

Описание фармакофорного профиля сайта связывания – это одна из возможностей предположить, какие структурные дескрипторы должны присутствовать в подходящем или «идеальном» лиганде. Этот инструмент можно использовать как минимум в двух случаях: в самом начале пути поиска ингибитора поверхностного гликопротеина, причем нацеленного на связывание именно в области пептида слияния между двумя ключевыми α -спиралями, и/или в случае структурной модификации уже синтезированного соединения для улучшения его аффинности к сайту связывания. Второй вариант встречается в научной литературе нечасто, первый – практически никогда.

3.1.2. Оценка аффинности малых молекул к сайту связывания ТБГХ/умифеновира [274–276]

Анализ литературных данных и фармакофорного профиля сайта связывания ТБГХ/умифеновира позволяет сделать вывод об ограничении размеров молекулы с одной стороны, и достаточно большом структурном разнообразии известных ингибиторов с другой. В данном разделе описаны задачи, которые заключались в оценке аффинности потенциальных ингибиторов к данному сайту связывания, с целью описания механизма их противовирусного действия. Ряд синтезированных соединений были проверены в отношении активности против ряда штаммов вируса гриппа: были оценены значения полумаксимальной концентрации ингибирования вируса (IC_{50}), цитотоксичности (CC_{50}) и индекса селективности (SI). Индекс селективности является определяющим для выбора соединения-лидера, которое потом исследуется в эксперименте по времени добавления. Результаты эксперимента могут свидетельствовать о том, что в качестве потенциальной биологической мишени может рассматриваться гемагглютинин, так как противовирусные агенты ингибируют репликацию вируса на начальных стадиях его жизненного цикла.

3.1.2.1. Описание механизма противовирусной активности полученных из изопулегола замещенных октагидро-2Н-хромен-4-олов [274] и агентов на основе бензо[d][1,3]дитиолового скаффолда [275]

В отделе медицинской химии НИОХ СО РАН был синтезирован ряд замещенных октагидро-2Н-хромен-4-олов, производных изопулегола (рисунки 3–4). Соединения проявляют противовирусную активность против вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1). Диапазон значений IC_{50} составляет от 7.5 до 1327.4 μM , индекс селективности – от 1 до 189.

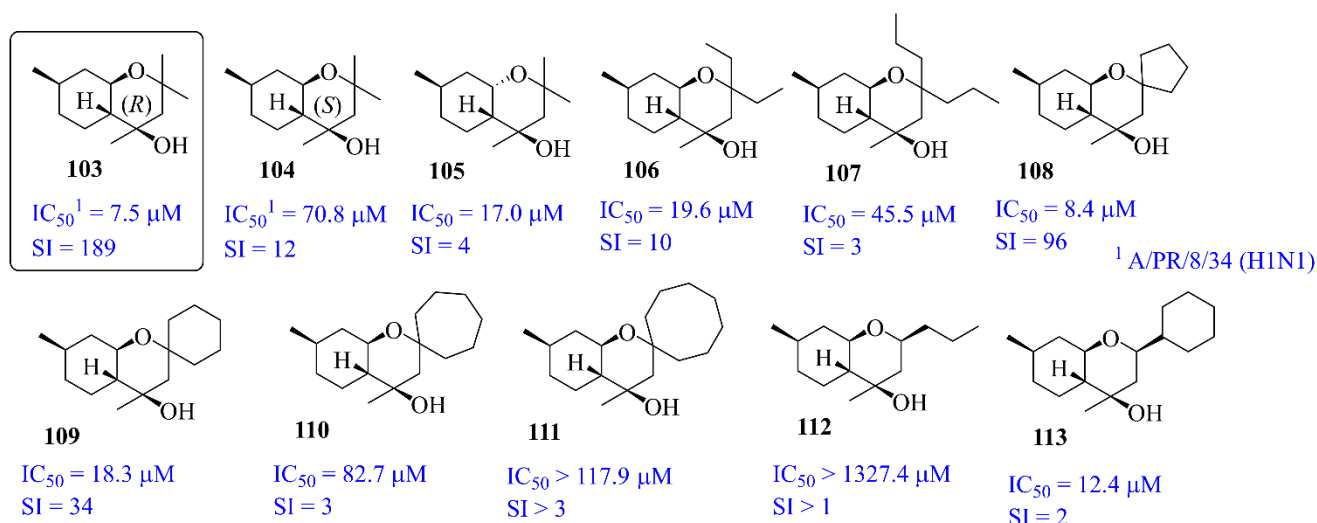


Рисунок 3-4 – Полученные из изопулегола замещенные октагидро-2H-хромен-4-олы активные в отношении вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1).

Тестирование соединения-лидера (**103**, [рисунок 3-5А](#)) в отношении других штаммов вируса гриппа показало выраженную активность против штаммов A/California/07/09 (H1N1) pdm09 и A/Singapore/1/57 (H2N2)) со значением SI в более 1500 единиц, что несомненно свидетельствует о перспективности данной структуры. Эксперименты по времени добавления показывают, что агент **103** подавляет репликацию вируса в первые часы заражения, что позволяет рассматривать гемагглютинин (НА) в качестве потенциальной биологической мишени. Кроме того, анализ биологических экспериментов позволяет сделать вывод, что соединение-лидер **103** ингибирует НА первой группы (H1 и H2) и не активно против НА второй группы (H3 и H7). С учетом этого задача сводится к обоснованию выбора потенциального сайта связывания и оценке аффинности к нему соединений **103–113**.

В 2018 году для подобных задач использовали кристаллографические данные комплекса НА с ТБГХ [28]. Другие сайты связывания не рассматривались, так как не был детально описан и визуализирован механизм конформационных перегруппировок гемагглютиниона [10] ([рисунок 1-5](#)). Тем не менее, в рамках данной задачи была использована методология идентификации и картирования полостей связывания SiteMap для поиска иного сайта связывания. Найденное место связывания представляет собой небольшую гидрофобную полость, расположенную в центре между тремя тримерами белка. Возможно ли, что связывание низкомолекулярного агента в этой части белка может затруднить конформационные перегруппировки? Едва ли. Структурные перестройки белка затрагивают короткую и длинную α -спирали гептадных повторов каждого протомера. Другими словами, структура НА «раскрывается» как бутон. При этом малая молекула может продолжать находиться внутри тримера и не оказывать заметного влияния на данный процесс.

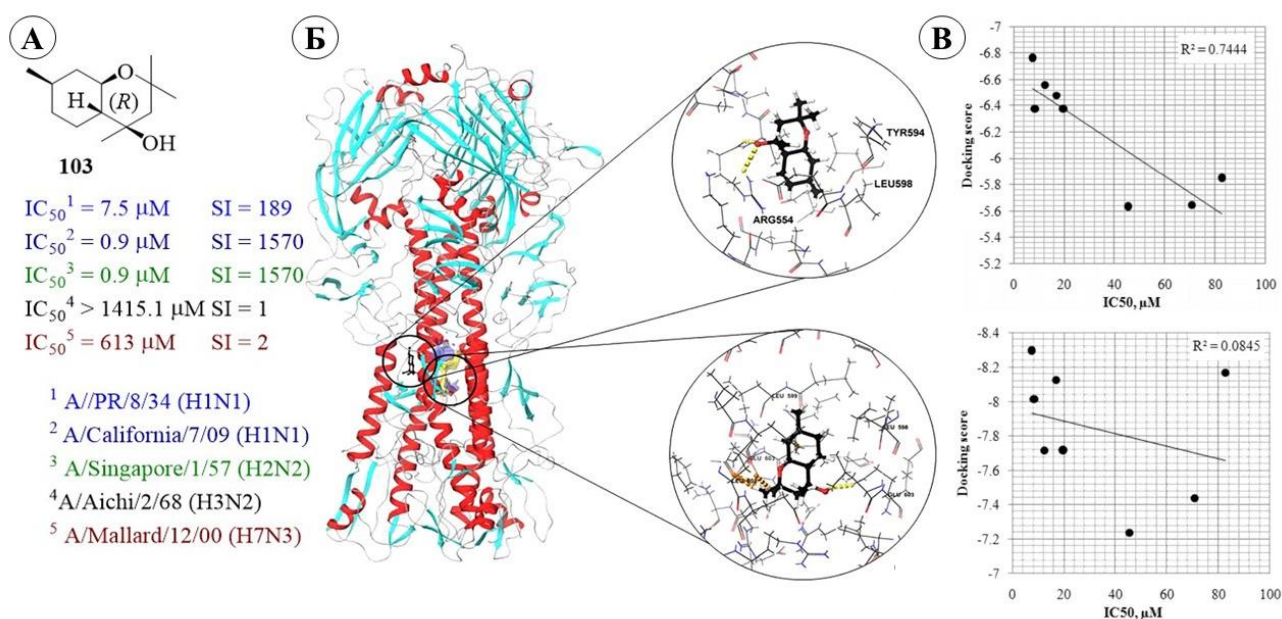


Рисунок 3-5 – Оценка сродства агентов **103-113** к сайтам связывания в НА: А – структура и противовирусная активность соединения-лидера **103**; В – расположение **103** в ТБГХ-сайте и альтернативном сайте НА [274]. Нумерация а.о. гликопротеина соответствует PDB коду 1RU7.

Аффинность исследуемых соединений была оценена к обоим сайтам связывания с использованием протокола принудительного докинга. Позиции были ранжированы по значению энергетических параметров, характеризующих аффинность исследуемых лигандов и величин IC_{50} (рисунок 3–4). Поиск зависимости между данными биологических экспериментов и результатов молекулярного докинга был проведен с целью выбора вероятного места связывания. Вопрос, можно ли строить корреляционные зависимости значений IC_{50} или pIC_{50} от значений docking score, подробно обсуждается в разделе 2.4.3. При связывании агентов **103–113** в сайте связывания ТБГХ/арбидола наблюдается зависимость значений docking score от IC_{50} : соединения, которые ингибируют вирус гриппа в меньших концентрациях, характеризуются низкими значениями энергетических параметров, в то время как агенты с высокими величинами IC_{50} связываются в ТБГХ-сайте с высокими значениями docking score. Какая-либо зависимость между IC_{50} и docking score при связывании соединений в альтернативном сайте отсутствует. Таким образом, можно предположить, что исследуемые агенты **103–113** могут ингибировать гемагглютинин вируса гриппа, связываясь в области пептида слияния в сайте связывания ТБГХ/умифеновира. Совокупный анализ результатов биологического эксперимента и процедуры молекулярного докинга позволяют предположить, что полученные из изопулегола замещенные октагидро-2*H*-хромен-4-олы замещенные проявляют активность в отношении вируса гриппа за счет подавления фузогенной активности поверхностного гликопротеина.

Противовирусные агенты (**114–122**) на основе бензо[*d*][1,3]дитиолового scaффолда (рисунок 3–6) проявляют противовирусную активность в отношении штамма вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 [275]. Два соединения лидера (**116**, **118**) ингибируют репликацию вируса в микромолярных концентрациях. Однако ввиду высокой токсичности данных соединений, индекс селективности невысокий. Тем не менее, для выбора потенциальной биологической мишени и описания механизма противовирусной активности агентов **114–122**, для соединения лидера **118** провели эксперимент по времени добавления. Согласно результатам, агент **118** ингибирует репликацию вируса в первые часы заражения, что позволяет рассматривать поверхностный гликопротеин вируса в качестве потенциальной биологической мишени. Дополнительные *in vitro* тесты показали, что соединение **118** не влияет на рецептор-связывающую активность гемагглютинаина, однако подавляет его фузогенную активность. Таким образом, в качестве потенциальной биологической мишени может быть рассмотрен гемагглютинин вируса гриппа, а в качестве потенциального места связывания сайт связывания ТБГХ/умифеновира.

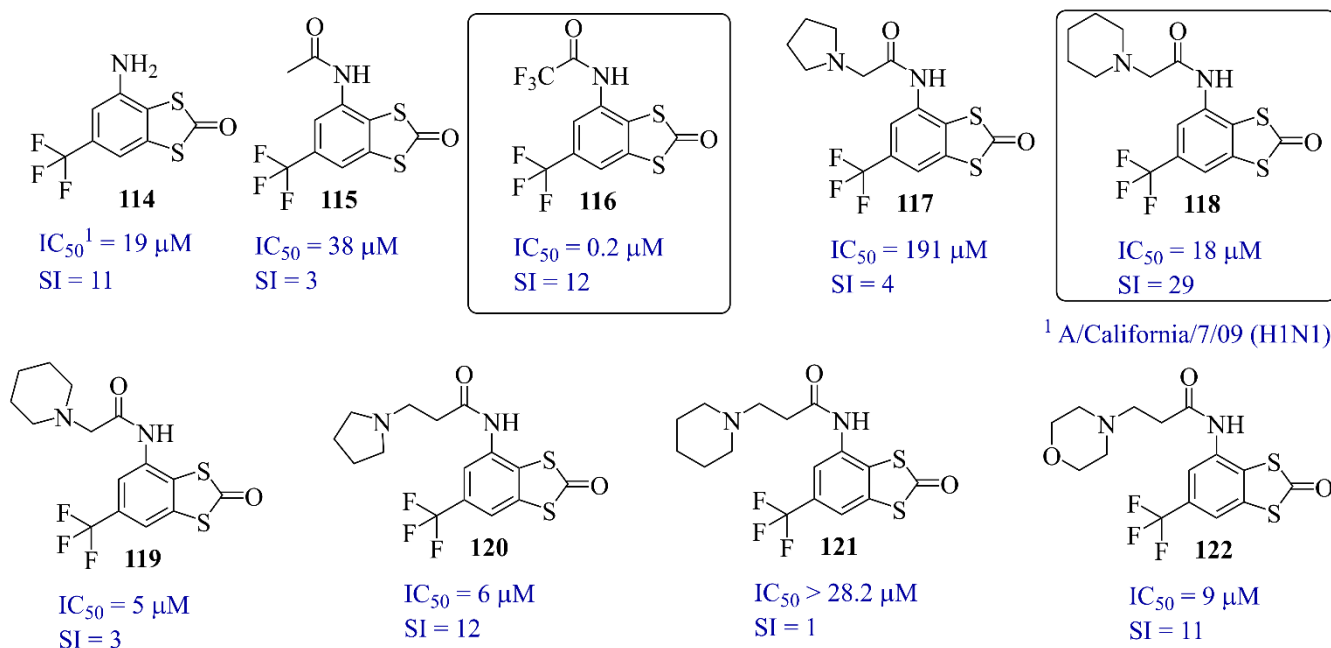


Рисунок 3-6 – Противовирусные агенты на основе бензо[*d*][1,3]дитиолового scaффолда

Для соединений **114–122** была проведена процедура молекулярного докинга в сайт связывания ТБГХ, расположенного между короткой и длинной α -спиралями гептадного повтора белка. Наличие зависимости между результатами молекулярного докинга и тестами *in vitro* может быть использовано в качестве дополнительного доказательства выбранной биологической мишени. Был построен график линейной зависимости значений обратного логарифма IC_{50} (pIC_{50}) от параметра гибкой стыковки docking score (рисунок 3–7А). Для построения зависимости из ряда докинг-решений были выбраны оптимальные по совокупности

данных энергетических параметров стыковки и расположения лигандов в сайте связывания. Были учтены межмолекулярные взаимодействия между атомами лигандов и а.о. сайтов связывания.

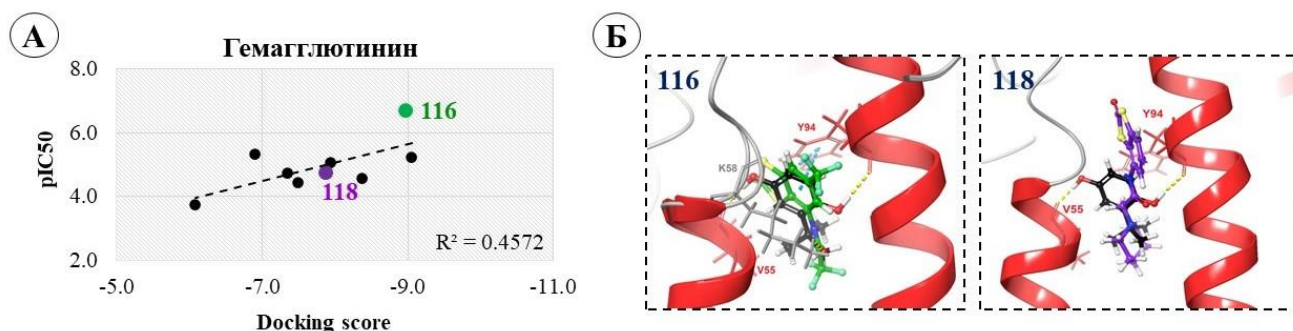


Рисунок 3-7 – Результаты молекулярного докинга агентов **114-122** в ТБГХ-сайт НА: А – корреляция результатов биологических экспериментов и теоретических расчетов; Б – расположение соединений лидеров **116** и **118** в сайте связывания ТБГХ/арбидола: желтой прерывистой линией показаны водородные связи, голубой прерывистой линией показано π-π стекинг-взаимодействие.

Соединения лидеры **116** и **118** располагаются между двумя α-спиралями гептадного повтора НА с образованием водородных связей с Y₂₉₄ и V₂₅₅ (рисунок 3–7Б). При связывании агента **116** наблюдается формирование π-π стекинг-взаимодействия между ароматическими кольцами лиганда и тирозина в положении 94 (Y₂₉₄). Таким образом, анализ результатов биологических экспериментов в совокупности с теоретическими расчетами позволяет сделать вывод, что соединения **114–122**, вероятно, связываются в сайте связывания ТБГХ и тем самым могут подавлять фузогенную активность поверхностного гликопротеина вируса гриппа.

Описанные в данном разделе две группы противовирусных агентов **103–113** и **114–122** относятся к разным химическим соединений. Тем не менее, совокупный анализ биологических экспериментов и результатов гибкого молекулярного докинга позволяет предположить, что механизм противовирусной активности данных соединений, вероятно, связан с ингибированием входа вируса в клетку. Агенты могут повлиять на конформационные перестройки гемагглютинирина, снижая его фузогенную активность, и препятствуя слиянию вирусной и клеточной мембран.

3.1.2.2. Описание механизма противовирусной активности полученных из изопулегола F- и ОН-содержащих октагидро-2H-хроменов [276]

Ряд F- и ОН-содержащих октагидро-2H-хроменов, полученных из изопулегола проявляют умеренную противовирусную активность против вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1) [276]. Результаты биологических экспериментов по времени добавления для соединений-лидеров (**123**, **124**) и оценки их влияния на фузогенную активность гемагглютинирина

позволяют предположить, что механизм противовирусной активности исследуемых соединений, по-видимому, связан с ингибированием поверхностного гликопротеина вируса гриппа. Вещества **123** и **124** представляют собой смесь стереоизомеров в разных соотношениях (рисунок 3–8А). Все биологические эксперименты были проведены с использованием смеси стереоизомеров. Между тем, как уже было показано выше в случае соединений **103** и **104** (рисунок 3–4А), стереоизомеры могут проявлять разную противовирусную активность. Другими словами, из рассматриваемых пар стереоизомеров агентов **123** и **124** одно может быть более активным в отношении вируса, а другое - менее. Учитывая различия в геометрических параметрах стереоизомеров, можно предположить, что аффинность к сайту связывания ТБГХ/умифеновира в гемагглютинине и расположение стереоизомеров в нем будут различаться. Для соединений **123** и **124** была проведена процедура гибкого докинга в ТБГХ-сайт связывания. В таблице 3–2 рассматриваются значения энергетических параметров, характеризующих аффинности лигандов к сайту связывания, а именно, значения балла стыковки (docking score) и значения балла принудительной стыковки (IFD score), позволяющего оценить общую энергию лиганд-белковых комплексов. Анализ результатов молекулярного докинга позволяет предположить, что в обоих случаях более активен R-изомер. Докинг S-стереоизомера **123** не увенчался успехом (таблица 3–2). Вероятно, данная полость белка не подходит для связывания S-**123**. Оба стереоизомера агента **124** связываются в области пептида слияния белка, при этом аффинность S-**124** меньше к сайту связывания, чем S-**124**.

Таблица 3-2 – Результаты молекулярного докинга агентов **123**, **124** в ТБГХ-сайт связывания НА штамма A/PR/8/34 (H1N1).

Соединение	R-изомер			S-изомер		
	Docking score, ккал/моль	IFD score, ккал/моль	Взаимодействие с а.о.	Docking score, ккал/моль	IFD score, ккал/моль	Взаимодействие с а.о.
123	-10.0	-3041.6	K558 – π -катион стекинг K551 – водородная связь	×	×	×
124	-9.5	-3038.5	S554 – водородная связь	-8.5	-3036.4	Только гидрофобные

В случае соединения **123** соотношение R- и S-изомеров составляет 10 к 1, а в случае агента **124** соотношение смещено в сторону S изомеров и составляет 1 к 4 (рисунок 3–8А). Средневзвешенное значение (т. е. с учетом соотношения R и S изомеров) параметра стыковки (docking score), характеризующие сродство вещества **124** к сайту связывания, позволяет отметить, что в целом аффинность агента **124** к гемагглютинуину выражена в меньшей степени, чем аффинность соединения **123** (рисунок 3–8Б). Этот результат находится в согласии с

данными противовирусной активности: агент **123** ингибирует репликацию вируса гриппа в меньшей, чем агент **124**, концентрации.

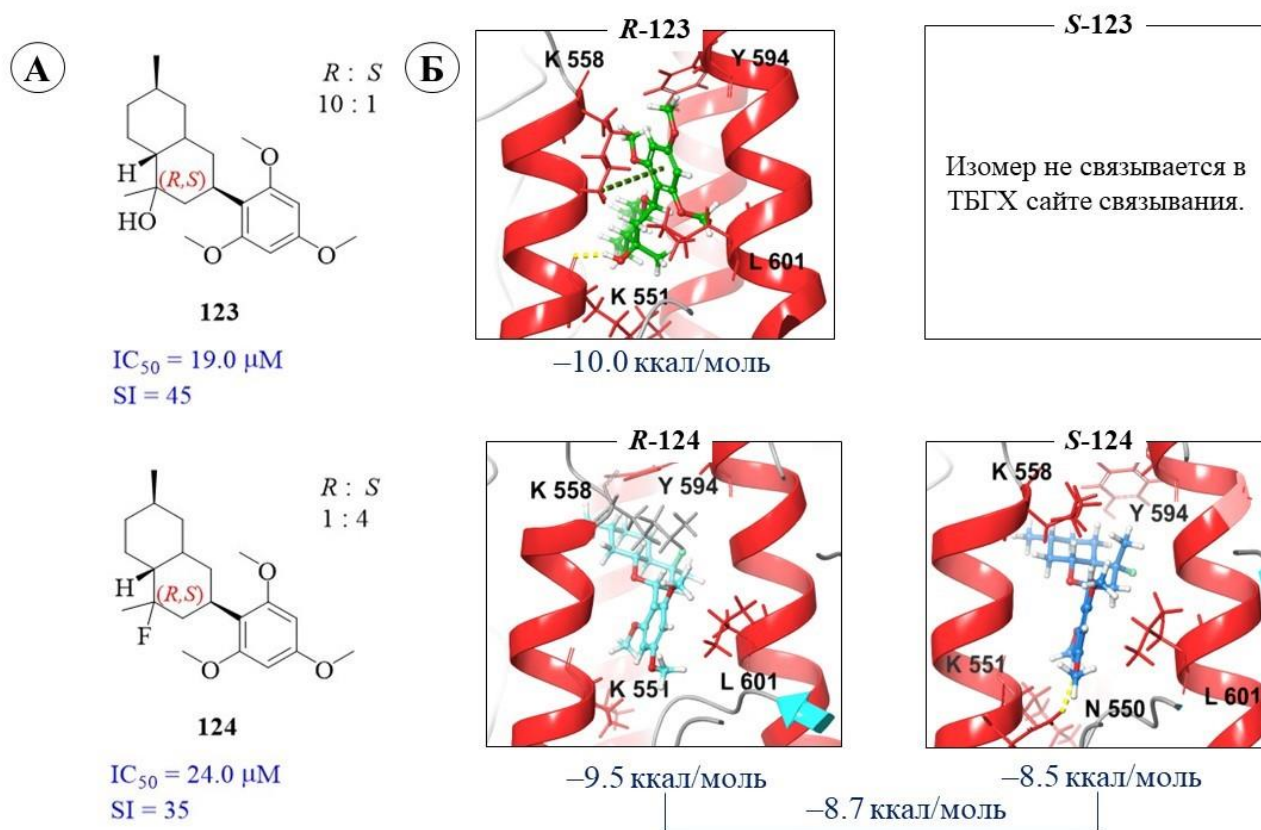


Рисунок 3-8 – Противовирусная активность агентов **123** и **124** в отношении вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1) и результаты процедуры молекулярного докинга соединений в ТБГХ-сайт связывания: А – структуры и значения IC_{50} ; Б – расположение в сайте связывания: водородные связи показаны желтыми прерывистыми линиями, π -катион стекинг-взаимодействие – зеленой прерывистой линией. Цифрами указаны значения параметры стыковки (docking score). Для соединения **124** было оценено средневзвешенное значение данного параметра.

R-изомер агента **123** связывается между двумя α -спиралями гептадного повтора НА с образованием водородной связи между водородом ОН-группы лиганда и кислородом К₂554, и π -катион стекинг-взаимодействие между ароматическим кольцом лиганда и положительно заряженным лизином в положении 558 (К₂558). Расположение R-стереоизомера лиганда **124** характеризуется гидрофобными взаимодействиями, S-изомер образует водородную связь между водородом одного из метильных заместителей и кислородом N₂550. Таким образом, анализ результатов биологических экспериментов и процедуры молекулярного докинга позволяют предположить, что механизм противовирусной активности агентов **123** и **124** связан с подавлением фузогенной активности гемагглютинаина. При этом можно предположить, что R-стереоизомеры вносят больший вклад в значения противовирусной активности, чем S-стереоизомеры.

3.1.2.3. Аффинность других малых молекул к сайту связывания ТБГХ/умифеновира

Ряд малых молекул, содержащих жесткий гидрофобный скаффолд, проявляют выраженную противовирусную активность в отношении ряда штаммов вируса гриппа. Согласно данным биологических экспериментов (эксперимент по времени добавления, оценка антифузогенной активности) и результатам молекулярного моделирования соединения, представленные на [рисунке 3–9](#) могут связываться в области гептадных повторов гемагглютинаина и ингибировать его конформационные перестройки [271,277–279].

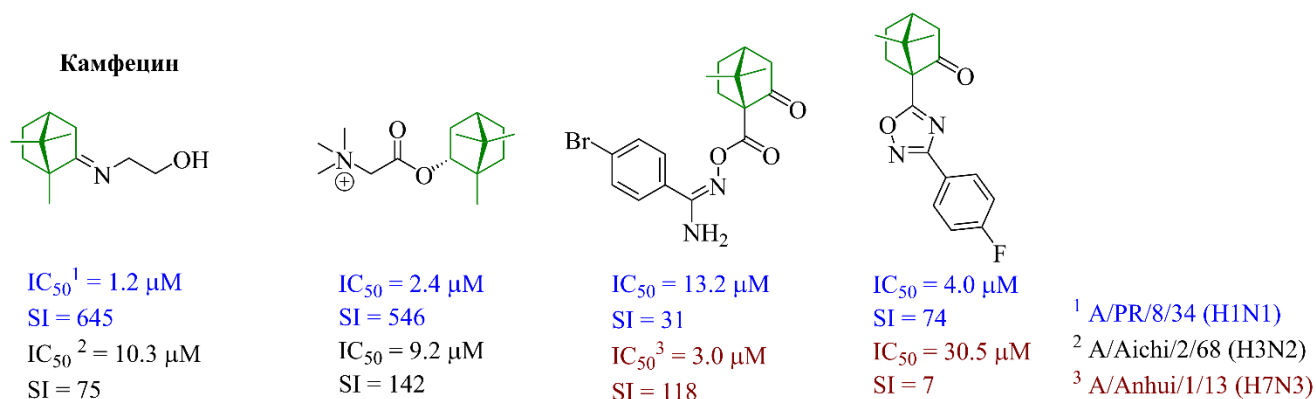


Рисунок 3-9 – Ингибиторы поверхностного гликопротеина вируса гриппа: зеленым цветом показан жесткий гидрофобный норборнанный скаффолд.

Однако более подробный анализ поверхности гемагглютинаина вируса гриппа, а также результат секвенирования гена гликопротеина в резистентных штаммах вируса, позволяют предположить, что представленные соединения дополнительно могут связываться в альтернативных полостях белка. Подробно это обсуждается в следующей главе.

3.1.3. Оценка аффинности малых молекул к альтернативным сайтам связывания [271,277–281]

3.1.3.1. Описание механизма противовирусного действия камфецина [271,277] и его аналогов

3.1.3.1.1. Где связывается Камфецин?

В 2015 году авторы работ [282,283] сообщили о новом соединении **125**, синтезированном на основе (+)-камфоры и содержащем природный бициклический фрагмент и полярный заместитель, названное впоследствии камфецином. Камфецин проявляет выраженную противовирусную активность против различных штаммов вируса гриппа, в том числе и пандемического штамма A/California/07/09 (H1N1)pdm09. Заявленный индекс селективности равен 503 единицам, что в 10 раз превышает значение, характерное для соединений содержащих жесткий фармакофорный каркас: римантадина, амантадина и дейтифорина ([рисунке 3–10](#)). Эксперименты по времени добавления показали, что наибольшую противовирусную активность

камфецин проявляет в первые часы заражения, т. е. на ранних стадиях вирусной репликации. Этот результат предполагает, что вероятными биологическими мишенями противовирусного действия камфецина могут быть протонный M2 канал и/или гемагглютинин вируса гриппа. В пользу протонного канала свидетельствует наличие жесткого гидрофобного каркаса у камфецина, по аналогии с римантадином, амантадином и дейтифорином (рисунок 3–10). Согласно публикациям [194,284,285] противовирусное действие данных препаратов связано, прежде всего, с блокированием именно M2 канала. Тем не менее, согласно опубликованной работе [283], камфецин подавляет фузогенную активность НА вирусов гриппа типа А и В, что также позволяет рассматривать этот белок в качестве потенциальной биологической мишени. Тогда совокупность подобных рассуждений позволяет рассматривать камфецин в качестве потенциального ингибитора НА с одной стороны и M2 канала с другой. В рамках данной работы будут рассмотрены обе мишени. Но, учитывая результаты биологических экспериментов, НА будет рассмотрен в первую очередь.

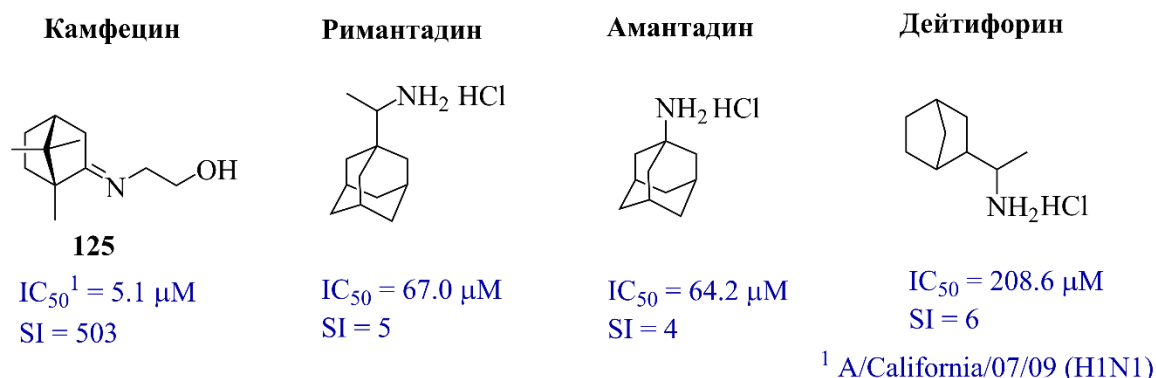


Рисунок 3-10 – Соединения, проявляющие активность против вируса гриппа.

В самом начале работы по описанию механизма противовирусной активности камфецина необходимость в поиске альтернативного сайта связывания не возникала. Структурные и фармакофорные особенности камфецина, а именно наличие гидрофобной части и полярного заместителя, позволяют рассматривать сайт связывания ТБГХ/умифеновира как единственно возможный. Аффинность камфецина к сайту связывания соизмерима с энергетическими характеристиками связывания ТБГХ (рисунок 3–11). Расчеты были проведены с использованием протокола квантово-химического (QM) докинга, т. е. геометрические параметры лиганда оптимизировались DFT методом с учетом влияния на его структуру окружающих а.о. Для анализа и ранжирования результатов докинга рассматривались 10 различных докинг-позиций. Результаты расчетов позволяют предположить, что камфецин может проявлять выраженную противовирусную активность за счет связывания в месте пептида слияния, между двумя короткой и длинной α -спиралями, влияя на конформационные перегруппировки белка (рисунок 3–11).

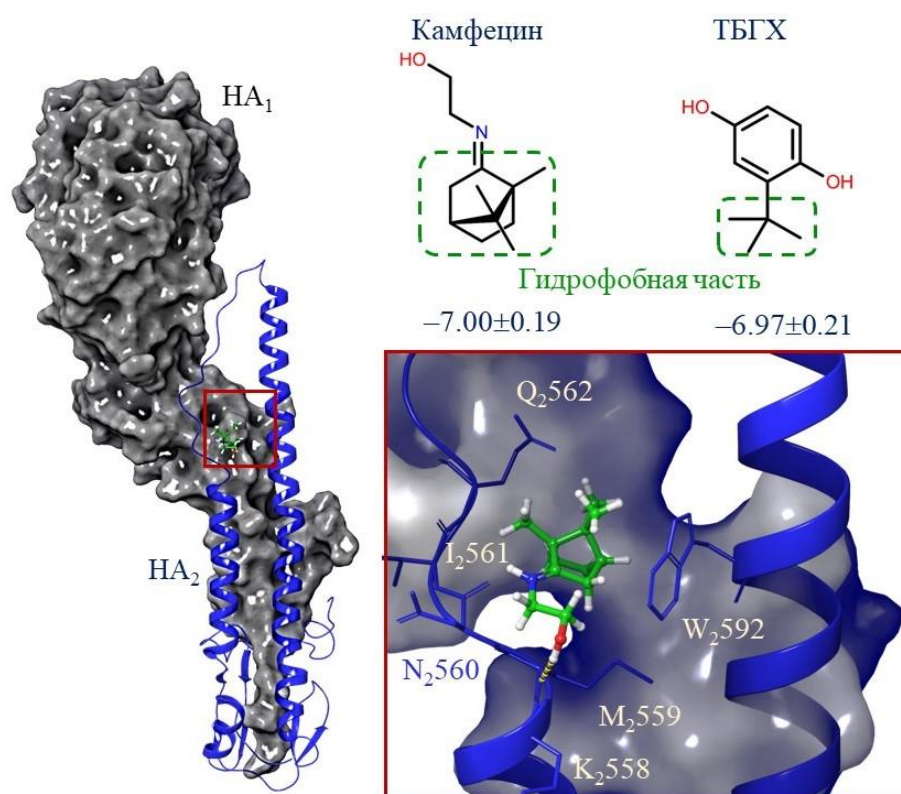


Рисунок 3-11 – Результаты молекулярного QM докинга камфецина в TBGX-сайт связывания гемагглютиниона, соответствующего штамму A/PR/8/34 (H1N1) (PDB код 1RU7 [20]). Цифрами указаны энергетические параметры (E_{bind}), характеризующие аффинность камфецина к сайту связывания. Водородная связь показана желтой прерывистой линией.

Согласно результатам *in vitro* тестов, ингибирующая активность камфецина в отношении трех рассмотренных штаммов вируса гриппа различается. Энергетические параметры, характеризующие аффинность агента **125** к TBGX-сайту связывания гемагглютининов разных типов (а именно H1, H3 и H5) также различаются (таблица 3–3). Значения E_{bind} и QM-Emodel при связывании камфецина в полости HA, соответствующего штамму A/H1N1, минимальные, что может свидетельствовать о более высоком сродстве лиганда к белку H1. Также камфецин ингибирует репликацию вируса гриппа данного штамма в меньших концентрациях, чем штаммы A/H3N2 и A/H5N1. Таким образом, результаты молекулярного моделирования находятся в согласии с экспериментальными данными.

Таблица 3-3 – Результаты процедуры молекулярного QM-докинга камфецина в сайт связывания TBGX трех штаммов вируса гриппа.

Штамм вируса гриппа	IC ₅₀ , μM	SI	E _{bind} , ккал/моль	QM-Emodel	Взаимодействие с а.о. (для лучшей докинг-позиции)
A/PR/8/34 (H1N1)	1.2±1.2	645	-7.00±0.19	-58.47±1.59	K ₂₅₅₈ – водородная связь
A/Aichi/2/68 (H3N2)	10.3±1.1	75	-6.71±0.34	-50.34±0.28	Только гидрофобные
A/Mallard/12/00 (H5N2)	8.0±1.0	97	-6.04±0.25	-52.20±1.38	K ₂₅₅₈ – водородная связь

В данном случае достаточно просто объяснить разную аффинность камфецина к НА трех подтипов. Несмотря на определенную консервативность второй субъединицы гликопротеина (НА₂), а.о. сайта связывания разных подтипов белка несколько различаются (рисунок 3–12). В ряде случаев (если рассматривается аминокислотная последовательность сайта связывания гемагглютининов, относящихся к одной филогенетической группе, например, H1 и H5) замены могут быть незначительные с точки зрения фармакофорных особенностей а.о (рисунок 3–12А). Так, в ТБГХ-сайте НА 5-го подтипа в положении 602 находится метионин, вместо лейцина в НА 1-го подтипа (L602M), тирозин вместо фенилаланина (Y295F) и валин вместо лейцина (V302L). Фармакофорный профиль данных аминокислот не меняется: пары а.о. либо гидрофобные, либо ароматические. Это значит, что фармакофорный профиль этих сайтов остается прежним. Однако меняется длина боковых заместителей, которые, очевидно, изменяют размер и пространство сайта связывания.

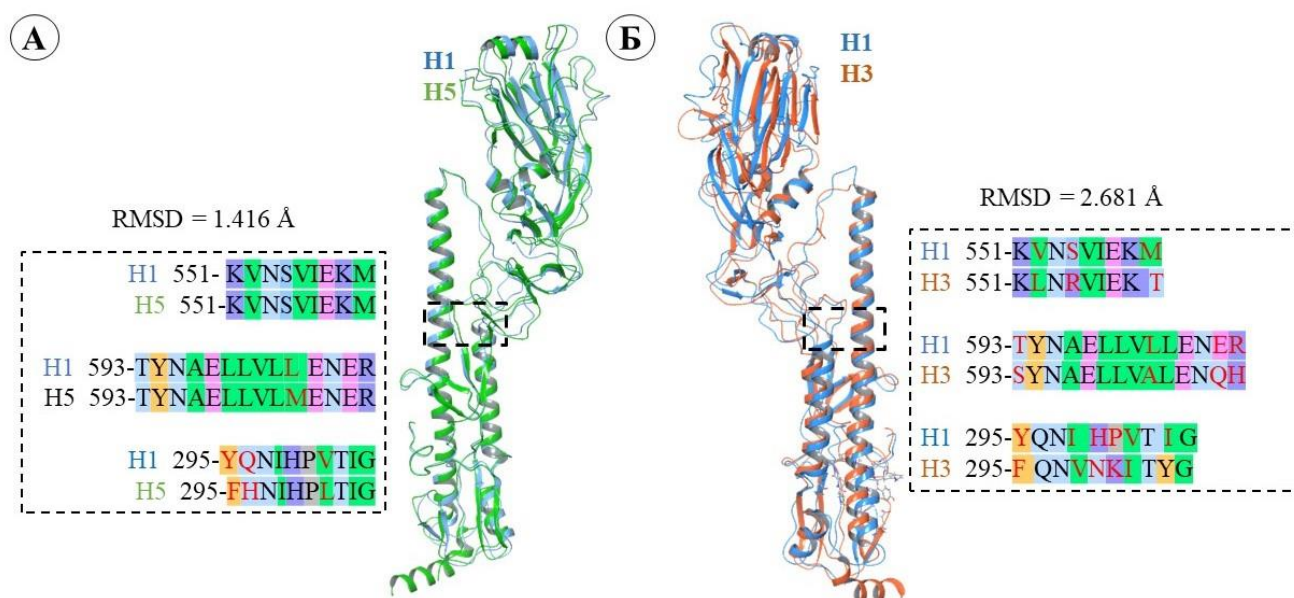


Рисунок 3-12 – Выравнивание аминокислотных последовательностей сайта связывания ТБГХ поверхностных гликопротеинов разных штаммов вируса гриппа. Указаны а.о. в радиусе 5Å от предполагаемого расположения лиганда: гидрофобные а.о. остатки выделены зеленым цветом, ароматические – оранжевым, положительно и отрицательно заряженные – фиолетовым и розовым, соответственно, полярные – синим цветом, пролин – серым. Нумерация а.о. приведена в соответствии с PDB кодом 1RU7.

Если гликопротеины относятся к разным филогенетическим группам, как H1 и H3, то отмечаются аминокислотные замены, которые могут привести к изменению фармакофорного профиля сайта связывания. Так, метионин в положении 559 в НА 1-го подтипа меняется на треонин (M551T): гидрофобная аминокислота меняется на полярную, или при аналогичном сравнении: гидрофобный изолейцин заменен на ароматический тирозин (I313Y), в боковой цепи которого присутствует -ОН -группа дополнительны акцептор (или донор) водородной связи

([рисунок 3–12Б](#)). При выравнивании а.о. НА 1-го (Н1) и 3-го (Н3) наблюдается 9 замен против 3, которые присутствуют при сравнении Н1 и Н5. Таким образом, связывание камфецина в ТБГХ-сайте разных штаммов будет различаться ввиду наблюдаемых различий в а.о., и как следствие, будет различаться характер межмолекулярных взаимодействий, которые образуются в результате расположения лиганда в сайте связывания. Другими словами, все приведенные выше умозаключения, основанные на результатах биологических экспериментов и молекулярного моделирования, позволяют сделать вывод, что камфецин может ингибировать гемагглютинин, связываясь в области пептида слияния белка.

Альтернативный сайт связывания был найден по методологии идентификации и картирования полостей сайта, реализованной в плагине SiteMap. Похожий подход использовался в работе [286]. Предпосылкой к описанию фармакофорного профиля альтернативного сайта связывания стали именно результаты полноценного аннотирования поверхности белка, представленные в [таблице 2–1](#). В литературном обзоре уже описаны неудачные результаты поиска вероятного места связывания ингибиторов НА [49], и, наоборот, удачные, в результате которых было найдено место связывания ингибиторов гликопротеина вируса Эбола [154], подтвержденные кристаллографическими данными комплекса GP-торемифен [151].

Альтернативный сайт связывания камфецина расположен в области протеолиза ближе к вирусной мембране ([рисунок 3–13А](#)).

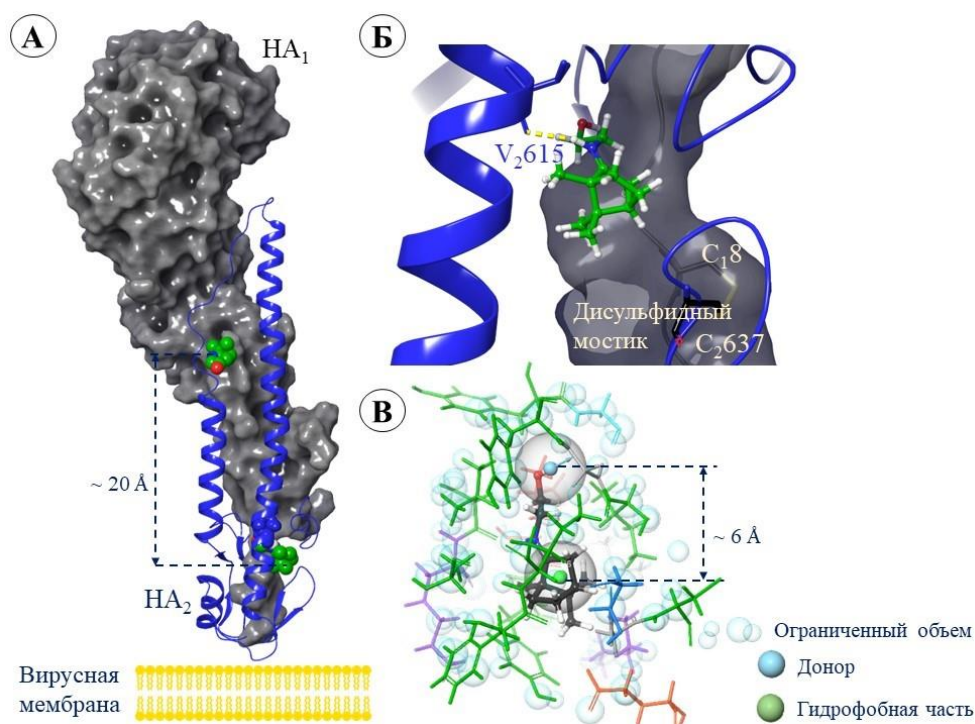


Рисунок 3-13 – Результат поиска альтернативного сайта связывания: А – расположение двух вероятных сайтов связывания камфецина на поверхности протомера гемагглютинирина; Б –

связывание камфецина в месте протеолиза. Показан дисульфидный мостик C₁₈-S-S-C₂₆₃₇, соединяющих две субъединицы гликопротеина. Желтой прерывистой линией показана водородная связь. Нумерация а.о. соответствует PDB коду 1RU7. В – фармакофорный профиль альтернативного сайта связывания камфецина: гидрофобные а.о. окрашены в зеленый цвет, положительно и отрицательно заряженные – в фиолетовый и оранжевый, соответственно, полярные – в синий, глицин – в светло-серый.

Небольшая полость объемом около 300Å³, находится рядом с местом протеолиза – дисульфидным мостиком, соединяющим два цистеина обеих субъединиц C₁₈-S-S-C₂₆₃₇ (нумерация а.о. соответствует PDB коду 1RU7). При связывании камфецина в этой области протеина образуется водородная связь между протонированным атомом азота лиганда и карбонильным атомом кислорода валина в положении 615 (рисунок 3–13Б). Сайт насыщен гидрофобными а.о. (на рисунке 3–13В окрашены в зеленый цвет). Основными фармакофорными признаками сайта связывания являются гидрофобный фрагмент и донор водородной связи, расположенные на расстоянии около 6Å друг от друга. Вполне вероятно, что камфецин может связываться в обеих полостях, ингибируя при этом конформационные перестройки поверхностного гликопротеина вируса гриппа.

Согласно результатам молекулярного QM-докинга, энергетические значения, характеризующие аффинность лиганда к обоим сайтам, примерно одинаковы (рисунок 3–14). Здесь и далее сайт связывания, расположенный в области протеолиза, будет называться К-сайт. С другой стороны, расположение камфецина в К-сайте характеризуется более высокой кластеризацией, т. е. более низкими значениями энергии кластеризации. В ТБГХ-сайте связывания ориентация камфецина может быть различной при сравнении каждой докинг-позиции (рисунок 3–14А). Расположение лиганда характеризуется образованием водородных мостиков между гидроксильной группой лиганда и аминокислотами E₂₅₉₇ или S₂₅₅₄. В некоторых случаях возможно π-катионное стекинг-взаимодействие между протонированным атомом азота и ароматическим кольцом тирозина в положении 594 (рисунок 3–14А). В месте протеолиза камфецин чаще всего располагается с образованием водородных связей между протонированным атомом азота и V₂₆₁₅ и гидроксильной группы и G₁₁₀ (рисунок 3–14Б). Здесь необходимо отметить, что камфецин может быть протонирован по атому азота. Это очень важное замечание, так как протонированный атом является дополнительным реакционным центром, способным к образованию водородных и/или солевых связей с атомами боковых цепей а.о., окружающих лиганд, что хорошо видно на рисунке 3–14. Вопрос протонирования камфецина и его аналогов будет обсужден ниже. Методология оценки константы кислотности приведена в [253].

в отношении разных штаммов вируса гриппа и результаты процедуры молекулярного QM-докинга в альтернативный сайт связывания

Параллельно с молекулярным моделированием проводились и широкомасштабные биологические эксперименты. В результате пассивирования вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1) в течение 6 пассажей при нарастающей концентрации камфецина был получен камфецин-резистентный штамм вируса гриппа. Секвенирование гена НА мутантного вируса показало наличие значимой мутации в стеблевой части НА₂ [277]. В месте протеолиза валин в положении 615 мутирует на лейцин V615L. На первый взгляд кажется, что мутация весьма незначительная: фармакофорный профиль а.о. остается прежним, обе аминокислоты гидрофобные. Однако при замене происходит увеличение заместителя боковой цепи аминокислот: изопропил-заместитель валина меняется на изобутил-заместитель лейцина. Размер полости связывания сокращается, и аффинность камфецина к К-сайту падает. Согласно данным биологических экспериментов, камфецин ингибирует репликацию резистентного штамма вируса в больших концентрациях (рисунок 3–16).

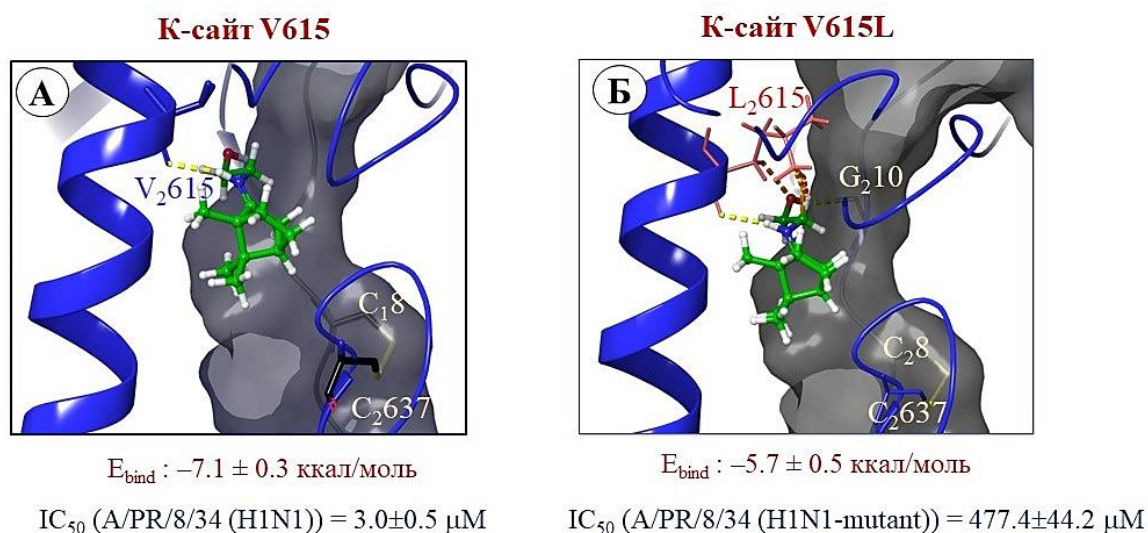


Рисунок 3-16 – Результаты молекулярного QM-докинга камфецина в К-сайт связывания НА дикого (А) и мутантного (Б) типов: водородные связи показаны желтыми прерывистыми линиями, стерические затруднения, возникающие при расположении лиганда показаны в виде clash-взаимодействий оранжевыми прерывистыми линиями.

В целом связывание камфецина в обоих сайтах схожее (рисунок 3–16А и Б). Оптимальная докинг-позиция, выбранная на основе визуального анализа и по энергетическим параметрам, сопровождается образованием водородных связей между водородами amino- и гидроксильной групп лиганда и карбонильными кислородами аминокислот L2615 и G210 (рисунок 3–16Б). Однако при связывании камфецина в К-сайте связывания мутантного НА наблюдаются стерические затруднения или clash (нежелательные) взаимодействия между атомами водорода

а.о. и лиганда, которые не наблюдаются при связывании камфецина в альтернативном сайте дикого типа НА (рисунок 3–16А).

Таким образом, анализируя результаты теоретических расчетов (поверхность белка, фармакофорный профиль альтернативного сайта связывания, результаты процедур гибкого и QМ-докинга) и биологических экспериментов (противовирусная активность агента **125** в отношении разных штаммов вируса гриппа, результат эксперимента по времени добавления, анти-фузогенную активность камфецина, результат аннотирования генома НА камфецин-резистентного штамма) можно предположить следующее: в качестве биологической мишени противовирусного действия камфецина можно рассматривать гемагглютинин вируса гриппа. По-видимому, механизм противовирусного действия соединения **125** связан с ингибированием конформационных перестроек, которые происходят в гликопротеине при переходе из префузионной в постфузионную конформацию. Следует отметить, что связывание камфецина в обоих сайтах связывания равновероятно может повлиять на энергетическую составляющую белка в целом. При связывании в месте пептида слияния агент **125** может зафиксировать положение двух α -спиралей, а при связывании в месте протеолиза – повлиять на процесс протеолитического расщепления. Все это может привести к подавлению фузогенной активности поверхностного гликопротеина. Другими словами, камфецин может связываться в обоих сайтах связывания.

3.1.3.1.2. Где связываются аналоги камфецина?

В отделе медицинской химии НИОХ СО РАН был синтезирован ряд аналогов камфецина, проявляющих активность в отношении вируса гриппа штамма А/ PR/8/34 (H1N1) (рисунок 3–17). Соединения содержат разные заместители и линкеры разной длины, но общий гидрофобный норборнанный фрагмент. Для большинства аналогов значения IC_{50} не превышают 20 μM , и практически для всех (за исключением **153**) индекс селективности составляет более 8 единиц (рисунок 3–17), что позволяет рассматривать их в качестве перспективных молекул. Соединениями-лидерами являются камфецин (**125**) и ряд его аналогов: **126**, **128**, **129** и **145**, для которых индекс селективности превышает 200 единиц.

Учитывая структурные особенности аналогов **126–159**, в качестве потенциальной биологической мишени был рассмотрен гемагглютинин вируса гриппа. Для соединений была проведена процедура молекулярного QМ-докинга в ТБГХ- и К-сайты НА. Анализ аффинности большого количества молекул позволил провести поиск зависимости между результатами биологических тестов и энергетических параметров докинга.

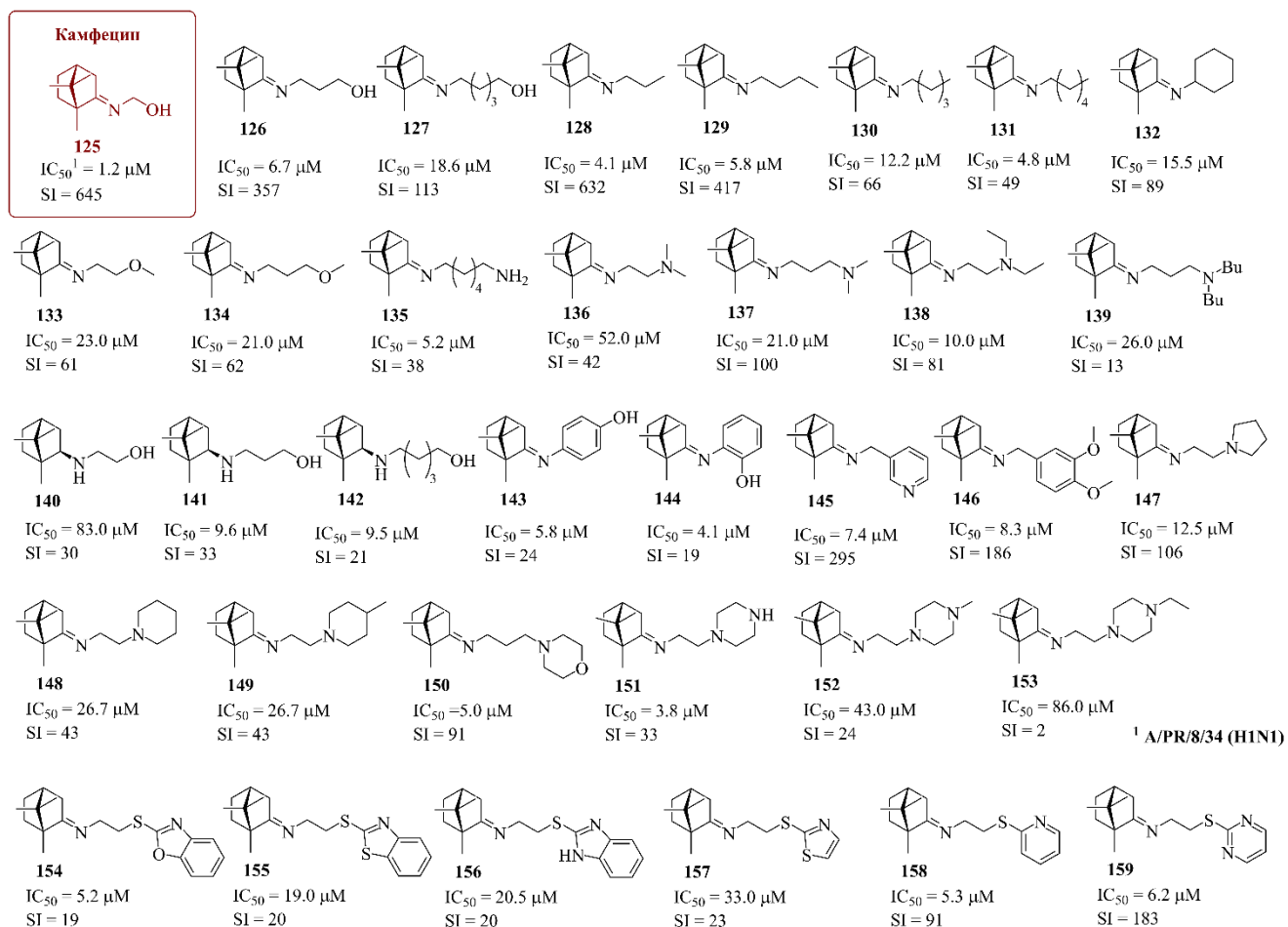


Рисунок 3-17 – Аналоги камфецина, проявляющие противовирусную активность в отношении штамма вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) [282,283].

Структурные особенности камфецина и его аналогов позволяют предположить вероятность протонирования по атому азота (рисунок 3–18). Оцененное методами квантовой химии значение константы кислотности соединения **125** составляет 7.2 единицы. Для агента **144** это значение равно 5.1. Используя уравнение Гендерсона-Хассельбаха [254,255] по формуле 2–3 было оценено соотношение протонированных и депротонированных форм лигандов при pH = 5.0.

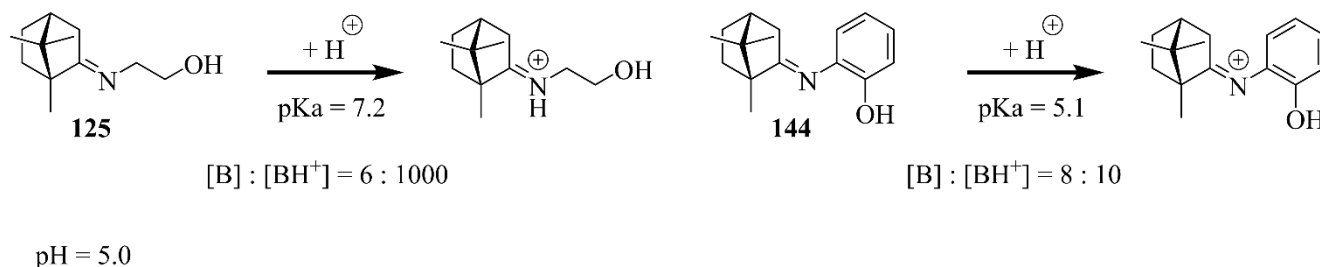


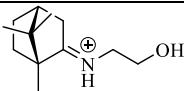
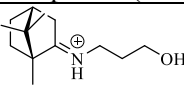
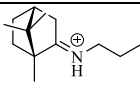
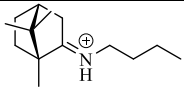
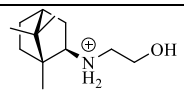
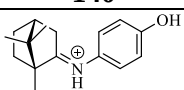
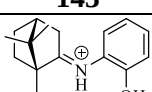
Рисунок 3-18 – Оценка констант кислотности агентов **125** и **144** методами квантовой химии

Как было описано выше, конформационные перестройки гемагглютинина происходят в кислой среде эндосомы [10]. Тогда соотношение $[B] : [BH^+]$ для камфецина составляет 6 к 1000,

а для его аналога **144** 8 к 10 при pH = 5.0. Количество депротонированных молекул камфецина пренебрежимо мало, что позволяет не учитывать их энергетический вклад при оценке энергии связывания лиганда и белка. В случае агента **144** соотношение депротонированных и протонированных форм примерно одинаковое, а это значит, что при анализе результатов молекулярного докинга необходимо учитывать обе формы молекулы.

Оцененные методом квантовой химии значения кислотности, в целом коррелируют с экспериментальными значениями (таблица 3–4).

Таблица 3-4 – Результаты оценки значений константы кислотности (pKa) для камфецина и его аналогов.

Структура	Экспериментальные данные		Теоретические данные
	pKa (вода)	pKa (этанол/вода)	pKa (вода)
 Камфецин (125)	7.47±0.20	8.84±0.20	7.2
 126	7.59 *	8.96±0.10	7.4
 128	7.96	9.33±0.02	7.3
 129	7.51	8.88±0.20	7.3
 140	Не оценивали		8.6
 143			5.0
 144			5.1

* данные получены в результате экстраполяции

Согласно расчетам, некоторые аналоги камфецина **126**, **128**, **129**, **140** характеризуются значениями кислотности выше 7.2. Экспериментальные значения pKa для соединений **125**, **126**, **128**, **129**, и **140**, оцененные в водном растворе, располагаются в интервале от 7.27 до 7.96. Соединения, содержащие фенильный заместитель (**143** и **144**), характеризуются наименьшими рассчитанными значениями pKa. В дальнейшем соотношение протонированных и депротонированных форм исследуемых соединений было учтено при оценке энергетических

параметров, характеризующих аффинность лиганда к сайтам связывания и описания характера взаимодействий с окружающими аминокислотами.

Энергетические параметры связывания соединений **125–159** с гемагглютинином в совокупности со значениями, характеризующими их противовирусную активность в отношении штамма вируса A/PR/8/34 (H1N1), представлены в [таблице 3–5](#). Анализ результатов молекулярного докинга в совокупности с данными биологических экспериментов позволяет отметить наличие линейной зависимости между значениями pIC_{50} и энергетической характеристикой связывания (E_{bind}). При этом индекс корреляции значений pIC_{50} и параметров, характеризующих аффинность агентов **125–159** к ТБГХ-сайту связывания несколько ниже ([рисунок 3–19А](#)), чем при анализе аффинности соединений к К-сайту ([рисунок 3–19Б](#)).

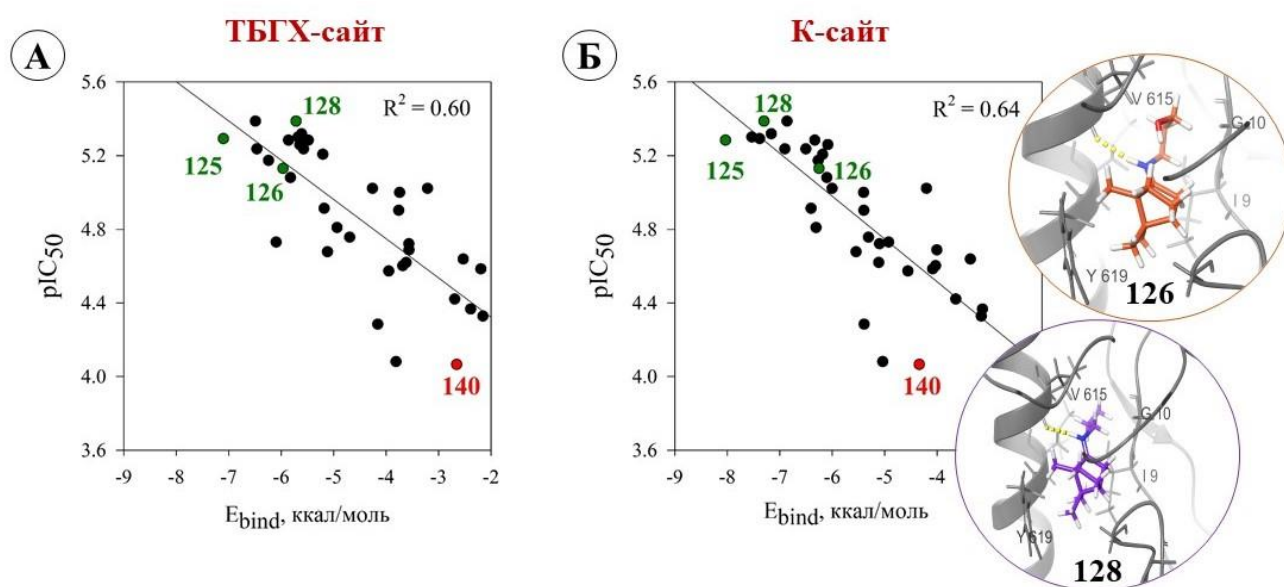


Рисунок 3-19 – Взаимосвязь энергетических параметров молекулярного QM-докинга агентов **125–159** в сайты связывания гемагглютиниона и значений их противовирусной активности в отношении вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1).

К-сайт связывания меньше ТБГХ-сайта по размеру, поэтому объемные молекулы **154–159** характеризуются невысокими значениями аффинности из-за возникающих стерических затруднений при их расположении. Напротив, небольшие молекулы, например, **126** и/или **128** ([рисунок 3–19Б](#)) хорошо укладываются в К-сайте связывания с образованием водородной связи между протонированным азотом и V₂₆₁₅, подобно камфецину. Таким образом, камфецин и его аналоги могут связываться как в области пептида слияния, так и в месте протеолиза поверхностного гликопротеина вируса гриппа.

Таблица 3-5 – Результаты молекулярного докинга камфецина (125) и его аналогов (126–159) в ТБГХ- и К-сайты связывания НА.

Лиганд	IC ₅₀ , μM	QM-docking score (E _{bind}), ккал/моль	QM- Emodel	LE	Взаимодействия с а.о. сайтов		
					Водородные связи	Другие типы взаимодействия	Стерические затруднения
К-сайт							
125	5.1	-7.4	-47.2	0.5	G ₁₀ , V ₂ 615	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
126	6.7	-6.3	-44.5	0.4	V ₂ 615	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
127	18.6	-4.9	-24.7	0.3	V ₂ 615	отсутствуют	I ₁ 9
128	4.1	-7.3	-45.2	0.5	V ₂ 615	отсутствуют	отсутствуют
129	5.8	-6.5	-45.2	0.5	V ₂ 615	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
130	12.2	-6.5	-42.0	0.4	V ₂ 615	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
131	4.8	-7.2	-49.7	0.4	V ₂ 615	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
132	15.5	-6.3	-34.6	0.4	отсутствуют	Y ₁ 11, Y ₂ 619 π- катион	V ₂ 615, Y ₂ 619
133	23.0	-3.4	-26.8	0.2	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
134	17.5	-5.3	-25.3	0.3	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион	V ₂ 615, Y ₂ 619, G ₂ 636
135	5.2	-6.3	-43.9	0.4	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
136	52.0	-4.3	-22.1	0.3	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
137	21.0	-5.5	-35.0	0.3	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион E ₂ 632 солевой мостик	отсутствуют
138	10.0	-5.4	-30.5	0.3	E ₂ 632	F ₂ 509 π-катион	отсутствуют
139	26.0	-4.1	-33.9	0.2	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион E ₂ 632 солевой мостик	отсутствуют
140	83.0	-5.0	-37.2	0.4	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
141	9.6	-6.0	-39.3	0.5	G ₁₀	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
142	9.5	-4.2	-35.3	0.2	F ₅₀₉ , G ₆₃₆	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
143	5.8	-6.9	-45.0	0.4	G ₁₀	отсутствуют	отсутствуют
144	4.1	-6.6	-47.6	0.4	V ₆₁₅	отсутствуют	отсутствуют
145	7.4	-6.2	-34.9	0.3	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион	Y ₂ 619
146	8.3	-6.1	-42.7	0.3	E ₂ 632	Y ₂ 619 π-катион E ₂ 632 солевой мостик	отсутствуют
147	12.5	-5.4	-30.5	0.3	E ₂ 632	F ₂ 509 π-катион E ₂ 632 солевой мостик	отсутствуют
148	26.7	-4.5	-27.8	0.2	отсутствуют	F ₂ 509, Y ₂ 619 π- катион E ₂ 632 солевой мостик	Y ₂ 619
149	25.0	-4.1	-32.7	0.2	отсутствуют	F ₂ 509 π-катион E ₂ 632 солевой мостик	F ₂ 509, Y ₂ 619
150	4.8	-7.5	-41.3	0.4	V ₂ 615	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
151	38.0	-3.5	-29.5	0.2	отсутствуют	E ₂ 632 солевой мостик	F ₂ 509, E ₂ 632
152	43.0	-3.2	-34.8	0.2	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион	G ₂ 636
153	86.0	-2.8	-30.7	0.1	E ₂ 632	F ₂ 506, Y ₂ 619 π- катион	G ₂ 636, Y ₂ 619
154	5.2	-8.0	-50.0	0.3	V ₂ 615	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
155	19.0	-5.1	-32.1	0.2	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион	отсутствуют
156	20.5	-4.1	-33.8	0.2	E ₆₃₂	отсутствуют	Отсутствуют

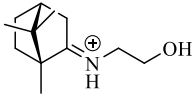
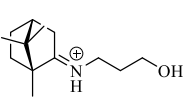
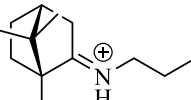
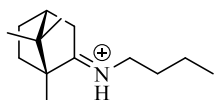
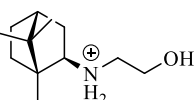
Таблица 3–5 – Продолжение.

Лиганд	IC ₅₀ , μM	QM-docking score (E _{bind}), ккал/моль	QM-Emodel	LE	Взаимодействия с а.о. сайтов		
					Водородные связи	Другие типы взаимодействия	Стерические затруднения
157	33.0	-3.6	-33.0	0.2	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
158	5.5	-6.1	-35.6	0.3	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион	Y ₂ 619 π-катион
159	6.2	-6.2	-36.4	0.3	отсутствуют	Y ₂ 619 π-катион	Y ₂ 619 π-катион
ТБГХ-сайт							
125	5.1	-7.0	-43.3	0.5	Y ₂ 594	отсутствуют	отсутствуют
126	6.7	-6.2	-45.4	0.4	E ₂ 597	отсутствуют	отсутствуют
127	18.6	-6.1	-40.4	0.4	E ₂ 557, K ₁ 26	Y ₂ 594 π-катион	отсутствуют
128	4.1	-6.5	-39.7	0.5	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
129	5.8	-6.5	-39.7	0.5	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
130	12.2	-6.1	-39.1	0.4	отсутствуют	Y ₂ 594 π-катион	отсутствуют
131	4.8	-7.1	-48.1	0.4	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
132	15.5	-4.7	-33.1	0.3	отсутствуют	отсутствуют	K ₂ 558
133	23.0	-5.7	-32.0	0.4	отсутствуют	Y ₂ 594 π-катион	E ₂ 597
134	17.5	-5.7	-41.6	0.4	отсутствуют	Y ₂ 594 π-катион	отсутствуют
135	5.2	-7.4	-49.7	0.4	отсутствуют	Y ₂ 594 π-катион E ₂ 567 солевой мостик	отсутствуют
136	52.0	-4.2	-32.7	0.3	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
137	21.0	-5.1	-32.9	0.3	отсутствуют	E ₂ 567 солевой мостик	K ₂ 558
138	10.0	-6.1	-43.0	0.3	отсутствуют	E ₂ 567 солевой мостик	E ₂ 597
139	26.0	-2.2	-31.0	0.1	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
140	83.0	-3.8	-27.2	0.3	отсутствуют	Y ₂ 594 π-катион	L ₂ 598
141	9.5	-6.5	-41.5	0.4	E ₂ 597	Y ₂ 594 π-катион	L ₂ 598
142	9.5	-4.4	-43.2	0.3	K ₂ 558	Y ₂ 594 π-катион	отсутствуют
143	5.8	-7.3	-55.7	0.4	E ₂ 557, K ₁ 26	отсутствуют	отсутствуют
144	4.1	-7.1	-57.4	0.4	T ₁ 22	K ₁ 26, K ₂ 558 π- катион	отсутствуют
145	7.4	-6.5	-41.2	0.4	отсутствуют	K ₂ 558, Y ₂ 594 π- катион	отсутствуют
146	8.3	-6.6	-55.5	0.3	K ₂ 26	отсутствуют	отсутствуют
147	12.5	-6.5	-46.1	0.4	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
148	26.7	-3.9	-44.6	0.2	отсутствуют	Y ₂ 594 π-катион	отсутствуют
149	25.0	-3.6	-50.9	0.2	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
150	5.0	-6.8	-35.4	0.3	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
151	38.0	-2.7	-35.2	0.1	отсутствуют	Y ₂ 594 π-катион, G ₂ 557 солевой мостик	отсутствуют
152	43.0	-3.4	-39.8	0.1	отсутствуют	G ₂ 557 солевой мостик	отсутствуют
153	86.0	-2.7	-62.7	0.1	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
154	5.2	-7.4	-49.1	0.3	отсутствуют	K ₁ 26, K ₂ 558 π- катион	отсутствуют
155	19.0	-3.6	-49.6	0.2	отсутствуют	K ₂ 558, Y ₂ 594 π- катион	отсутствуют
156	20.5	-3.6	-46.9	0.2	E ₂ 597	K ₁ 26 π-cation	отсутствуют
157	33.0	-3.6	-53.4	0.2	отсутствуют	Y ₂ 594 π-катион	отсутствуют
158	5.5	-7.2	-55.5	0.4	Y ₂ 594	K ₂ 558 π-катион	отсутствуют
159	6.2	-7.2	-46.1	0.4	Y ₂ 594	K ₂ 558 π-катион	отсутствуют

Геометрические параметры лиганд-белковых комплексов, соответствующих оптимальным докинг-позициям агентов **125**, **126**, **128**, **129** и **140**, были выбраны для проведения молекулярно-динамических симуляций. Выбор был обоснован результатами биологических экспериментов: соединения **126**, **128** и **129** характеризуются высокими индексами селективности, соединение **140** было выбрано в качестве отрицательного контроля с одной стороны, и схожести структурных параметров с камфецином с другой.

Результирующие траектории молекулярной динамики систем, в первую очередь, должны описать эффективность сохранения лигандов в К-сайте, т. е. максимальное время (τ , нс), в течение которого соединение «удерживается» в сайте связывания (таблица 3–6, рисунок 3–20). Для этого из каждой симуляции был выбран набор «фреймов», описывающих состояние системы в период до 300 наносекунд. Время «удержания» камфецина в К-сайте связывания в месте протеолиза было максимальным среди рассматриваемых структур. Соединения **126** и **128** удерживаются в К-сайте в течение 193 нс и 113 нс соответственно, после чего переходят в растворенную фазу. Соединение **129** с меньшим уровнем аффинности к К-сайту обладает менее привлекательными характеристиками динамической стабильности лиганд-белкового комплекса. Период стабильного удержания малой молекулы в активном сайте составляет всего 90 наносекунд из 300. Анализ траекторий молекулярной динамики НА в комплексе с малоактивным агентом **140** показал самое низкое время удержания в К-связывающем сайте: всего 10.5 нс. Весь остальной период симуляции соединение пребывает в растворителе. В ходе симуляции регистрируются периодические контакты **140** с поверхностью белка, но ни одно из них не приводит к формированию стабильного лиганд-белкового комплекса. Между тем согласно работе [287] конформационные перестройки, происходящие с гемагглютинином, протекают в микросекундных интервалах. Другими словами, неактивное соединение находится в сайте связывания в течение незначительного времени, и вероятнее всего, не успевает оказать влияние на данный процесс.

Таблица 3-6 – Время «удержания» ряда аналогов камфецина в сайте связывания.

Структура	125	126	128	129	140
					
IC ₅₀ (μM)	5.1	6.7	4.1	5.8	83.0
τ (нс)	> 300.0	193.0	113.0	90	10.5

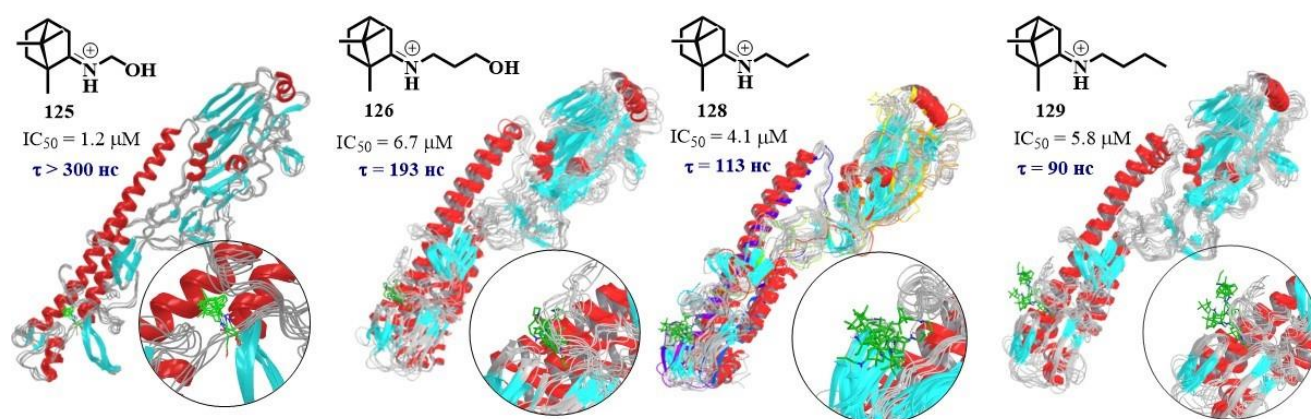


Рисунок 3-20 – Визуализация времени «удержания» камфецина и его аналогов в К-сайте в течение молекулярно-динамических симуляций

Таким образом, как уже было указано выше, камфецин и его аналоги могут связываться, как минимум, в двух из возможных гидрофобных карманов гемагглютинаина, расположенных в разных местах стеблевой части гликопротеина. Дополнительные расчеты методами молекулярной динамики показали наличие кластеризуемых конформационных состояний, где помимо камфецинового сайта наблюдается укладка в альтернативную, неизученную ранее полость. Анализ поверхности белковой структуры показал, что между субъединицами HA_1 и HA_2 существует серия гидрофобных контактов, нарушаемых при переходе в постфузионную конформацию. Камфецин и его аналоги, взаимодействуя в данных областях, приводят к стабилизации «гидрофобного сэндвича», тем самым осложняя переход в «активную» форму белка. Стоит обратить внимание, что в зарегистрированных сайтах связывания высока плотность лейциновых фрагментов. Данный факт наталкивает на размышления о влиянии на стабильность элементов, именуемых «лейциновыми застёжками», которые ранее были описаны для белков данного типа [287,288]. Мутация V615L, при которой образуется камфецин-устойчивый штамм вируса гриппа, происходит в месте протеолиза. Этот факт позволяет нам рассматривать эту небольшую гидрофобную полость приоритетной. Незначительные размеры сайта связывания предполагают, что наибольшую аффинность к этому месту должны проявлять небольшие молекулы, содержащие жесткий гидрофобный каркас и гидрофильный заместитель. Эти рассуждения подтверждаются результатами биологических экспериментов и теоретических расчетов методами молекулярной динамики. Кроме того, наиболее интересны соединения, характеризующиеся низкими значениями цитотоксичности. Тогда, кроме камфецина, можно отметить структуры **126** и **128**, которые могут быть перспективными в качестве потенциальных противовирусных препаратов. Более длинный заместитель структуры **128** может быть модифицирован с целью увеличения реакционных мест молекулы для более плотного контакта с окружающими аминокислотами в сайте связывания.

Интересно, что описанная в работе [73] гидрофобная полость, окруженная аминокислотными остатками K₂₆₂₃, Q₂₆₂₀, Y₂₆₁₉, F₁₉ (здесь нумерация а.о. также соответствует PDB коду 1RU7), расположена в непосредственной близости к V₂₆₁₅. Место связывания определено на основании результатов молекулярного докинга в совокупности с рядом молекулярно-динамических симуляций. Другими словами, авторы [73] описывают К-сайт связывания, называя его принципиально новым сайтом связывания ингибиторов НА. Статья авторов [73] была опубликована в 2020 году, в то время как первое упоминание о подобном альтернативном сайте связывания было приведено в 2018 году в работе [277]. К сожалению, авторы работы [73] не были знакомы с данной публикацией. Однако в любом случае, то, что две разные группы ученых определили одно и то же место для связывания ингибиторов НА, можно рассматривать как подтверждение актуальности данного сайта связывания.

Таким образом, масштабные теоретические расчеты в совокупности с рядом биологических экспериментов позволили определить альтернативное место связывания ингибиторов НА, расположенное в небольшой полости рядом с местом протеолиза, так называемый К-сайт. В дальнейшем именно это место связывания рассматривалось как наиболее вероятное для ряда малых молекул, схожих по-своему фармакофорному и/или дескрипторному профилю с камфецином.

3.1.3.2. Описание механизма противовирусной активности четвертичной аммониевой соли на основе (–)-борнеола [278]

Четвертичная аммониевая соль на основе (–)-борнеола (**160**) проявляет выраженную противовирусную активность против ряда штаммов вируса гриппа. На основании биологических экспериментов (эксперимента по времени добавления и изучения влияния агента **160** на процесс слияния, опосредованного НА) поверхностный гликопротеин вируса гриппа может быть рассмотрен в качестве наиболее вероятной биологической мишени. Предположительно, соль **160** может связываться в стеблевой части протеина. Соединение **160** проявляет различную ингибирующую активность против разных штаммов вируса гриппа, а именно A/PR/8/34 (H1N1), A/California/07/09 (H1N1) pdm09 и A/Aichi/2/68 (H3N2) (таблица 3–7). Факт, что аминокислотные последовательности в сайтах связывания ингибиторов НА различаются, также можно использовать как подтверждение правильности выбранной мишени.

Ранее уже была описана разница в а.о. ТБГХ-сайта в НА 1-го и 3-го подтипа (рисунок 3–12). Ряд аминокислотных замен приводят к изменению структурных особенностей боковой цепи и фармакофорного профиля сайта связывания. При сравнении а.о. ТБГХ-сайта в НА штамма A/PR/8/34 (H1N1) и пандемического A/California/07/09 (H1N1) pdm09, наблюдаются две замены Y295F и V301I в первой субъединице белка.

Таблица 3-7 – Значения противовирусной активности соединения **160** против разных штаммов вируса и выравнивание аминокислотных последовательностей в сайтах связывания ингибиторов НА разных подтипов по сравнению с H1 штамма A/PR/8/34 (H1N1). Ряд а.о. окрашены в соответствии с их фармакофорными профилями: гидрофобные – зеленым цветом, положительно и отрицательно заряженные – фиолетовым и розовым, соответственно, полярные – синим цветом. Нумерация а.о. приведена в соответствии с PDB кодом 1RU7.

Штамм вируса	IC ₅₀ , μM	SI	ТБГХ-сайт		К-сайт	
			HA ₁	HA ₂	HA ₁	HA ₂
A/PR/8/34 (H1N1)	2.4±0.4	546	×		×	
A/California/07/09 (H1N1) pdm09	16.8±3.1	78	Y295F V301I	Нет замен	Нет замен	K623R
A/Aichi/2/68 (H3N2)	9.2±1.3	142	Y295F V298I H299N P300K V301I I303Y	V552L S554R M559T T593S L601A E605Q R606H	I9L Y11H	Y594F N614E V615M K616N N617K Y619F I633M

При сравнении а.о. К-сайта НА, относящихся к одному филогенетическому типу, но соответствующих разным штаммам A/PR/8/34 (H1N1) и A/California/07/09 (H1N1) pdm09, присутствует только одна замена K623R. При этом обе кислоты относятся к одному подтипу положительно заряженных а.о., однако длина боковой цепи различается.

Аминокислотные последовательности К-сайта гликопротеинов 1-го (H1) и 3-го подтипа (H3) существенно различаются (таблица 3–7). Все это может оказать влияние на характер связывания соли **160** с поверхностным белком.

В рамках данной задачи молекулярный докинг был проведен с использованием протокола принудительного (или гибкого) докинга, позволяющего учитывать влияние лиганда на конформацию боковых цепей а.о. сайтов связывания. 20 докинг-позиций было указано в качестве максимально возможных. Выбор оптимальной позиции основывался на ранжировании энергетических параметров и визуализации докинг-позиции лиганда. Соединения **125** и **160** имеют схожий каркасный гидрофобный фрагмент, полярный заместитель, содержащий доноры и акцепторы водородных связей (рисунок 3–21А), и положительно заряженный реакционный центр. Молекулярный докинг был проведен в оба сайта связывания: ТБГХ- и К-сайты, расположенные в стеблевой части НА.

Согласно результатам молекулярного докинга соединение **160** может связываться в ТБГХ-сайте связывания всех трех подтипов НА. Молекула располагается в пространстве между двумя протомерами белка между короткой и длинной α-спиралями гептадного повтора. Связывание лиганда сопровождается образованием водородных связей между атомом карбонильного кислорода **160** и аминокислотами K₂₅₅₈ (H1-PR) и R₂₅₄ (H3), а также солевых мостиков между

положительно заряженным реакционным центром молекулы **160** и D₁21 (H1-PR), E₂57 (H1-Call) и E₂103 (H3) (рисунк 3–21Б). Нумерация а.о. соответствует PDB кодам различных подтипов НА, которые были использованы для молекулярного моделирования (подробнее написано в подписи к рисунку 3–21). Энергетические параметры связывания соединения **160** в ТБГХ-сайте в целом соизмеримы с характеристиками связывания ТБГХ и камфецина. Аффинность самого ТБГХ (7) к сайту связывания в НА 3-го подтипа выше, чем у **125** и **160** (таблица 3–8). Эти данные не противоречат экспериментальным данным [28]. Результат молекулярного докинга в К-сайт разных типов НА показывает, что **160** связывается только с H1-PR и H1-Call. Докинг в К-сайт гликопротеина H3 не увенчался успехом (рисунк 3–21В).

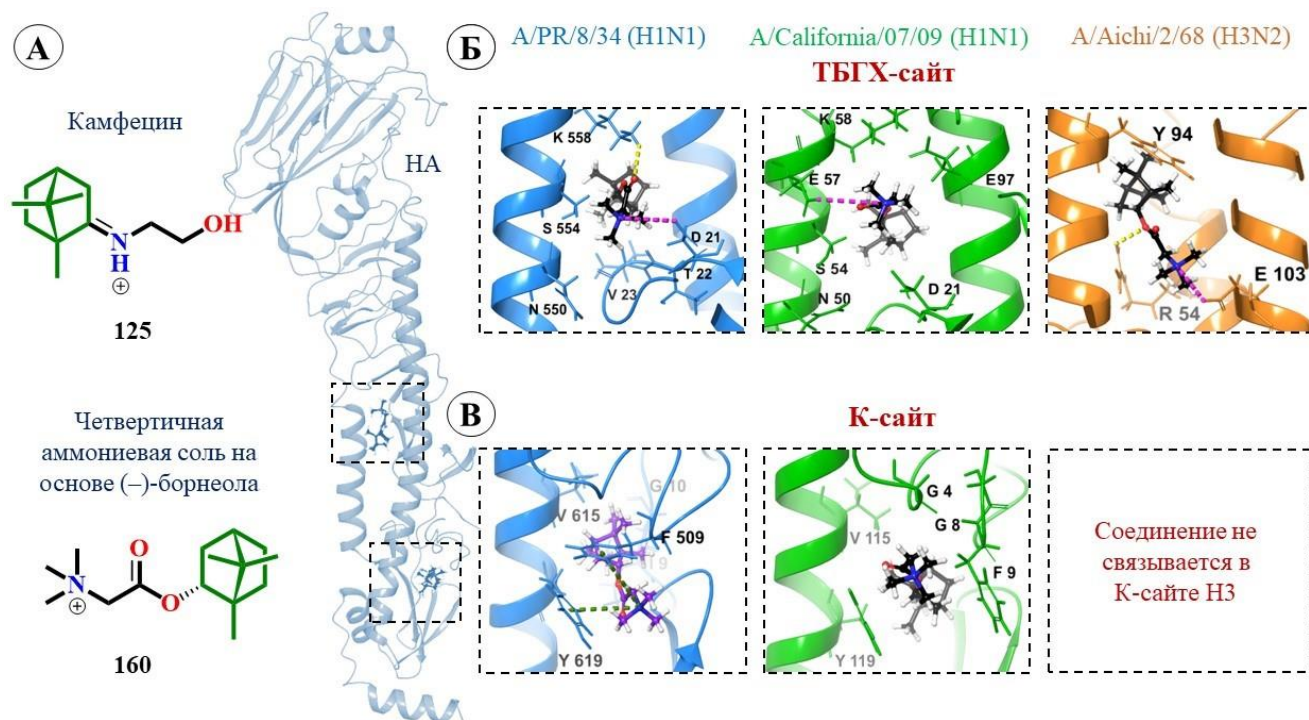


Рисунок 3-21 – Результаты молекулярного моделирования: А – структуры **125** и **160**, гидрофобная часть молекул окрашена в зеленый цвет; Б, В – результаты молекулярного докинга в ТБГХ- и К-сайты НА разных подтипов. Водородные и солевые связи показаны желтой и фиолетовой прерывистыми линиями соответственно, π -катион стекинг-взаимодействие – зеленой прерывистой линией. Нумерация а.о. соответствует PDB кодам, которые были использованы для процедуры молекулярного докинга, а именно 1RU7 – штамм A/PR/8/34 (H1N1) [20]; 3LZG – штамм A/California/07/09 (H1N1) pdm09 [243] и 3EYM – штамм A/Aichi/2/68 (H3N2) [28].

При расположении агента **160** в К-сайте гемагглютинаина H1-PR регистрируются π -катионные стекинг-взаимодействия между положительно заряженным центром лиганда и ароматическими а.о. F₂509 и Y₂619. Связывание соли **160** в месте протеолиза НА, соответствующего штамму A/California/07/09 (H1N1) pdm09, сопровождается только гидрофобными контактами. Согласно анализу энергетических параметров можно отметить, что аффинность соединений **125** и **160** к К-сайту гликопротеина 1-го типа соизмерима (таблица 3–8).

Для соли **160** характерно низкое значение эффективности лиганда $|LE|$ по сравнению со значениями, характеризующими связывание ТБГХ (**7**) и камфецина. Это можно объяснить большим количеством тяжелых атомов в агенте **160**, чем в соединениях **7** и **125**.

Таблица 3-8 – Результаты процедуры молекулярного докинга.

Лиганд	IC ₅₀ , μ M	SI	Docking score, ккал/моль	LE	Docking score, ккал/моль	LE
Штамм	A/PR/8/34 (H1N1)					
Сайт связывания			ТБГХ-сайт		К-сайт	
7 (ТБГХ)	–	–	-6.97	0.58	–	–
125 (камфецин)	1.2	642	-7.10	0.51	-7.07	0.50
160	2.4	546	-6.65	0.37	-7.12	0.42
	A/California/07/09 (H1N1) pdm09					
7 (ТБГХ)	–	–	-6.32	0.53	–	–
125 (камфецин)	5.1	503	-6.95	0.50	-7.18	0.51
160	16.8	78	-6.60	0.36	-6.62	0.37
	A/Aichi/2/68 (H3N2)					
7 (ТБГХ)	~ 6.0	8	-7.81	0.65	–	–
125 (камфецин)	10.3	75	-6.81	0.48	Нет результатов докинга	
160	9.2	142	-6.28	0.35		

Объяснить различную противовирусную активность **160** в отношении штаммов вируса А/Н1N1 и А/Н3N2 можно существенными различиями в аминокислотной последовательности сайтов связывания (таблица 3–8), так как гемагглютинины 1-го и 3-го подтипов относятся к разным филогенетическим группам [28]. По этой причине отсутствие полости нужного размера в области протеолиза, пригодной для связывания даже небольших молекул кажется вполне вероятным. Необходимо отметить, что различную активность против данных штаммов вируса гриппа камфецин может проявлять именно по этой же причине (таблицы 3–3 и 3–8). Связывания камфецина, как и агента **160**, в месте протеолиза НА 3-го подтипа не происходит.

В данном случае сложнее объяснить разницу в ингибировании солью **160** репликации вирусов гриппа штаммов А/PR/8/34 (H1N1) и А/California/07/09 (H1N1) pdm09. Структурные особенности поверхностных гликопротеинов данных штаммов схожи. Выравнивание аминокислотных последовательностей (таблица 3–7) показывает практически одинаковый аминокислотный состав обоих сайтов связывания. По этой причине отсутствует какая-либо значимая разница в энергетических параметрах, характеризующих аффинность агента **160** к ТБГХ- и К-сайтам. Можно предположить, что различная противовирусная активность соединения **160**, вероятно, должна объясняться другими причинами, которые невозможно предсказать на основании результатов молекулярного моделирования.

Таким образом, анализ результатов молекулярного моделирования и биологических экспериментов позволяет предположить, что механизм противовирусной активности четвертичной аммониевой соли на основе (–)-борнеола связан с ингибированием фузогенной активности гемагглютинаина. Соединение **160** может связываться как в месте пептида слияния, так и в месте протеолиза НА 1-го подтипа, затрудняя конформационные перестройки белка. В случае гликопротеина 3-го подтипа агент **160** может связываться только в месте пептида слияния. Этим можно объяснить избирательную противовирусную активность четвертичной аммониевой соли на основе (–)-борнеола в отношении штаммов A/H1N1 и A/H3N2.

3.1.3.3. Описание механизма противовирусной активности ряда О-ацилированных амидоксимов и замещенных 1,2,4 оксадиазолов [279].

Ряд О-ацилированных амидоксимов и замещенных 1,2,4 оксадиазолов, синтезированных на основе (+)-кетопиновой кислоты проявляют активность в отношении вируса гриппа двух штаммов A/PR/8/34 (H1N1) и A/Anhui/1/13 (H7N9) (рисунок 3–22).

¹ A/PR/8/34 (H1N1)

² A/Anhui/1/13 (H7N9)

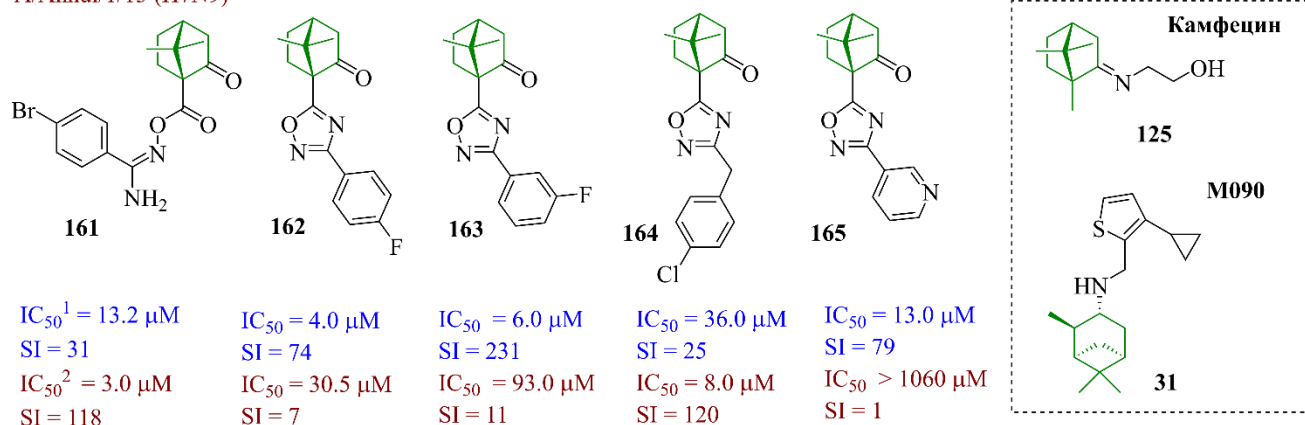


Рисунок 3-22 – Соединения, проявляющие активность в отношении вируса гриппа.

При этом показано, что соединения **161**, **162** и **165** активно подавляют репликацию вируса штамма A/H1N1, а штамм A/H7N9 ингибируют в большей концентрации. Соединения **163** и **164** проявляют выраженную активность в отношении штамма вируса A/H7N9, и менее выраженную в отношении штамма A/H1N1. На основании биологических экспериментов показано, что агенты **161–165** подавляют фузогенную активность НА, а значит могут связываться со стеблевой частью белка.

В рамках данной задачи рассматривали три вероятных сайта связывания: ТБГХ-сайт, К-сайт и сайт связывания M090 (**31**), описанного в работе [74]. Выбор места связывания M090 обусловлен наличием схожего с агентами **161–165** каркасного гидрофобного фрагмента соединения **31**. M090-сайт расположен в полости второй субъединицы НА₂ между длинной α-

спиралью (а.о. 82–93), и петель (а.о. 57–69). Гемагглютинины 1-го и 7-го подтипов относятся к разным филогенетическим группам гликопротеинов (рисунок 1–4), поэтому было проведено выравнивание аминокислотной последовательности указанных сайтов связывания. На рисунке 3–23 показаны результаты выравнивания и фармакофорный профиль а.о. Аминокислотные последовательности сайтов связывания, расположенных в разных НА, различаются.

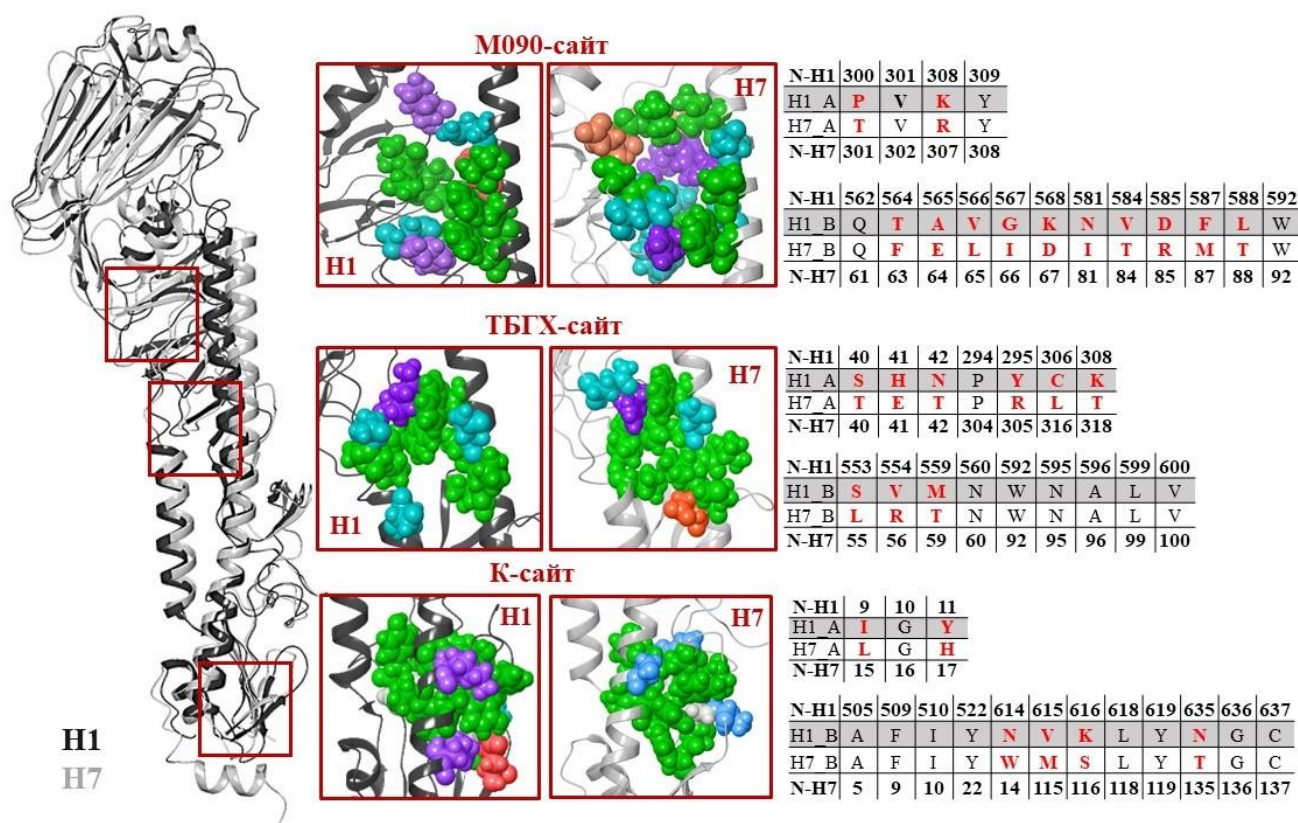


Рисунок 3-23 – Выравнивание аминокислотных последовательностей сайтов связывания ингибиторов гемагглютинаина: гидрофобные а.о. показаны зеленым цветом, положительно и отрицательно заряженные – фиолетовым и оранжевым, соответственно, полярные – синим цветом. Красным шрифтом выделены аминокислотные замены в сайтах связывания разных штаммов. Аминокислотные последовательности соответствует PDB кодам 1RU7 [20] (H1) и 3M5G (H7) [244].

Можно предположить, что причина избирательной активности соединений **161–165** связана не только с фармакофорными профилем указанных сайтов связывания, но с дескрипторными и фармакофорными особенностями самих лигандов (рисунок 3–24). Каждая молекула состоит из жёсткого гидрофобного каркаса, донорно-акцепторной области и ароматических колец. Только в молекуле **161** присутствует донор водородной связи, аминогруппа, которая может протонирована при pH = 5.0. Молекулы **162**, **164** и **165** более жесткие, расстояние между удаленными фармакофорами не превышает 9Å. Молекулы **161** и **163** чуть больше по размеру, более гибкие за счет дополнительных связей вращения, и содержат атом хлора и брома в качестве заместителей ароматического кольца.

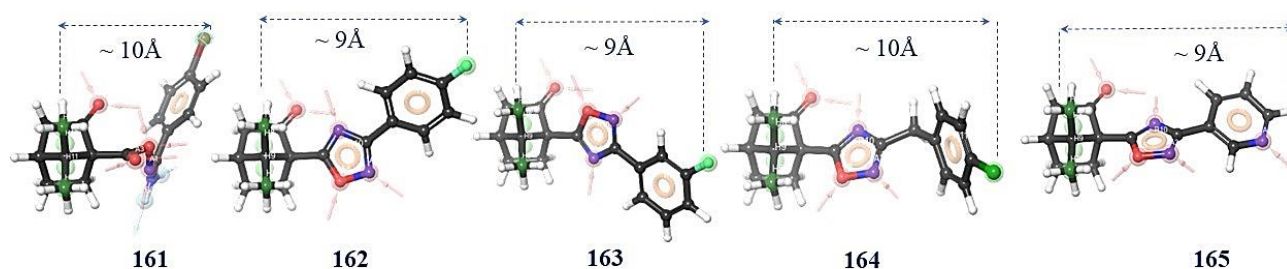


Рисунок 3-24 – Фармакофорные противогриппозных агентов **161–165**.

Сайт связывания камфецина (К-сайт) в гемагглютинине 1-го подтипа (Н1) небольшого размера, объемом не более $300 \text{ \AA}^3$ и площадью порядка $650\text{--}680 \text{ \AA}^2$. Несмотря на то, что энергетические характеристики аффинности лигандов **161–165** к К-сайту Н1 в целом соизмеримы друг с другом (таблица 3–9), отмечается различное вовлечение фармакофоров молекул в контакты с окружающими а.о. Так, для соединений **162** и **164** характерны более низкие значения энергии кластеризации (Emodel) и лиганд-белкового комплекса (IFD score), при их связывании в К-сайте отсутствуют стерические затруднения, а во взаимодействие с а.о. сайта вовлекаются все типы фармакофорных признаков (рисунок 3–24, таблица 3–9). К-сайт поверхностного белка вируса гриппа 7-го подтипа (Н7) больше по размеру, чем К-сайт 1-го (Н1): его площадь составляет $750\text{--}800 \text{ \AA}^2$. Связывание агентов **162**, **163**, **165** характеризуется более высокими значениями энергетических параметров и бóльшими стерическими затруднениями по сравнению с расположением соединений **161** и **164**. Выравнивание а.о. в К-сайта Н1 и Н7 подтипов показывает замены I9L и Y10H в субъединице HA_1 ; N614W; V615M; K616S и N635T в HA_2 . В К-сайте Н7 подтипа замена N614W приводит к тому, что связывание соединений **161–165** сопровождается образованием π - π катионных стекинг-взаимодействий с ароматическим кольцом W₂614 (таблица 3–9).

Сайт связывания ТБГХ в гемагглютинине Н1 чуть больше сайта связывания в гликопротеине Н7: их площади составляют $750\text{--}800 \text{ \AA}^2$ и $660\text{--}700 \text{ \AA}^2$, соответственно. Энергетические параметры связывания агентов **161–165** в ТБГХ-сайте НА разных подтипов различаются (таблица 3–9). Расположение лиганда **161** в ТБГХ-сайте Н7 характеризуется более низкими значениями энергетических параметров и отсутствием стерических затруднений. Для соединения **162** наблюдается обратная ситуация: анализ энергетических параметров и характер межмолекулярных взаимодействий с а.о. ТБГХ-сайта свидетельствует о том, что аффинность агента **162** к Н1 выше. Неактивное в отношении штамма А/Н7N3 соединение **165** плохо связывается в ТБГХ-сайте НА 7-го подтипа. Об этом свидетельствуют высокие значения энергетических термов связывания (таблица 3–9).

Таблица 3-9 – Результаты молекулярного докинга соединений **161–165** в сайты связывания гемагглютиниона. Нумерация а.о. соответствует PDB коду 1RU7 [20] (H1) и 3M5G [244] (H7). Красным шрифтом выделены различные аминокислоты при одном и том же положении.

Лиганд	IC ₅₀ , μM	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.			Вовлекаемые во взаимодействия фармакофоры
Штамм	A/PR/8/34 (H1N1)				Водородные связи	Другие	Стерические затруднения	
Сайт		К-сайт						
161	13.0±2.0	-8.0	-64.36	-1030.0	N ₂ 595	F ₂ 509 – π-π	F ₂ 509	Гидрофобные, акцептор
162	4.0±0.5	-8.0	-65.17	-1031.1	K ₂ 623	F ₂ 509; Y ₂ 619 – π-π	нет	Гидрофобные, ароматические, акцептор
163	6.0±1.0	-8.3	-66.45	-1030.9	K ₂ 623	Y ₂ 619 – π-π	нет	Гидрофобные, акцептор, ароматические
164	36.0±5.0	-7.5	-57.09	-1030.5	нет	F ₂ 509; Y ₂ 619 – π-π N ₂ 635 – солевой мостик	I ₂ 510; Y ₂ 619; Q ₂ 632; G ₂ 634	Ароматические
165	13.0±2.0	-7.8	-54.35	-1029.7	K ₂ 623	Y ₂ 619 – π-π	K ₂ 623	Гидрофобные, ароматические, акцептор
Штамм	A/Anhui/1/13 (H7N9)							
161	3.0±0.4	-6.4	-57.0	-1040.7	N ₂ 95	W ₂ 14 – π-π	нет	Гидрофобные, ароматические, донор, акцептор
162	30.0±5.0	-6.3	-56.0	-1039.7	I ₁ 10	нет	N ₂ 12; G ₂ 23; T ₂ 135	Гидрофобные, акцептор
163	93.0±11.0	-5.7	-48.1	-1039.3	нет	W ₂ 14 – π-π	Q ₂ 11; R ₂ 25; T ₂ 135; C ₂ 137	Ароматические, гидрофобные
164	8.0±1.0	-7.6	-68.0	-1041.2	W ₂ 14	W ₂ 14 – π-π	Q ₂ 11	Гидрофобные, ароматические
165	>1060	-5.5	-48.5	-1038.5	нет	W ₂ 14 – π-π	L ₂ 17	Ароматические, гидрофобные

Таблица 3–9 – Продолжение.

Лиганд	IC ₅₀ , μM	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.			Вовлекаемые во взаимодействия фармакофоры
Штамм A/PR/8/34 (H1N1)					Водородные связи	Другие	Стерические затруднения	
		ТБГХ-сайт						
161	13.0±2.0	-7.7	-68.9	-1035.6	N ₂ 560; P ₁ 295	W ₂ 592 – π-π	N ₂ 560	Гидрофобные, ароматические, акцептор, донор
162	4.0±0.5	-6.7	-46.7	-1034.6	S ₂ 554	Y ₁ 295 – π-π	K ₂ 558; A ₂ 596	Гидрофобные, ароматические, акцептор
163	6.0±1.0	-6.9	-45.56	-1034.46	нет	нет	Y ₁ 295; V ₂ 555	Гидрофобные
164	36.0±5.0	-6.9	-53.05	-1034.89	нет	Y ₁ 295 – π-π	Y ₁ 295	Гидрофобные, ароматические
165	13.0±2.0	-7.3	-50.55	-1034.85	Y ₂ 295; N ₂ 595	нет	нет	Гидрофобные, акцептор
Штамм	A/Anhui/1/13 (H7N9)							
161	3.0±0.4	-8.7	-55.7	-1041.6	N ₁ 95	F ₁ 294 – π-π	нет	Гидрофобные, ароматические, донор
162	30.0±5.0	-5.6	-48.5	-1041.1	R ₁ 307; N ₂ 95	R ₁ 307; K ₂ 58 – π-катион	P ₁ 293; K ₂ 58; Q ₂ 61	Гидрофобные, ароматические, акцептор
163	93.0±11.0	-5.1	-41.0	-1040.2	нет	F ₁ 294 – π-π K ₂ 58 – π-катион	Q ₂ 61	Гидрофобные, ароматические
164	8.0±1.0	-6.8	-47.1	-1042.0	R ₁ 307	F ₁ 294 – π-π	нет	Гидрофобные, ароматические, акцептор
165	>1060	-4.8	-42.9	-1040.0	Q ₂ 61	нет	K ₂ 58	Гидрофобные, акцептор

Таблица 3–9 – Продолжение.

Лиганд	IC ₅₀ , μM	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.			Вовлекаемые во взаимодействия фармакофоры
Штамм A/PR/8/34 (H1N1)					Водородные связи	Другие	Стерические затруднения	
	A/H1N1	M090-сайт						
161	13.0±2.0	-5.2	-48.4	-1032.7	P ₁ 300; K ₁ 308; Q ₂ 562; W ₂ 592	Y ₁ 309 – π-π	Q ₂ 562; W ₂ 592	Гидрофобные, ароматические, акцептор
162	4.0±0.5	-6.1	-52.0	-1032.5	Y ₁ 309; K ₁ 308	F ₂ 588 – π-π	W ₂ 592	Гидрофобные, ароматические, акцептор
163	6.0±1.0	-6.1	-57.3	-1033.6	Q ₂ 562; W ₂ 592	нет	нет	Гидрофобные, акцептор
164	36.0±5.0	-5.9	-49.0	-1034.9	K ₁ 308	нет	F ₂ 563	Гидрофобные, акцептор
165	13.0±2.0	-5.6	-52.4	-1033.7	Q ₂ 562; W ₂ 592	нет	K ₁ 308	Гидрофобные, акцептор
Штамм A/Anhui/1/13 (H7N9)								
161	3.0±0.4	-6.6	-59.6	-1042.9	R ₂ 85	F ₂ 63 – π-π; T ₁ 301	T ₁ 301; Y ₁ 308	Гидрофобные, Ароматические, акцептор
162	30.0±5.0	-7.5	-57.2	-1043.5	I ₂ 66; R ₂ 85	F ₂ 63 – π-π	T ₁ 301; Y ₁ 308	Ароматические, акцептор
163	93.0±11.0	-7.7	-60.4	-1043.9	T ₁ 301; I ₂ 66; R ₂ 85	F ₂ 63 – π-π	R ₂ 85; W ₂ 92	Ароматические, акцептор
164	8.0±1.0	-6.5	-53.9	-1042.4	T ₁ 301; R ₂ 85	F ₂ 63 – π-π	T ₁ 301	Ароматические, акцептор
165	>1060	-7.3	-56.3	-1043.4	T ₁ 301; I ₂ 66; R ₂ 85	F ₂ 63 – π-π	T ₁ 301	Ароматические, акцептор

Сайт связывания M090, описанный в [74] является фактическим продолжением ТБГХ-сайта. Ряд а.о. входят в оба сайта. Аффинность соединений **161–165** к сайту связывания M090 НА обоих подтипов (Н1 и Н7) соизмерима и практически одинаковая. Анализ результатов молекулярного докинга позволяет предположить, что агенты **161–165** лучше связываются в M090-сайте связывания НА 7-го подтипа, чем 1-го, что противоречит результатам биологических экспериментов. Известно, что процедуры молекулярного докинга могут давать как ложноотрицательные, так и ложноположительные результаты. Подобный результат расчетов позволяет в дальнейшем не рассматривать M090-сайт для связывания агентов **161–165**.

Анализ результатов биологических исследований, позволяет сделать вывод, что агент **161** будет активно ингибировать гемагглютинин 7-го подтипа (Н7), в то время как агент **162**, наоборот, 1-го подтипа (Н1). Анализ результатов молекулярного докинга, позволяет предположить, что соединение **161** лучше связывается в ТБГХ-сайте, а агент **162** – в К-сайте. Причина подобной избирательности заключается в том, что лиганды **161** и **162** относятся к разным классам органических соединений и имеют различный фармакофорный профиль, подходящий к конкретному сайту связывания. Тогда была оценена энергия связывания (ΔG_{bind}) лиганда **161** в ТБГХ-сайтах, а лиганда **162** в К-сайтах гемагглютининов 1-го и 7-го подтипов.

Связывание вещества **161** в ТБГХ-сайте Н1 характеризуется наличием стерических затруднений, в отличие от расположения лиганда данном сайте НА 7-го подтипа. В обоих случаях наблюдается образование водородных связей между кислородом бицикло[2.2.1]гептанового фрагмента соединения **161** и аспарагином в положениях 595 (для Н1) и 95 (для Н7) ([рисунок 3–25А](#)). Расположение агента в ТБГХ-сайте НА 7-го подтипа сопровождается образованием π -катионным стекинг-взаимодействия между бромзамещенным ароматическим кольцом лиганда и ароматическим кольцом фенилаланина F294. Значение энергии связывания (ΔG_{bind}) соединения в Н7 на 9.5 ккал/моль ниже, чем при связывании в Н1. Этот факт может свидетельствовать о более сильных контактах лиганда в ТБГХ-сайте и объяснять наблюдаемую селективную противовирусную активность соединения **161**.

Структурные особенности и подходящий фармакофорный профиль соединения **162** влияет на его комплементарность к К-сайту. Расположение агента **162** в К-сайте НА 1-го подтипа (Н1) характеризуется хорошей кластеризацией и низкими энергетическими параметрами ([таблица 3–9](#)). Лиганд образует π - π стекинг-взаимодействия с ароматическими а.о. F2509 и Y2619. Расположение агента **162** в К-сайте НА 7-го подтипа сильно различается. Триада аминокислотной последовательности NVK во второй субъединице Н1, среди которых присутствует функциональная аминокислота валин V615 (нумерация соответствует PBD коду 1RU7) в Н7 представлена в виде последовательности WMS, где вместо валина находится метионин в

положении 115 (нумерация соответствует PBD коду 3M5G). Ранее в разделе [3.1.3.1.1](#) описано, как изменяется полость сайта связывания и аффинность камфецина при замене V615L

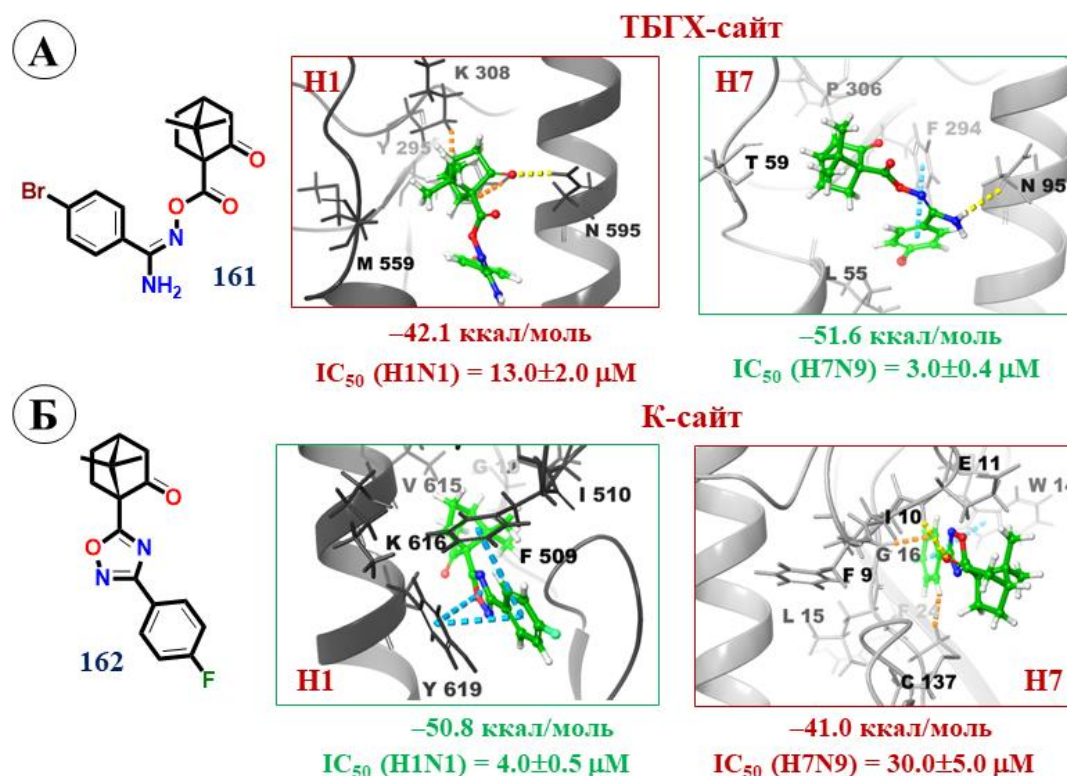


Рисунок 3-25 – Расположение агентов **161** и **162** в сайтах связывания ингибиторов НА разных подтипов по результатам молекулярного докинга: водородные мостики и π - π катион стекинг-взаимодействия показаны желтой и синей прерывистой линиями, стерические затруднения показаны оранжевыми прерывистыми линиями.

Связывание лиганда **162** в К-сайте Н7 сопровождается множеством стерических затруднений (таблица 3–9, рисунок 3–25Б), между атомом кислорода лиганда и I₁₀ образуется водородная связь. Расположение агента **162** в К-сайтах разных подтипов НА отражается в энергии связывания лиганда с белком (рисунок 3–25Б). Комплекс **162**-Н1 на 9,8 кДж/моль более стабилен, чем **162**-Н7. Вероятно, этим также можно объяснить избирательную противовирусную активность **162**.

Таким образом, аффинность рассматриваемых соединений к сайтам связывания НА разных подтипов (Н1 и Н7) различается ввиду различной природы взаимодействия лигандов с а.о. сайтов связывания. Это может объяснить различную противовирусную активность агентов **161** и **162** в отношении разных штаммов вируса, которая наблюдается в тестах *in vitro*. Механизм противовирусной активности исследуемых соединений связан с подавлением фузогенной активности гемагглютинаина. При этом соединение **161** комплементарно к ТБГХ-сайту связывания, в то время как **162** - к К-сайту.

3.1.3.4. Описание механизма противовирусной активности гинсамида и схожих с ним по фармакофорному профилю каркасных амидов [280,281].

Ряд каркасных ацетамидов (**166–168**) был получен на основе сесквитерпеновых соединений – кариофиллена, изокариофиллена и гумулена. Были изучены противовирусные свойства этих соединений и показано, что все они обладают активностью в отношении вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1) (рисунки 3–26). Гинсамид является соединением лидером, подавляющим репликацию разных штаммов вируса. Соединения **166–168** имеют схожую с камфецином жёсткую гидрофобную «клетку», что позволяет предположить наличие аффинности данных соединений к К-сайту гемагглютинаина.

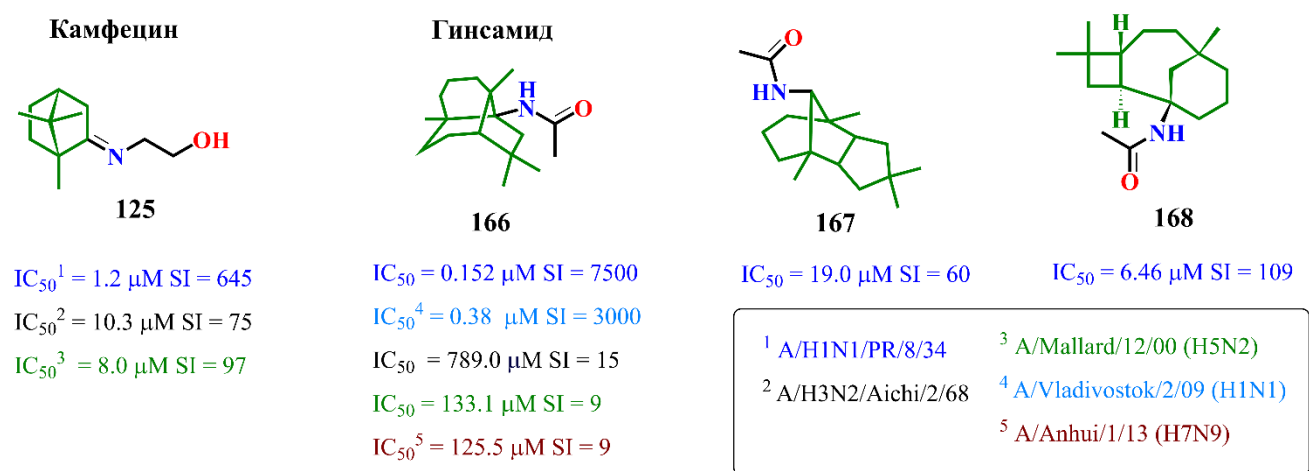


Рисунок 3-26 – Соединения, проявляющие активность в отношении вируса гриппа.

Согласно данным биологических экспериментов, гинсамид (**166**) в субмикромольных концентрациях ингибирует штамм вируса гриппа A/H1N1, в то время как в отношении штаммов A/H3N2 и A/H7N3 проявляет умеренную активность. Результаты эксперимента по времени добавления показывают, что агент **166** активен в промежутке до 2 часов после заражения. Прямые *in vitro* тесты для проверки влияния гинсамида на рецептор-связывающую и фузогенную функции НА объективно показывают, что соединение проявляет анти-фузогенную активность, не влияя при этом на рецептор-связывающую функцию поверхностного белка. Можно предположить, что амид **166** активно ингибирует НА 1-го подтипа (H1), в отличие от H3, H5 и H7. Все эти данные позволяют рассматривать гемагглютинин в качестве потенциальной биологической мишени. Вероятно, гинсамид может связываться со стеблевой частью белка. В теоретических расчетах также учитывался тот факт, что агент **166** имеет схожий с камфецином фармакофорный профиль: жесткий гидрофобный каркас и донорно-акцепторную часть. Кроме того, так же, как и камфецин, гинсамид ингибирует НА именно 1-подтипа и малоактивен по отношению к H3, H5. Различия в аминокислотных последовательностях К-сайта разных типов НА уже обсуждались ранее в разделе 3.1.3.1.1. (рисунки 3–15). Таким образом, процедура

молекулярного докинга соединения **166** с последующей оценкой энергии связывания лиганда и белка была проведена в К-сайт поверхностного белка Н1 подтипа.

Гинсамид и камфецин связываются в К-сайте с практически одинаковыми значениями энергии связывания (рисунок 3–27). Оптимальная докинг-позиция гинсамида характеризуется преимущественно сильными гидрофобными взаимодействиями жесткого каркаса с гидрофобными а.о., такими как валин, лейцин, тирозин. В отличие от камфецина, гинсамид не протонируется, а значит дополнительный реакционный центр в молекуле, способный к образованию водородной связи с окружающими а.о. К-сайта, отсутствует.

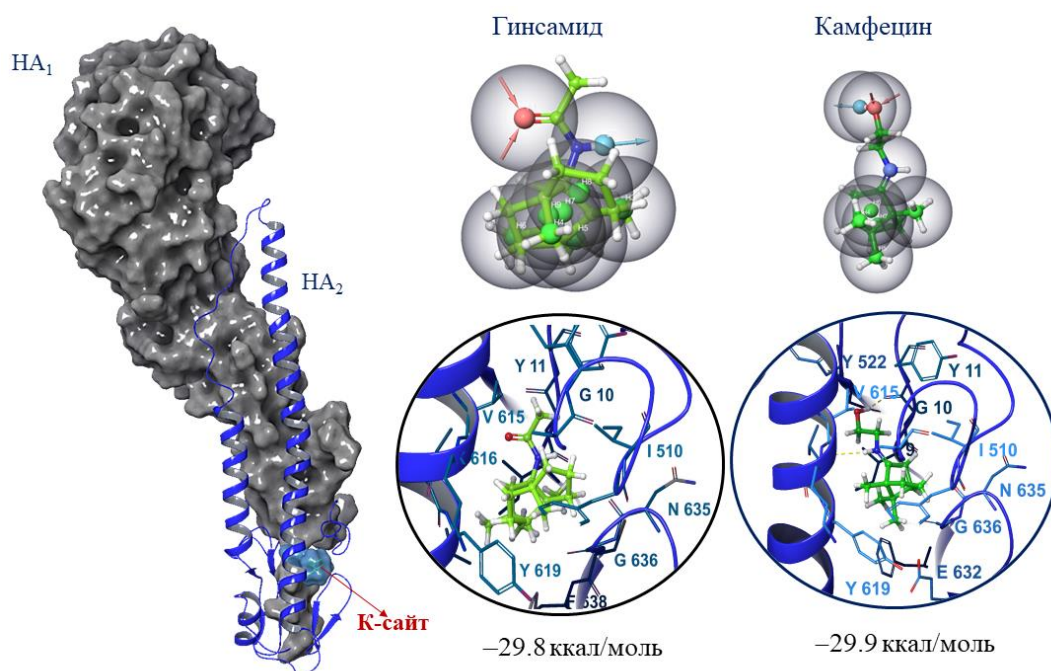


Рисунок 3-27 – Расположение гинсамида в К-сайте гемагглютинине 1-го подтипа: цифрами представлена энергия связывания лиганда и белка (ΔG_{bind}), желтой прерывистой линией показана водородная связь.

Сотрудниками Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера был получен гинсамид-резистентный штамм вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) [280]. Секвенирование гена НА гинсамид-резистентного штамма с последующим аннотированием аминокислотной последовательности позволило идентифицировать ряд аминокислотных замен в гликопротеине, среди которых была замена **V615L** в стеблевой части НА в месте протеолиза, а точнее в К-сайте. Это **именно та же** самая функциональная аминокислота, с которой камфецин образует водородную связь при связывании в месте протеолиза. Кроме того, такая же мутация обнаружена при секвенировании гена НА камфецин-резистентного штамма вируса гриппа. Этот результат еще раз подтверждает, что соединения подобные камфецину, содержащие жесткий гидрофобный каркас и полярные заместители связываются в месте протеолиза в альтернативном К-сайте поверхностного белка вируса гриппа.

Все эти рассуждения позволяют предположить, что амиды **167** и **168**, имеющие схожий с гинсамидом жесткий гидрофобный каркас, также могут связываться в К-сайте (рисунок 3–28) [281]. Оптимальные докинг-позиции амидов характеризуются гидрофобными контактами с окружающими а.о. сайта связывания аналогично расположению гинсамида. При связывании **167** образуется водородная связь между –NH– группой лиганда и I₁₉. Энергии связывания амидов **167–168** с протеином, меньше энергий связывания камфецина и гинсамида в К-сайте, что коррелирует с результатами исследования противовирусной активности данных соединений.

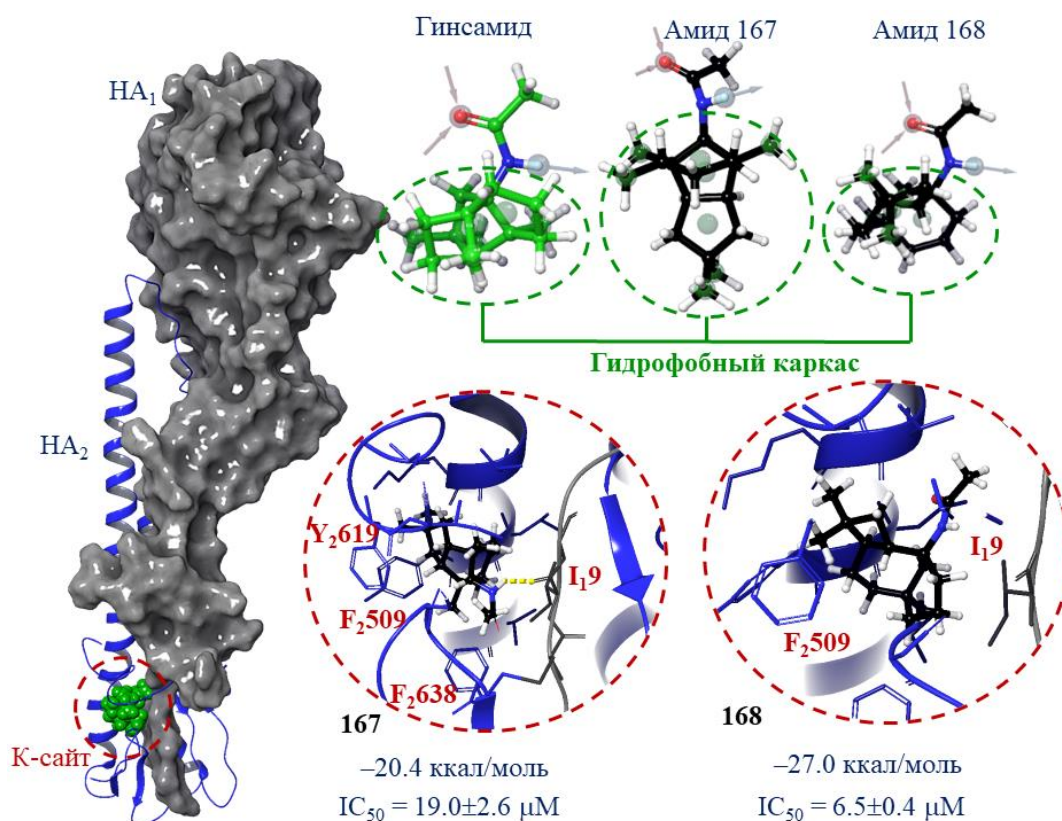


Рисунок 3-28 Связывание соединений **167** и **168** в К-сайте H1: цифрами представлена энергия связывания лиганда и белка (ΔG_{bind}), желтой прерывистой линией показана водородная связь, приведена противовирусная активность соединений в отношении штамма вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1).

Таким образом, результаты теоретических расчетов в совокупности результатами биологических экспериментов еще раз подтверждают наличие К-сайта, расположенного в месте протеолиза стеблевой части гемагглютинаина. Сайт благоприятен для связывания малых молекул, содержащих жесткий гидрофобный каркас.

3.1.4. Связывание камфецина влияет на патогенность мутантного штамма [271].

Камфецин-резистентный штамм вируса гриппа характеризуется значительным снижением вирулентности и патогенности для мышей [277]. Результаты секвенирования

гемагглютинаина камфецин-резистентного штамма позволили определить мутацию V615L в области протеолиза. Оценка полной энергии гемагглютинаина дикого и мутантного типов методом силового поля показала, что поверхностный гликопротеин с мутацией V615L характеризуется меньшим значением полной энергии, чем НА дикого типа [277]. Тогда можно предположить, что мутация V615L может повлиять на конформационную подвижность белка, ограничивая гибкость протеина, что критически сказывается на процессе перехода из префузионной в постфузионную конформацию, и последующего НА-опосредованного слияния мембран. Для подтверждения данной теории в соавторстве со с.н.с. Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова к.х.н. Гуреевым М. А. была оценена степень влияния камфецина на доменные движения гемагглютинаина дикого и мутантного типов (мутация V615L) с помощью серии молекулярно-динамических симуляций в диапазоне от 300 до 600 наносекунд, при $pH = 5$ и $pH = 7$. В качестве коллективных переменных были выбраны расстояния между пептидными цепями и двойной угол дисульфидного мостика (C₂₆₃₇-C₁₈), который соединяет субъединицы гемагглютинаина НА₁ и НА₂. Влияние pH среды было учтено посредством расчёта протонированных форм аминокислотных остатков, их таутомерных форм, а также распределения парциальных зарядов по поверхности белковой структуры рецептора.

В результате проведенных расчетов были получены значения свободных энергий, описывающих процесс перехода белка в активное конформационное состояние при физиологических и пониженных значениях pH среды. Активным конформационным состоянием (ΔG^1) считается такое состояние системы (протеина НА и камфецин-белкового комплекса К-НА), которое благоприятно для начала конформационного перехода из префузионной в постфузионную конформацию (таблица 3–10). На энергетической поверхности замерены минимумы энергий и определены энергетически оптимальные переходы между потенциально возможными конформационными состояниями ($0 \rightarrow 1$). Предположительно стартовая геометрия белка или лиганд-белкового комплекса соответствует некоторому энергетическому минимуму ΔG° (таблица 3–10, рисунок 3–29). Тогда переход системы в активную конформацию (ΔG^1) сопровождается преодолением энергетического барьера ($\Delta \Delta G^\uparrow$) и образованием некоего переходного состояния (ΔG^u). Далее происходит релаксация системы, энергия понижается с образованием активной конформации (ΔG^1). Тогда мы можем объяснить влияние камфецина на конформационные изменения протеина с точки зрения кинетики (обращая внимание на высоту энергетического барьера $\Delta \Delta G$) и с точки зрения термодинамики, оценивая разницу в начальных (ΔG°) и конечных (ΔG^1) энергетических состояниях системы.

Таблица 3-10 – Значения свободных энергий взаимодействия НА с камфецином

#	Система К-НА	pH среды	Энергия системы (ккал/моль)					
			ΔG_0	$\Delta \Delta G \uparrow$	ΔG_{tr}	$\Delta \Delta G \downarrow$	ΔG_1	$\Delta \Delta G_{0-1}$
1	НА _{WT}	5	-40.5	26.8	-13.7	-13.1	-26.8	13.7
2		7	-39.8	26.7	-13.2	-11.0	-24.2	15.7
3	К-НА _{WT}	5	-42.8	30.5	-12.4	-8.3	-20.7	22.1
4		7	-40.7	29.3	-11.4	-6.6	-18.1	22.7
5	К-НА _{V615L}	5	-55.3	33.1	-22.2	-22.4	-44.6	10.7
6		7	-50.8	26.1	-24.7	-14.7	-39.3	11.5
7	К-НА _{V615}	5	-57.1	36.1	-21.0	-21.2	-42.2	14.9
8		7	-48.6	32.4	-16.2	-16.7	-32.9	15.7

В системах (#1–2 [таблица 3–10](#), [рисунок 3–29А](#)) рассматривался дикий тип НА, соответствующий штамму A/H1N1/PR. Результат симуляции МД подтверждает энергетическую выгодность перехода протеина в активную конформацию (ΔG^1) при пониженных значениях pH по сравнению с физиологическими значениями на 2 ккал/моль. Подобный результат коррелирует с общеизвестными данными и позволяет считать данную модель приемлемой [33–35]. При этом высота энергетического барьера практически одинаковая.

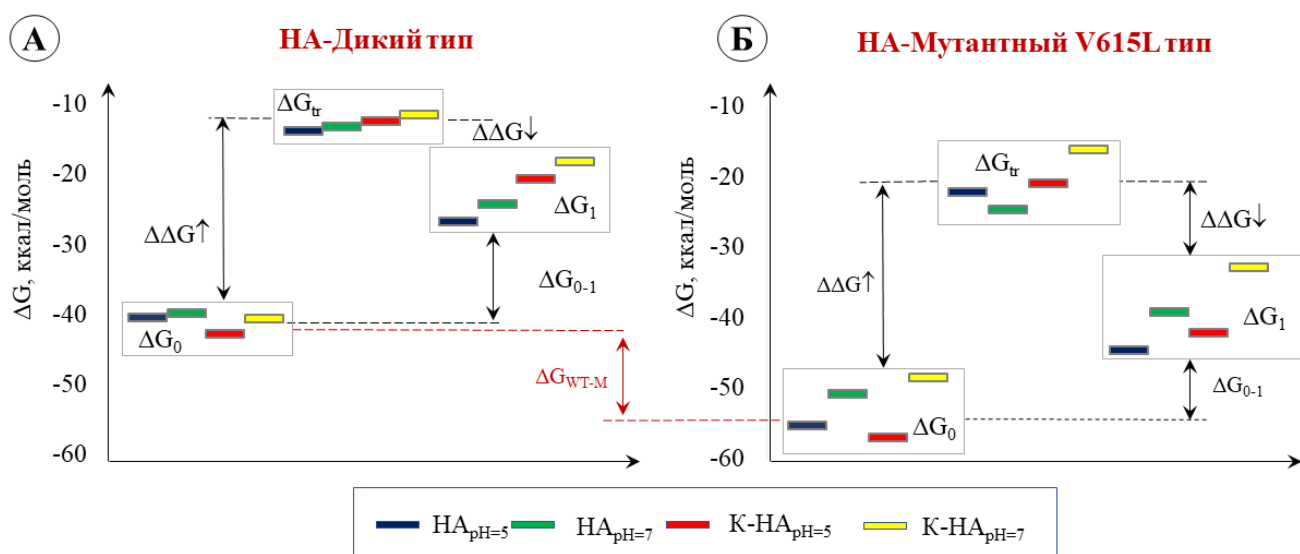


Рисунок 3-29 – Оценённые методами молекулярного моделирования значения свободных энергий НА и комплекса НА-камфецин дикого (А) и мутантного V615L (Б) типов: ΔG_0 – условный энергетический минимум исследуемой системы; $\Delta \Delta G \uparrow$ – повышение энергии системы, сопровождающееся образованием условного переходного состояния (ΔG_{tr}); $\Delta \Delta G \downarrow$ – релаксация системы с образованием активной конформации (ΔG_1); ΔG_{WT-M} – разница в свободной энергии дикого и мутантного типов НА; НА_{pH=5} и НА_{pH=7} – протеин без лиганда, рассчитываемый при пониженных (pH = 5) и физиологических (pH = 7) значениях pH-среды соответственно; К-НА_{pH=5} и К-НА_{pH=7} – лиганд-белковый комплекс.

Присутствие камфецина в К-сайте связывания (системы #3 и 4 [таблица 3–10](#), [рисунок 3–29А](#)) незначительно снижает общую энергию системы. Высота энергетического барьера

($\Delta\Delta G^\ddagger$) комплекса К-НА_{WT} на 3.7 или на 2.6 ккал/моль выше (первая цифра соответствует рН = 5, вторая – рН = 7), чем $\Delta\Delta G^\ddagger$, характеризующего конформационный переход белка без лиганда. Энергетическая разница ($\Delta\Delta G_{0-1}$) лиганд-белкового комплекса и белка составляет 8.4 или 7.0 ккал/моль, в зависимости от рН среды. Образующийся при этом лиганд-белковый комплекс менее стабилен по сравнению с НА_{WT-1} с точки зрения термодинамики. Другими словами, связывание камфецина в НА приводит к энергетическим осложнениям перехода в активную конформацию, связанным с высотой энергетического барьера и образованием нестабильного комплекса К₁-НА_{WT}, независимо от рН среды.

Замена V615L приводит к заметному понижению свободной энергии (ΔG_0) системы (#5 и 6, [таблица 3–10](#), [рисунок 3-29Б](#)), более, чем на 10 ккал/моль по сравнению с НА_{WT}. При рН = 5 высота энергетического барьера ($\Delta\Delta G^\ddagger$) выше по сравнению со значением, характерным для системы НА_{WT}. Так как активация НА происходит именно при пониженных значениях рН, данный результат можно рассматривать в качестве косвенного подтверждения снижения вирулентности мутантного вируса гриппа, описанного в [277]. Для перехода в активное состояние, которое, вероятно, предшествует конформационным перестройкам протеина, системе требуется большее количество энергии.

Связывание камфецина в НА_{V615L} также сопровождается незначительным общим снижением полной энергии системы (#5 и 7, #6 и 8 [таблица 3–10](#)). Однако энергетические характеристики, описывающие процесс перехода из начальной в активную конформацию систем НА_{V615L} и К-НА_{V615L}, отличаются незначительно. Активная конформация протеина одинаково стабильна вне зависимости от присутствия лиганда. Иными словами, наличие камфецина в сайтах связывания НА не осложняет конформационных переходов к активной форме, несмотря на существенные различия в показателях энергий перехода. Известно [277], что противовирусное действие камфецина на мутантный, камфецин-устойчивый штамм вируса гриппа существенно меньше, чем его воздействие на дикий тип.

На основании данных молекулярно-динамических симуляций можно отметить, что камфецин, связываясь в активном сайте в месте протеолиза, энергетически стабилизирует структуру белка в целом, что препятствует его переходу в активное конформационное состояние. Другими словами, гемагглютнину в комплексе с камфецином требуется больше энергии для конформационного разворота и последующего раскрытия белка. Замена V615L в месте протеолиза снижает общую энергию системы, в результате гемагглютнин становится более стабильной структурой. Согласно данным симуляции МД, для начала перехода системе требуется большее количество энергии, однако, когда процесс уже запущен, переход к активной конформации облегчается. Это событие можно связать со снижением вирулентности камфецин-устойчивого штамма вируса гриппа. Повышение стабильности системы при мутации V615L

требует большего количества энергии, которая необходима для преодоления энергетического барьера и последующего раскрытия белка. В результате мутации V615L создаётся стерическое ограничение на позиционирование камфецина в активной полости. Данное событие приводит к снижению аффинности камфецина к мутантному штамму. Несмотря на то, что связывание камфецина в месте протеолиза все же происходит, доменными движениями белка при переходе в активную конформацию этот процесс не мешает.

3.1.5. Большим молекулам – большой сайт связывания

Анализ научной литературы, представленный в п. [1.2.1](#), а также [результаты поиска](#) вероятных сайтов связывания ингибиторов НА позволяют предположить, что ингибиторы НА – это сравнительно небольшие молекулы, размером не более 100 атомов. Однако результаты биологических экспериментов, проведенных коллегами из Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, показывают, что ряд производных фуллерена C_{60} (**169–175**) (проявляют выраженную противовирусную активность против штамма вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) ([рисунок 3–30](#)).

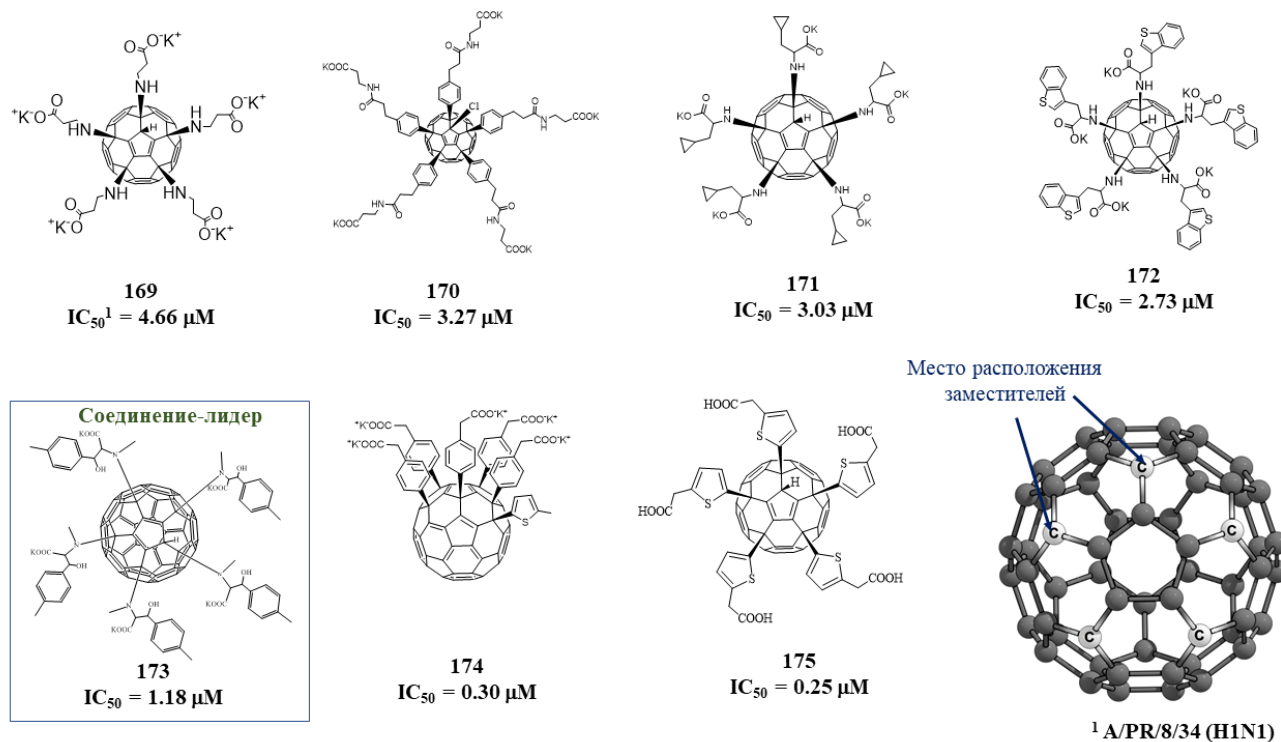


Рисунок 3-30 – Производные фуллерена C_{60} активные в отношении вируса гриппа.

Лиганды представляют собой жесткую основу фуллерена C_{60} и гибкие заместители. Противовирусная активность соединений **169–175** зависит от структурных особенностей заместителей, так как фуллерен C_{60} противовирусную активность не проявляет. Стандартные протоколы молекулярного докинга для оценки аффинности подобных структур, как правило, не

подходят ввиду их объемности и большого размера. По этой причине в ряде случаев были использованы протоколы жесткого и полугибкого докинга, с последующими процедурами молекулярно-динамических симуляций.

Для дополнительных биологических исследований был выбран агент **173**, для которого были проведены прямые анализы проверки влияния соединения на рецептор-связывающую и фузогенную функции гемагглютинаина. Результаты эксперимента показали, что вещество **173** проявляет анти-фузогенную активность и вместе с тем подавляет рецептор-связывающую функцию гликопротеина. Тогда в качестве потенциальной биологической мишени был рассмотрен гемагглютинин вируса гриппа, а в качестве вероятных мест связывания – рецептор-связывающий сайт первой субъединицы белка и эпитоп, расположенный на поверхности стеблевой части белка.

Рецептор-связывающий сайт представляет собой неглубокий карман, расположенный на поверхности глобулярной головки НА и состоящий из аминокислотных остатков 116–261 [289]. Ключевые аминокислоты Y₁₉₈ и W₁₅₃ расположены на дне связывающего кармана [37] и окружены четырьмя вторичными структурными элементами белка, а именно, 130-петлей, 150-петлей, 190-спиралью и 220-петлей.

Ингибирование фузогенной активности НА может происходить за счет связывания соединений **169–175** со стеблевой частью белка. Очевидно, такие громоздкие структуры не будут связываться в малых, рассмотренных ранее, сайтах связывания (ТБГХ-, M090-, К-сайты). Тогда Учитывая это, в качестве вероятного сайта связывания производных фуллерена C₆₀ был рассмотрен эпитоп НА, расположенный на поверхности белка. Различные антитела MAб C179, CR9114 и FI6v3 контактируют с этой поверхностью протеина на границе двух субъединиц, образуя межмолекулярные контакты с аминокислотами со стороны НА₁ 38-41, 291-293 и 318-320 и со стороны НА₂ 18-21 и 36, 38, 41, 42, 48, 49, 52, 56 [57,290].

*3.1.5.1. Оценка аффинности к сайтам связывания соединений **169, 170, 174 и 175***

Расчеты были проведены для соединений **174 и 175** со значениями IC₅₀ не более 0.3 μM. В качестве отрицательного контроля [291] выбрали соединения **169 и 170**, значение ингибирующей активности которых превышает 3 μM. Данные соединения были также отобраны из соображений меньшего размера. Агенты **169, 170 и 174** представляют собой калиевые соли. В расчетных моделях катион калия был удален. При расчете также была рассмотрена возможность протонирования. Процедуры молекулярного докинга для структур **169, 170, 174 и 175** проводили с использованием протокола принудительного (или гибкого) докинга. Дополнительно провели процедуру гибкого докинга для фуллерена.

Фуллерен C_{60} может связываться в рецептор-связывающем сайте (РСС) глобулярной головки HA_1 (рисунк 3–31А) с образованием π - π стекинг-взаимодействия с W₁₅₃ (таблица 3–11). Гидрофобная полость сайта связывания подходит для гидрофобного фуллерена, однако в отсутствии заместителей значимые межмолекулярные контакты (водородные и/или ионные связи) с а.о. не наблюдаются. Т. е. если рассматривать это место связывания в качестве ключевого для подобных лигандов, то на их противовирусную активность однозначно оказывают влияние тип и структура заместителей. К сожалению, в рамках данной задачи привести какой-либо значимый анализ структура-активность не представляется возможным ввиду малого количества рассматриваемых соединений.

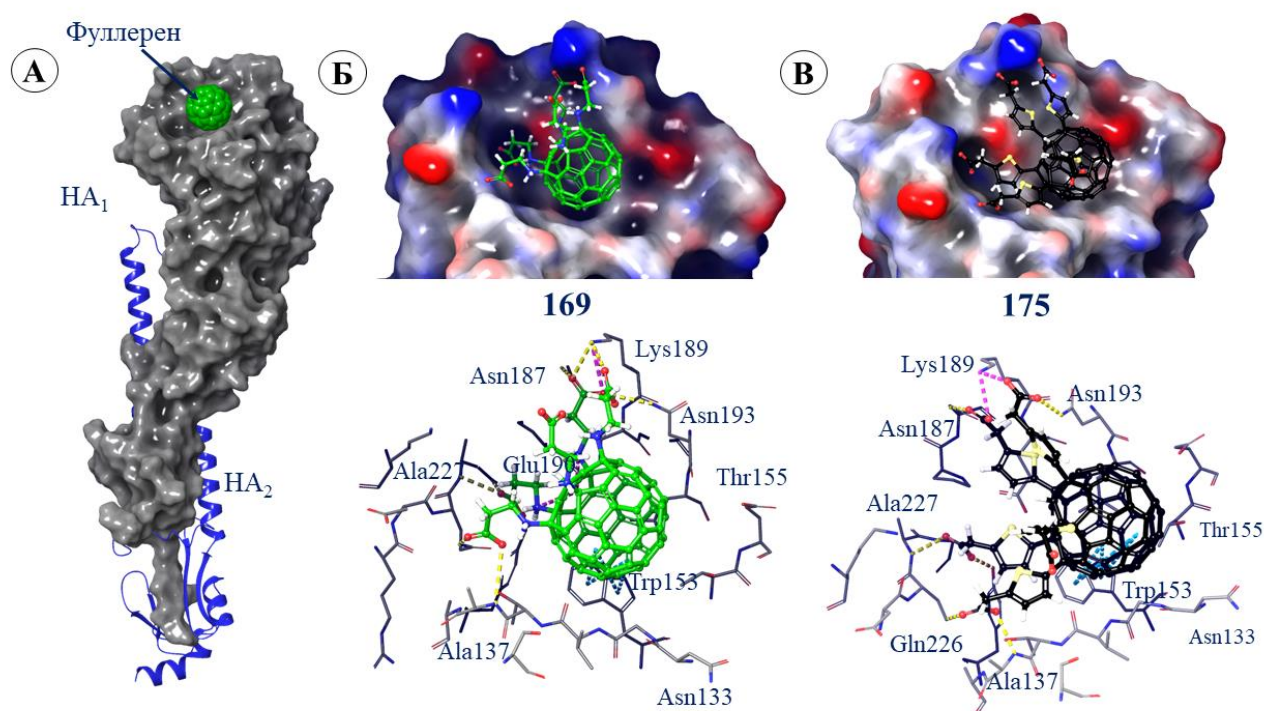


Рисунок 3-31 – Визуализация процедуры молекулярного докинга соединений **169** и **175**: А – расположение фуллерена в РСС, серая поверхность соответствует субъединице HA_1 , синяя вторичная структура – HA_2 ; Б, В – расположение лигандов **169** и **175** в полости рецептор-связывающего сайта. Полость представлена в виде карты потенциалов, где минимальные значения соответствуют красной окраске, максимальные – голубой. Карта потенциалов не является результатом расчета, а построена лишь на свойствах а.о.: положительно-заряженных или отрицательно. Водородные связи и солевые мостики показаны желтыми и фиолетовыми прерывистыми линиями, π - π стекинг-взаимодействие – голубыми линиями.

Фуллерено-подобная основа соединений **169** и **175** укладывается в гидрофобной полости на дне кармана связывания (рисунк 3–31Б и 3–31В). Заместители располагаются в небольших полостях, в соответствии с их донорно-акцепторными признаками. Соединение **169** образует водородные связи с N₁₈₇, K₁₈₉, A₁₂₂₇, A₁₃₇ и солевые мостики с Q₁₉₀ и K₁₈₉ (рисунк 3–29Б). Связывание агента **175** сопровождается формированием водородных связей между

заместителями соединения и аминокислотами 190-спирали: K₁₈₉, N₁₈₇, N₁₉₃; и 220-петли: Q₁₂₂₆ и A₁₂₂₇. Ионные связи наблюдаются при контакте с K₁₈₉ и N₁₈₇ (рисунк 3–31В). Все рассматриваемые лиганды (**169**, **170**, **174** и **175**) хорошо укладываются в полости рецептор-связывающего сайта и образуют множественные контакты с а.о. (таблица 3–11). Кроме того, во всех случаях, кроме агента **170**, результатом докинга является реализация 18 и более позиций из заданных 20. Практически все соединения (кроме **170**) характеризуются высокими значениями аффинности к сайту связывания (более –10 ккал/моль (таблица 3–11). Результаты расчета находятся в согласии с данными биологических экспериментов. Соединения, ингибирующие вирус гриппа в низких концентрациях, характеризуются высокой аффинностью к РСС. Другими словами, производные фуллерена могут связываться с глобулярной головкой поверхностного вирусного белка.

В месте эпитопа лиганды располагаются на границе двух субъединиц (рисунк 3–32), межмолекулярные контакты образуются в основном между атомами заместителей лигандов и а.о., участвующими в связывании антитела mAb [58,59] (рисунк 3–32А, Б).

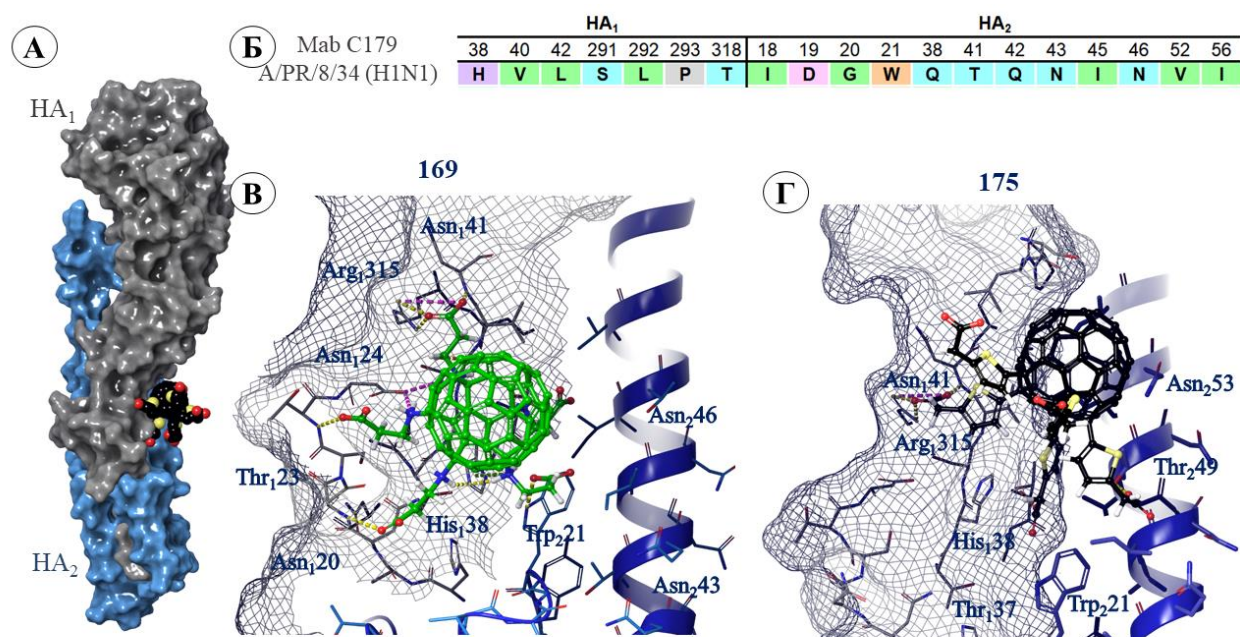


Рисунок 3-32 – Результаты молекулярного докинга агентов **169** и **175** в место эпитопа НА: А – расположение производных фуллерена в эпитопе НА, на границе двух субъединиц, показанных в виде серой (НА₁) и голубой (НА₂) поверхностей; Б – ключевые а.о. участвующие в связывании с антителом mAb; В, Г – расположение лигандов **169** и **175** с визуализацией межмолекулярных взаимодействий: водородные связи показаны желтыми прерывистыми линиями, солевые мостики – фиолетовыми, π -катион стекинг с H₁₃₈ – зеленой линией.

При этом фуллереновая основа остается «снаружи», а в контакты с а.о. вступают в основном заместители. Для всех лигандов реализуется 12 и более позиций докинга (таблица 3–11). Расположение агента **169** сопровождается формированием водородных связей с N₁₂₁, W₂₁,

T₁23, H₁38, N₁41, R₁315 и D₁24, солевого мостика с R₁315 и π -катион стекинг-взаимодействие с H₁38 (рисунок 3–30В, таблица 3–11). При связывании соединения **175** образуются водородные связи между атомами лиганда и а.о. обеих субъединиц белка N₁41, T₁318, T₂49 и солевые мостики с R₁315 (рисунок 3–30Г).

Несмотря на множественность межмолекулярных контактов, аффинность исследуемых лигандов к эпитопу в целом хуже, по сравнению с аффинностью к рецептор-связывающему сайту (таблица 3–11). Другими словами, вероятнее всего, что производные фуллерена C₆₀ будут связываться с глобулярной головкой НА и ингибировать рецептор-связывающую активность белка.

3.1.5.2. Оценка аффинности соединения-лидера **173** к сайтам связывания НА

Использование протокола принудительного гибкого докинга для оценки аффинности агента **173** не увенчался успехом. Известно, что результаты молекулярного докинга могут быть равновероятно ложноположительными и ложноотрицательными. Грамотная интерпретация результатов докинга зависит не только от энергетических параметров, но и от расположения лиганда на поверхности белка. Учитывая структурные особенности соединения лидера, наличие реакционных центров и ароматических колец позволяют предположить, что соединение вполне может связываться с поверхностью протеина, особенно в области рецептор-связывающего сайта, в котором ароматические а.о. Y₁98, Y₁195, W₁153, H₁183 рассматриваются в качестве функциональных и являются ключевыми факторами в распознавании рецептора [36]. Состоящая из набора ароматических (шести- и пятичленных) колец фуллереновая основа лиганда **173** и наличие ароматических колец в заместителях предполагают возможность образования π - π и/или π -катион стекинг-взаимодействий с указанными а.о.

В месте антигенного эпитопа, на границе двух субъединиц НА, располагаются в основном гидрофобные и положительно заряженные а.о., которые могут образовывать водородные связи и/или солевые мостики с атомами лиганда. Другими словами, неудачный расчет с использованием протокола принудительного докинга не гарантирует того факта, что соединение не связывается с поверхностью белка.

Учитывая объем и размеры молекулы, к оценке аффинности лиганда требуется другой подход. Поэтому молекулярный докинг агента **173** проводили в жестких условиях: геометрические параметры лиганда и белка не оптимизировались. Фактически была найдена некоторая стартовая геометрия комплекса, в котором лиганд был просто «расположен» в предполагаемом месте связывания.

Таблица 3-11 – Результаты молекулярного докинга производных фуллерена C₆₀

Лиганд	Кол-во докинг позиций	Docking score, ккал/моль	IFD Score, ккал/моль	Водородные связи	Солевые мостики	π-π стекинг	Ароматическая водородная связь
Рецептор связывающий сайт							
Фуллерен C ₆₀	18	-4.5	-576.3	нет	нет	W ₁ 153	нет
169	18	-10.8	-577.2	T ₁ 136; A ₁ 137; K ₁ 189; Q ₁ 190; Ala227; G ₁ 228	K ₁ 189; Q ₁ 190	W ₁ 153	нет
170	12	-6.2	-568.5	Y ₁ 95; A ₁ 137; Q ₁ 190; A ₁ 227; G ₁ 228	Q ₁ 190	нет	нет
174	18	-11.8	-574.6	A ₁ 137; N ₁ 187; N ₁ 193; A ₁ 227	K ₁ 189; K ₁ 222	нет	нет
175	18	-11.6	-571.9	Y ₁ 95; A ₁ 137; N ₁ 187; K ₁ 189; N ₁ 193; Q ₁ 226; A ₁ 227; G ₁ 228	K ₁ 189	W ₁ 153	Q ₁ 226
Эпитоп HA							
169	12	-8.6	-857.2	T ₁ 21; W ₂ 21; T ₁ 23; H ₁ 38; N ₁ 41; R ₁ 315	D ₁ 24; R ₁ 315	H ₁ 38	W ₂ 21
170	12	-7.7	-875.2	N ₁ 20; Q ₂ 42; H ₁ 38; I ₃ 18	нет	нет	нет
174	16	-10.1	-871.0	T ₂ 49; T ₁ 318	нет	H ₁ 38	нет
175	15	-9.9	-871.9	N ₁ 41; Q ₂ 42; T ₂ 49; R ₁ 315; T ₁ 318	нет	нет	W ₂ 21

Геометрические параметры комплекса были минимизированы молекулярно-динамической симуляцией в течение 2 нс с последующей оценкой энергии связывания лиганда и белка (ΔG_{bind}). Расположение лиганда **173** в сайте связывания рецептора аналогично другим соединениям. Фуллереновая основа соединения располагается в гидрофобном кармане (рисунк 3–33, таблица 3–12), образуя π - π стекинг-взаимодействия между сопряженными циклами и W₁₅₃, расположенным на дне кармана. Дополнительно формируется водородная связь карбонильной группы одного из заместителей лиганда и N₁₉₃ (рисунк 3–33А, таблица 3–12).

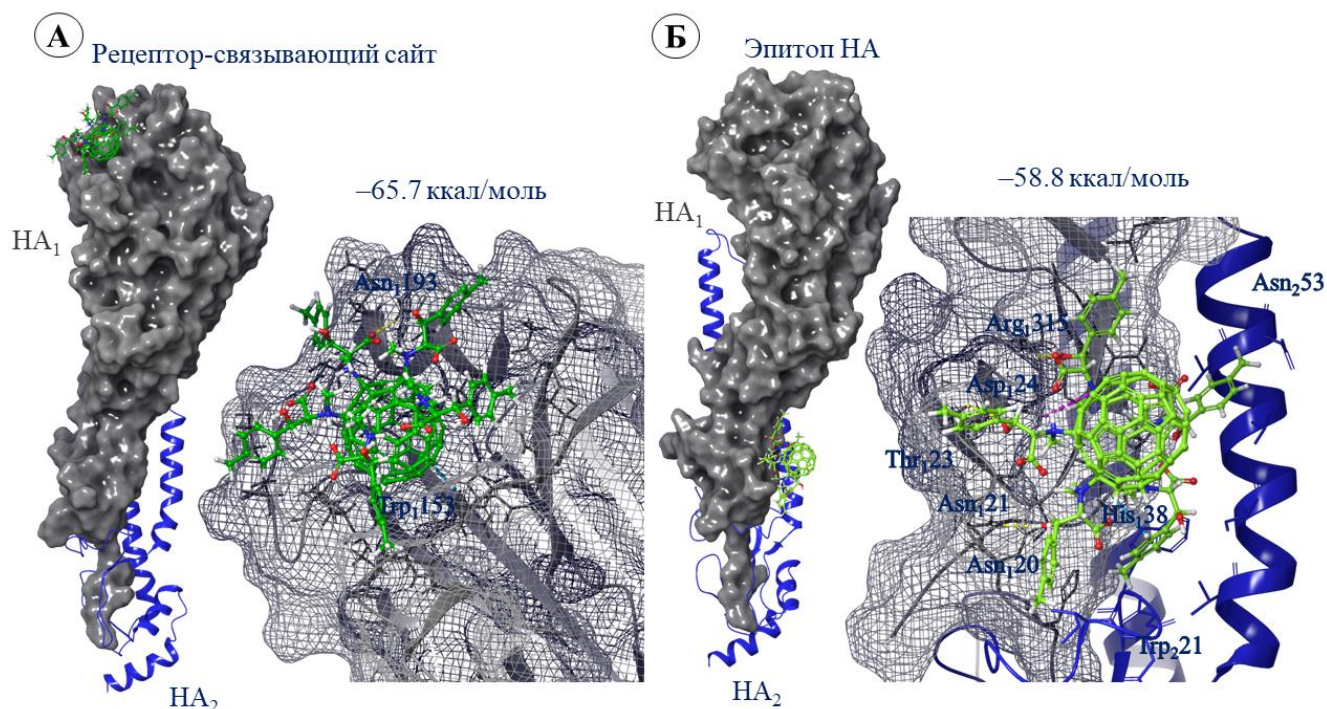


Рисунок 3-33 – Визуализация процедуры жесткого докинга с последующей минимизацией системы в течение 2 нс симуляции. А – связывание агента **173** в рецептор-связывающем домене; В – в эпитопе НА. Цифрами указана энергия связывания (ΔG_{bind}).

Связывание соединения **173** в эпитопе НА характеризуется большим количеством межмолекулярных взаимодействий (рисунк 3–33Б, таблица 3–12) с а.о. первой субъединицы поверхностного протеина НА₁.

Таблица 3-12 – Результаты молекулярного докинга соединения **173** в сайты связывания НА

Рецептор-связывающий домен			Антигенный эпитоп НА		
ΔG_{bind} , ккал/моль	Водородная связь	Взаимодействия с другими а.о.	ΔG_{bind} , ккал/моль	Водородная связь	Взаимодействия с другими а.о.
-65.7	N ₁₉₃	W ₁₅₃ – π - π	-58.8	N ₂₀ N ₂₁ T ₂₃ R ₃₁₅	D ₁₂₄ – солевой мостик H ₁₃₈ – π - π ; π -катион стекинг

Значение ΔG_{bind} при связывании производного **173** в рецептор-связывающем сайте НА₁ почти на 7 ккал/моль ниже энергии связывания лиганда с эпитопом. Этот результат позволяет предположить, что, как и в случае других производных фуллерена (**169–175**), связывание агента **173** в рецептор-связывающем сайте НА термодинамически вероятнее, чем в месте эпитопа.

Учитывая сложности в проведении процедуры молекулярного докинга для соединения **173**, были проведены молекулярно-динамические симуляции в течение 20 нс. Основной целью расчета было оценить время удержание лиганда и определить ключевые взаимодействия между атомами лиганда и а.о. рассматриваемых мест связывания. В расчетах было сделано следующее допущение: молекулярно-динамические симуляции были проведены для комплекса лиганд-протомер белка.

Согласно анализу графика среднеквадратичного отклонения позиции атомов (RMSD) лиганда и белка в комплексе **173-НА**, где лиганд расположен в РСС, можно отметить, что система уравнилась к 10 нс ([рисунок 3–34А](#)) симуляции. В конце симуляции амплитуда возмущения для белка не превышает 2–3 Å, что в целом считается приемлемым, так как структура гемагглютинаина вытянутая, а не глобулярная. Однако, возмущения для лиганда значительны. Это можно объяснить наличием объемных заместителей при фуллереновой основе: большое количество одинарных связей предполагает большое количество степеней свободы и, как следствие, возмущение значений RMSD. Система, соответствующая лиганд-белковому комплексу, в котором лиганд **173** расположен в месте эпитопа гликопротеина, уравнилась к концу молекулярно-динамических симуляций ([рисунок 3–34Б](#)).

Среднеквадратичные флуктуации (RMSF) характеризуют локальные изменения в белке, в частности колебания боковых цепей и свободных петель. Высокие пики на графиках ([рисунок 3–34В, Г](#)) соответствуют заметным колебаниям этих областей белка. Зелеными линиями указаны а.о. которые взаимодействуют с лигандом во время симуляции.

Как и в случае результатов анализа графика RMSD, возмущения в лиганд-белковом комплексе, в котором агент **173** связан в месте эпитопа значительнее, чем при расположении лиганда в РСС. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что контакт производного **173** с глобулярной головкой гемагглютинаина приводит к образованию более устойчивой системы, чем в случае контакта с поверхностью белка в месте эпитопа.

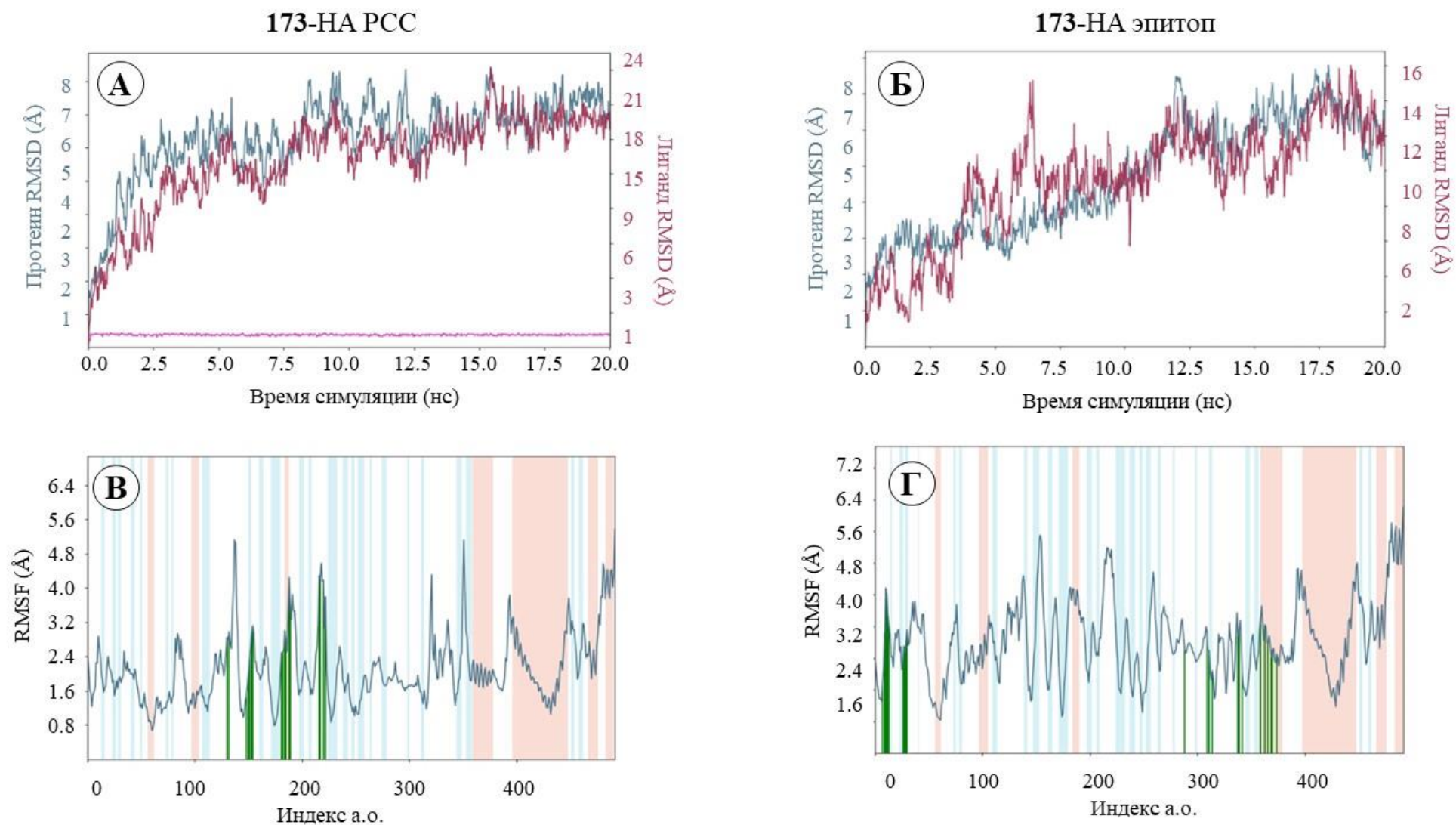


Рисунок 3-34 – Изменение значений среднеквадратичного отклонения атомов (RMSD) и среднеквадратичные флуктуации (RMSF) лиганда и протеина в комплексах **173-НА РСС**, где лиганд **173** связан в области РСС НА, и **173-НА эпитоп**, где лиганд расположен в области эпитопа НА.

В течение всего времени симуляции лиганд перемещается по глобулярной головке поверхностного белка, но не диффундирует в растворитель (рисунк 3–35А). Самые продолжительные межмолекулярные контакты регистрируются между атомами лиганда и Q₁190 и L₁194. Более 50% времени симуляции происходит образование опосредованной водой водородной связи с Q₁190 и гидрофобный контакт с L₁194 (рисунк 3–35Б).

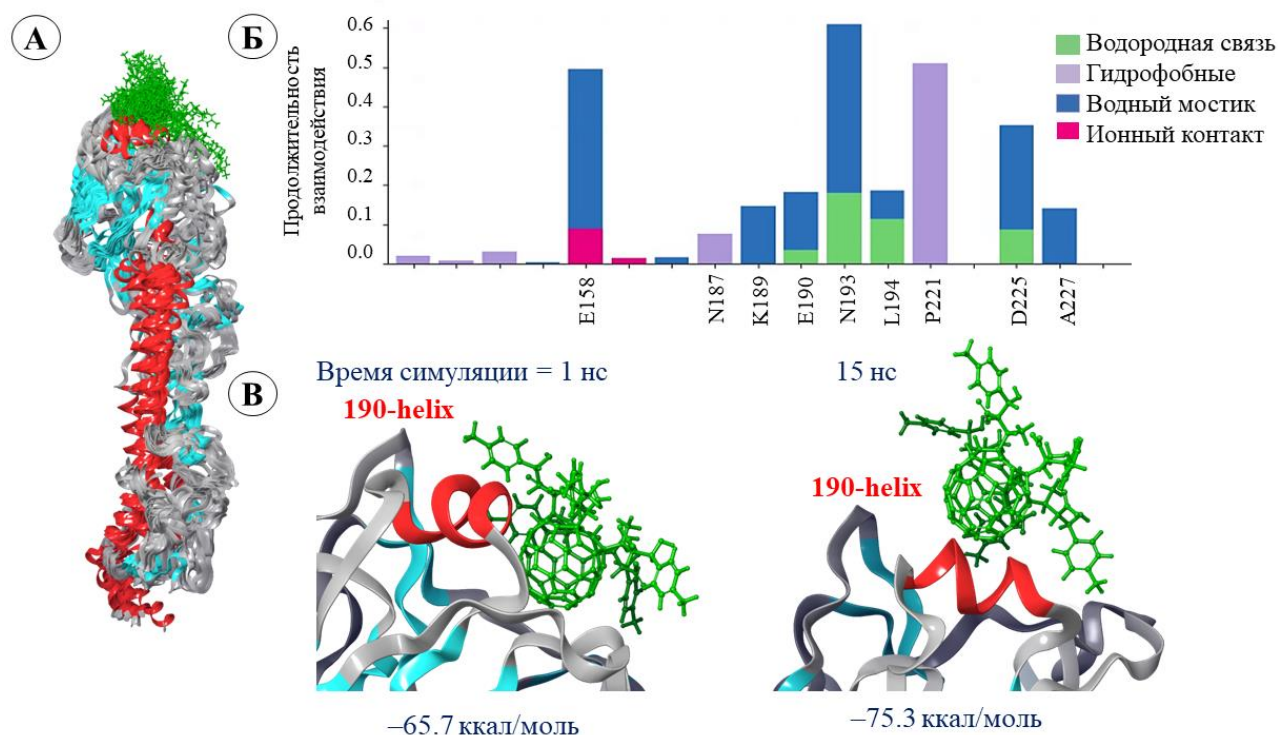


Рисунок 3-35 – Результаты молекулярно-динамической симуляции комплекса **173-НА**, в котором лиганд связан в РСС: А – наложение кадров регистрируемых фреймов, которые показывают изменение вторичной структуры белка, лиганд показан зеленым цветом; Б – регистрируемые контакты с а.о.: водородные мостики показаны на гистограмме зеленым цветом, ионные взаимодействия – фиолетовым, взаимодействия, опосредованные водой – синим цветом. Продолжительность взаимодействия соответствует доле времени молекулярно-динамических симуляций, где 0.6 соответствует 60% времени, в течение которого регистрируется той или иной межмолекулярный контакт. В – изменение положения лиганда относительно 190-спирали рецептор-связывающего сайта.

В течение симуляции лиганд **173** взаимодействует с рядом а.о. рецептор-связывающего сайта, перемещаясь вдоль 190-спирали (на рисунке 3–35В показана красным цветом). При этом лиганд-белковый комплекс, соответствующий 15 нс симуляции, оказался почти на 10 ккал/моль стабильнее стартовой системы.

Анализ поведения лиганда при связывании в месте эпитопа также позволяет отметить перемещение молекулы вдоль поверхности протеина (рисунк 3–36А). При этом расположение лиганда сопровождается образованием межмолекулярных контактов с а.о. обеих субъединиц НА. Тем не менее, продолжительность контактов меньше, чем в случае, когда агент **173** занимает

полость рецептор-связывающего сайта (рисунке 3–35Б). Наиболее продолжительные контакты регистрируются с а.о. HA_1 (водородные связи и солевые мостики). Самый продолжительный контакт отмечается с H_{138} (рисунке 3–36Б), одной из ключевых а.о. эпитопа, принимающего участие в связывании белка с антителами. Анализ геометрических параметров комплекса (рисунке 3–36В) показывает, что расположение лиганда в эпитопе может влиять на геометрические параметры короткой α -спирали. Ранее в работе [45] был описан похожий случай: связывание малой молекулы в месте эпитопа изменяет вторичную структуру гептадных повторов. Результаты были описаны на основании молекулярно-динамических симуляций.

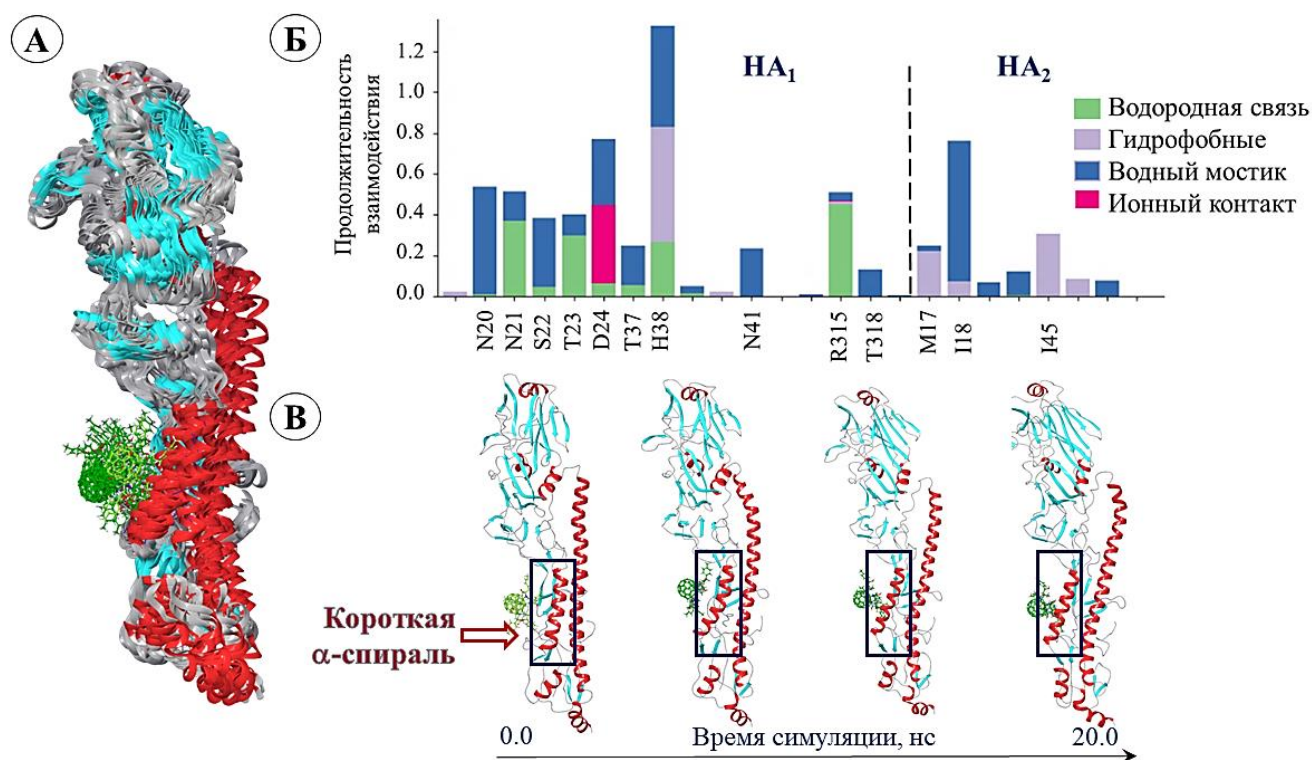


Рисунок 3-36 – Результаты молекулярно-динамической симуляции комплекса **173-НА**, в котором лиганд связан в месте эпитопа: А – изменение вторичной структуры белка, лиганд показан зеленым цветом; Б – регистрируемые контакты с а.о.: водородные мостики показаны на гистограмме зеленым цветом, ионные взаимодействия – фиолетовым, взаимодействия, опосредованные водой – синим цветом. Продолжительность взаимодействия соответствует доле времени молекулярно-динамических симуляций, где 1.0 соответствует 100% времени, в течение которого регистрируется тот или иной межмолекулярный контакт. В – изменение положения лиганда относительно эпитопа и его влияние на короткую α -спираль.

Таким образом, на основании результатов молекулярного докинга активных и менее активных производных фуллерена в отношении вируса гриппа можно предположить, что соединения могут связываться в рецептор-связывающем сайте и в месте антигенного эпитопа гемагглютинина. Анализ энергетических параметров и визуализация результатов молекулярного докинга позволяет сделать вывод, что связывание агентов **169–175** в глобулярной головке НА

термодинамически вероятнее. Однако этот факт не означает того, что лиганды не могут связываться в эпитопе протеина. На данном этапе исследования можно предположить наличие некоторого объединённого эффекта противовирусного действия производных фуллерена. Связывание соединений в РСС, вероятно, может блокировать место контакта с рецепторами, так как расположение лигандов в сайте характеризуются множественными взаимодействиями с а.о. 190-спирали и 220-петли, участвующими в связывании сиаловых кислот.

Интерпретация результатов молекулярного моделирования по связыванию производных фуллерена C_{60} в области антигенного эпитопа гемагглютинаина вируса гриппа неоднозначна. Теоретически, при контакте с поверхностью белка объёмные заместители образуют межмолекулярные взаимодействия с а.о. эпитопа. Можно предположить, что производные фуллерена влияют на вторичные структуры функциональных α -спиралей гептадного повтора, что затрудняет конформационные перестройки белка. На основании анализа молекулярного моделирования можно отметить, что соединение-лидер **173** связывается в обоих сайтах связывания с образованием значительного количества межмолекулярных контактов. В рецептор-связывающем сайте лиганд активно взаимодействует с а.о. 190-спирали и может препятствовать контакту с сиаловыми кислотами. В месте эпитопа он может **повлиять** на геометрию короткой α -спирали. Сколь **значительным** будет это влияние, можно ответить только после масштабных вычислительных экспериментов и дополнительных биологических тестов.

3.1.6. Камфецин и гинсамид – потенциальные ингибиторы протонного М2 канала вируса гриппа [292]

Многочисленные теоретические расчеты в совокупности с экспериментальными данными не оставляют сомнений в том, что гемагглютинин вируса гриппа является биологической мишенью камфецина и гинсамида [271,277,280]. Механизм их противовирусного действия, действительно, связан с ингибированием фузогенной активности НА. Однако фармакофорный профиль ([рисунок 3–37](#)) молекул **125** и **166** с одной стороны, и непосредственное влияние М2 канала на активацию гемагглютинаина с другой, позволяет предположить альтернативный механизм противовирусной активности камфецина и гинсамида, связанный с блокированием протонного канала.

Вероятно, противовирусные агенты **125** и **166** могут связываться внутри поры М2 канала с образованием ряда значимых межмолекулярных взаимодействий. Используя геометрические параметры закрытой и открытой форм М2 протонного канала вируса гриппа (PDB коды 3C9J и 2KQT), были проведены процедуры молекулярного докинга камфецина и гинсамида во внутриканальный сайт связывания поры, расположенный в области трансмембранного домена. В качестве референс-соединения был рассмотрен амантадин. Молекулярный докинг проводили в

условиях, описанных в разделе [2.4](#). На расположение лигандов были наложены позиционные ограничения относительно референс-соединения.

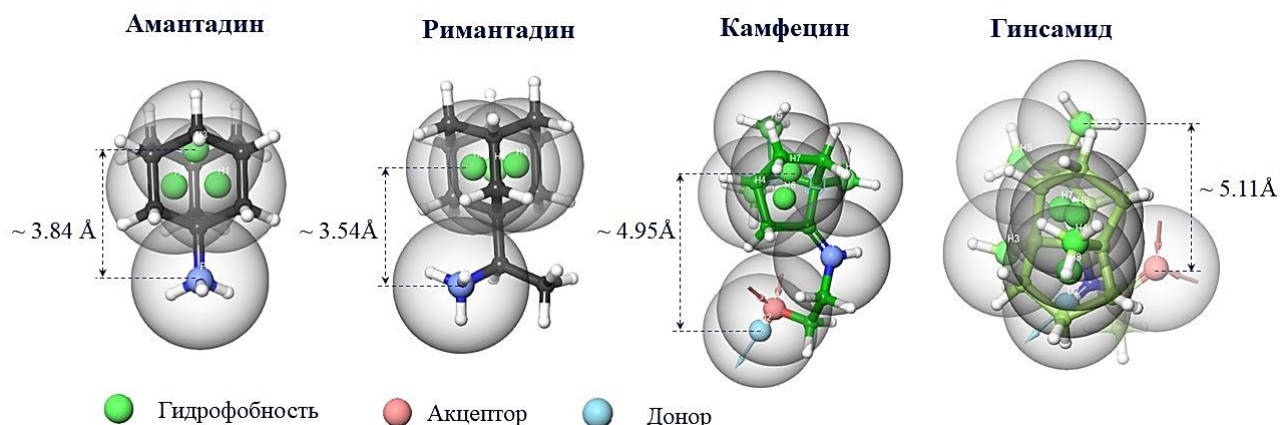


Рисунок 3-37 – Фармакофорный профиль малых молекул – противогриппозных агентов.

Оптимальные докинг-позиции были выбраны на основании минимального значения RMSD, для которых были оценены значения энергии связывания лиганда и белка. Результаты расчетов представлены в [таблице 3–13](#). Значения среднеквадратичного отклонения положения атомов (RMSD), соответствующих расположению амантадина и римантадина в сайте связывания, соизмеримы, и не превышают 0.5 Å. Энергетические параметры связывания также соизмеримы между собой: достаточно высокие значения балла стыковки и энергии кластеризации. Значения энергии связывания (ΔG_{bind}) ингибиторов внутри закрытой формы M2 канала ниже, чем открытой, что **согласуется** с литературными данными [246]. При связывании в открытой конформации наблюдаются лишь гидрофобные взаимодействия между атомами жесткого каркаса **70** и **71** и гидрофобными а.о. V27, A30 и A34. В закрытой конформации регистрируется водородная связь между протонированной $-\text{NH}_3^+$ группой лигандов и атомами S31 (в случае **70**) или A30 (в случае **71**).

Связывание камфецина и гинсамида соответствует соизмеримым значениям энергетических параметров со значениями, характерными для связывания амантадина и римантадина. Расположение молекул **125** и **160** в открытой форме канала также сопровождается образованием гидрофобных межмолекулярных контактов с гидрофобными а.о. В закрытой конформации наблюдается формирование водородной связи между атомом кислорода камфецина и A30 ([рисунок 3–38](#)).

Таблица 3-13 – Результаты молекулярного докинга противовирусных агентов **70**, **71**, **125** и **160** в сайт связывания протонного M2 канала

Соединение	RMSD	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD, ккал/моль	ΔG_{bind} , ккал/моль	Взаимодействие с а.о.
Открытая форма канала: PDB код 3C9J						
амантадин (70)	0.299	-6.52	-34.74	-159.83	-24.38	V27; A30; A34 – гидрофобные
римантадин (71)	0.379	-6.51	-40.32	-167.65	-24.75	V27; A30; A34 – гидрофобные
камфецин (125)	0.593	-5.80	-33.69	-164.75	-48.61	V27; A30; I33; A34 – гидрофобные
гинсамид (160)	1.016	-5.48	-30.96	-150.96	-21.23	V27; A30; I33; A34 – гидрофобные
Закрытая форма канала: PDB код 2KQT						
амантадин (70)	0.377	-6.13	-30.46	-170.83	-38.26	S31 – водородная связь V27, A30 – гидрофобные
римантадин (71)	0.402	-6.39	-37.91	-172.75	-41.71	A30 – водородная связь V27, A30 – гидрофобные
камфецин (125)	0.685	-6.90	-39.25	-173.37	-51.06	A30 – водородная связь V27, A30 – гидрофобные
гинсамид (160)	0.954	-6.33	-28.34	-165.21	-30.58	A30, I33, L38 – гидрофобные

Следует отметить, что энергия связывания (ΔG_{bind}) камфецина в обеих конформациях канала заметно ниже, чем энергия связывания ингибиторов **70** и **71**. Гинсамид же наоборот, образует менее стабильный с точки зрения свободной энергии лиганд-белковый комплекс. Анализ результатов молекулярного докинга позволяет предположить, что камфецин и гинсамид могут связываться в трансмембранном домене протонного M2-канала, аналогично известным ингибиторам амантадину и ремантадину. При этом связывание камфецина предпочтительнее с точки зрения значений свободной энергии связывания.

Необходимо отметить, что для процедуры молекулярного докинга были использованы геометрические параметры протонного канала, советуемого штаммам вируса A/Hong Kong/156/1997 (H5N1) (открытая форма) и A/Udorn/307/72 (H3N2) (закрытая форма). Аминокислотные последовательности трансмембранных доменов M2 каналов консервативны. В положении 31 находится серин. Между тем, ингибирующая активность (IC_{50}) камфецина против вируса гриппа штаммов A/H3N2 и A/H5N1 равна 10.3 μM и 8.0 μM , соответственно, а против штаммов A/H1N1 и A/H1N1pdm2009 – 1.2 μM и 3.8 μM . Гинсамид, аналогично камфецину, проявляет более выраженную активность против штаммов A/H1N1 и A/H1N1pdm2009: 0.15 μM и 10.7 μM , соответственно, и менее выраженную против штамма A/H3N2, равную 789 μM .

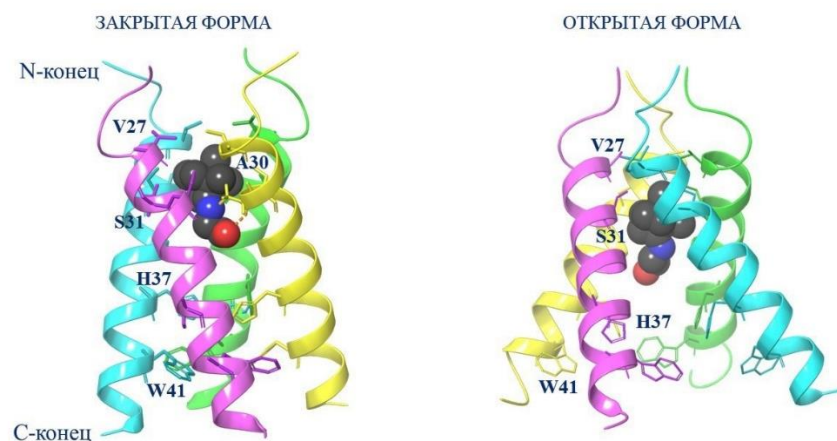


Рисунок 3-38 – Расположение камфецина в закрытой и открытой формах трансмембранного домена M2 канала.

Гомологичная последовательность трансмембранных доменов протонного M2 канала штаммов вируса A/H1N1 и A/H3N2 различается. Как минимум наблюдаются две основные мутации V27A и S31N (таблица 3–14). Кроме того, в трансмембранном домене, соответствующем штамму A/H3N2, в положении 28 находится валин вместо изолейцина (V28I), а в положении 39 изолейцин (I39T) вместо треонина.

Таблица 3-14 – Выравнивание а.о. трансмембранного домена M2 протонного канала разных штаммов вируса гриппа: аминокислотная последовательность M2 канала штамма вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) соответствует Uniprot ID P06821 · M2_I34A1

Штамм	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
A/H3N2	S	D	P	L	V	V	A	A	S	I	I	G	I	L	H	L	I	L	W	I	L	D	R	L
A/H1N1	S	D	P	L	A	I	A	A	N	I	I	G	I	L	H	L	T	L	W	I	L	D	R	L

С учетом сказанного можно предположить, что различная противовирусная активность камфецина и гинсамида по отношению к разным штаммам вируса может зависеть от аминокислотной последовательности именно M2 протонного канала. При этом механизм ингибирующей активности камфецина и гинсамида может быть связан не только с влиянием на фузогенную активность гемагглютинаина, но и с возможностью закупоривания поры канала. Для проверки данной гипотезы необходимо проведение молекулярно-динамических симуляций полноразмерного протонного канала в комплексах с камфецином и гинсамидом.

В некоммерческой базе данных Protein Data Bank представлены геометрические параметры белковых структур протонного M2 канала, в том числе в комплексе с лигандами, полученными экспериментальными (ЯМР высокого разрешения или рентгеноструктурным

анализом) методами. В большинстве случаев это α -спирали ТМД. Полноразмерная структура М2 канала вируса гриппа, в том числе и соответствующая штамму A/PR/8/34 (H1N1) в базе данных отсутствует. По этой причине было принято решение построить полноразмерный белок, используя пакет программ ColabFold [223]. Вначале была предпринята попытка предсказания структуры тетрамера путем введения в блокнот а.о. четырех полипептидных цепей. К сожалению, результат расчета получился неудовлетворительным. Оценка pLDDT показывает, что только трансмембранная часть канала (выделена голубым цветом на [рисунке 3–39А](#)) предсказана хорошо. Короткие петли белка, соответствующие а.о. 47–50 представлены в виде α -спиралей, что не соответствует строению белка. Уровень предсказания амфилипатической спирали (а.о. 51–59) также очень низкий. Попытка предсказания вторичной структуры отдельного протомера мембранного канала оказалась более удачной. По крайней мере, трансмембранный домен (ТМД) предсказан с точностью, приближенной к экспериментальной ([рисунк 3–39А](#)). Однако короткая петля канала снова представлена в виде спирали.

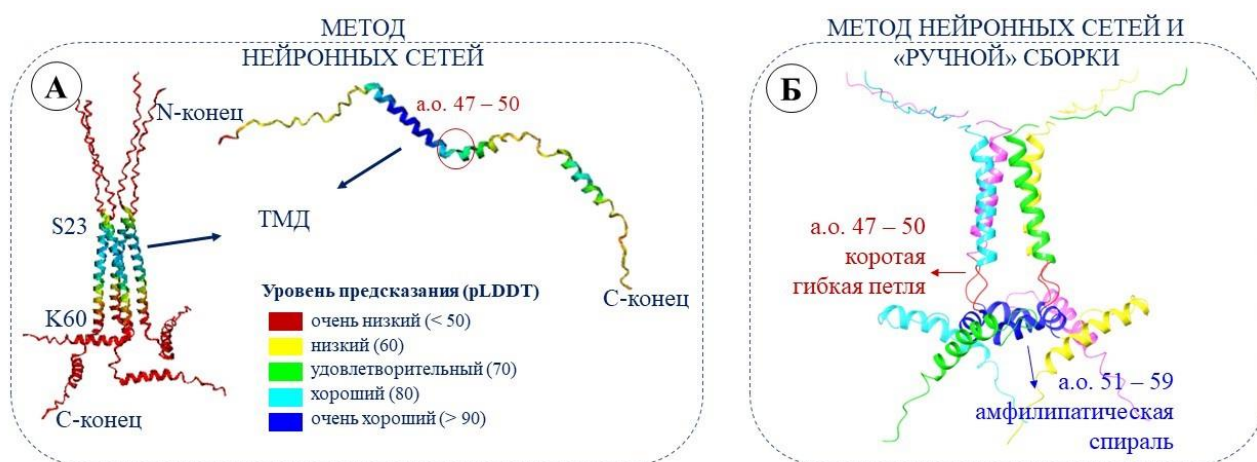


Рисунок 3-39 – Результаты предсказания и сборки мембранного М2 канала, с использованием метода нейронных сетей Colab (А); с совокупностью методов Colab и ручной сборки.

Согласно работе [177] протонный канал М2 состоит из неструктурного топологического домена (а.о. 1–22), пучка α -спирали трансмембранного домена, (а.о. 23–46), короткой гибкой петли (а.о. 47–50), амфилипатической спирали (а.о. 51–59). В предсказанных структурах тетрамера и протомера мембранного канала гибкая петля представлена как продолжение трансмембранного домена спирали (на [рисунке 3–39А](#) выделена красным кругом). Тогда был применен следующий подход: протомер М2 канала был разделен на «домены» (трансмембранный, короткие петли, амфилипатическая спираль, неструктурные части), вторичная структура которых была успешно предсказана. Далее полноразмерный канал был собран, минимизирован методом силового поля, помещен в мембрану и снова минимизирован ([рисунк 3–39Б](#)). В полноразмерной структуре было аннотировано место связывания

ингибиторов виropина. Сайт связывания расположен ближе к N-концу канала и представляет собой гидрофобную полость размером 193 узловых точки и с высоким балансом гидрофобности (11.3 единицы) ([рисунок 3–40](#)). Гидрофобная полость благоприятна для связывания соединений с гидрофобными фармакофорными признаками размером от 64 до 97 атомов, включая водород. Место связывания полностью согласуется с определенными экспериментальными местами связывания ингибиторов M2 канала. Процедура гибкого молекулярного докинга камфецина и гинсамида в M2 канал позволила получить стартовые модельные системы для молекулярно-динамических симуляций.

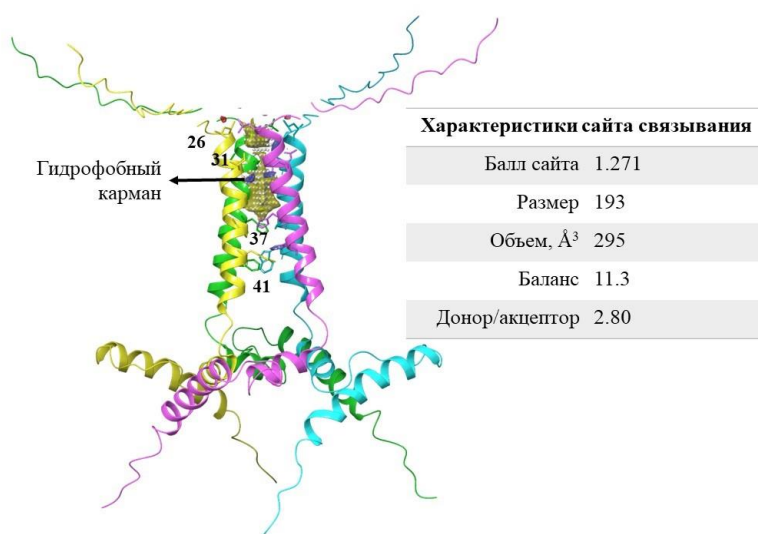


Рисунок 3-40 – Сайта связывания ингибиторов M2 канала в полноразмерном белке

Регистрируемое время симуляции составило 200 нс (5001 фрейм). Анализ изменения среднеквадратичного отклонения положений атомов (RMSD) атомов канала и лигандов свидетельствует о том, что обе системы (**CPH-M2** и **GIN-M2**) уравнились к концу симуляции ([рисунок 3–41A](#) и [B](#)). В обоих случаях колебания укладываются в интервал от 2 до 4 Å, что является допустимым. Анализ значений RMSF свидетельствует, что наибольшим колебаниям подвержены неструктурированные N- и C-концы канала ([рисунок 3–41B](#) и [Г](#)), т. е. свободные части белка.

В течение всего времени симуляции агенты **125** и **160** остаются в сайте связывания и не диффундируют в растворитель. В [приложении](#) данной работы представлены временные шкалы обобщенных межмолекулярных взаимодействий атомов лигандов и специфических а.о. протонного канала ([рисунки 5–1](#) и [5–2](#)).

Оба соединения, **125** и **160**, располагаются в гидрофобном кармане. Продолжительное время камфецин образует водородную связь с A30 (более 40% времени симуляции) и π -катионное стекинг-взаимодействие с H37 (более 25%) ([рисунок 3–42A](#)). Последний контакт может быть

значим ввиду важного функционального значения гистидина. При этом камфецин достаточно подвижен в канале, но в течение всего времени симуляции молекула не только не диффундирует в растворитель, но и не покидает гидрофобной полости связывания канала (рисунок 5–1). Гинсамид взаимодействует с меньшим количеством а.о. при нахождении в поре канала, в отличие от камфецина (рисунок 5–2). Наиболее продолжительным контактом является водородная связь с А30 (рисунок 3–42Б). Предположительно гинсамид плотно «застывает» в поре, с образованием гидрофобных контактов.

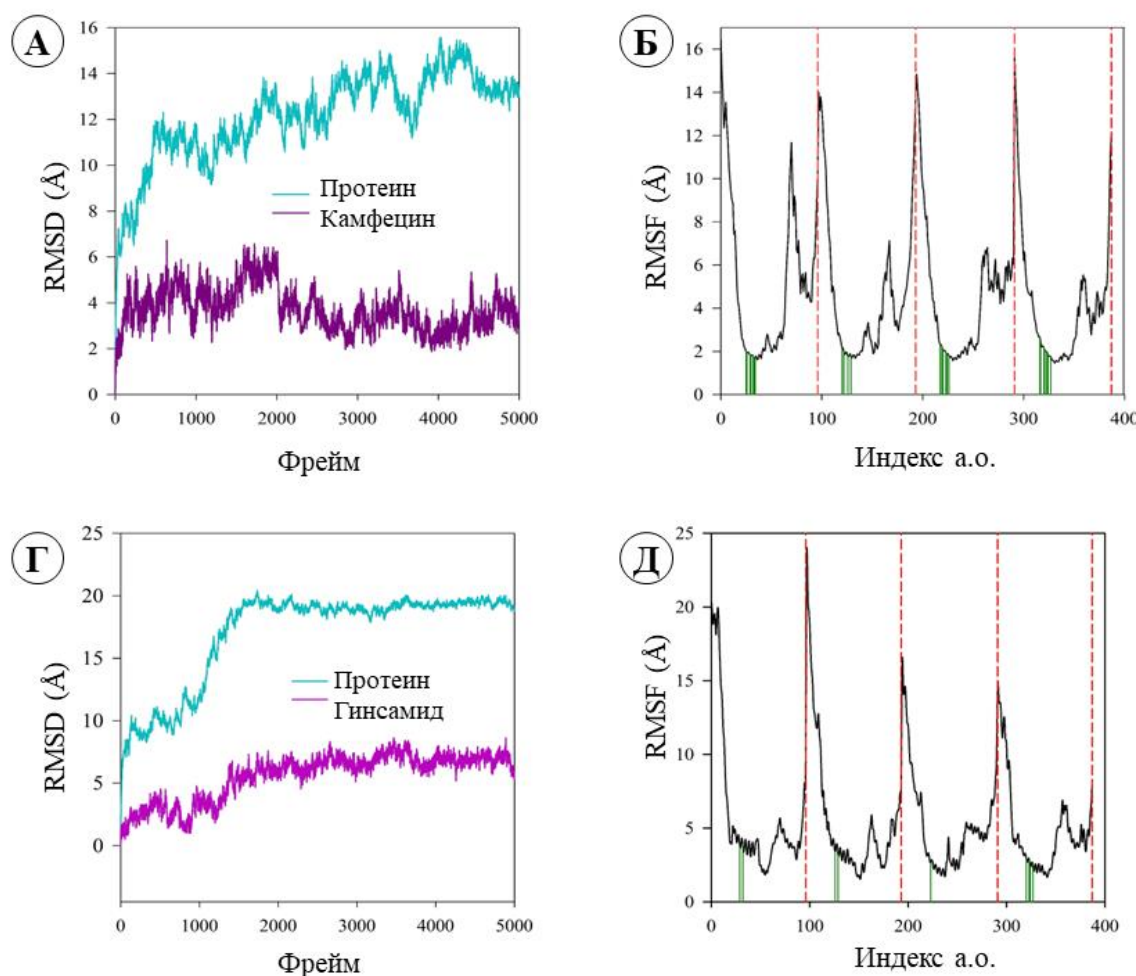


Рисунок 3-41 – Результаты анализа молекулярно-динамических симуляций систем **SNR-M2** (А, Б) и **GIN-M2** (В, Г). Зеленым цветом показаны а.о. остатки, с которыми лиганды образуют межмолекулярные взаимодействия.

Исходя из результатов проведённых расчётов, подтверждается гипотеза о возможном взаимодействии камфецина и гинсамида с M2 каналом в его трансмембранной части за счёт липофильных контактов. Активное задействование аланинов, лейцинов и изолейцинов позволяет сформировать структуру наподобие сэндвича, где реализована стерическая блокировка подвижности трансмембранной части M2 канала. В данной ситуации, при связывании камфецина, происходит формирование энергетически выгодного лиганд-белкового комплекса,

который не способен выполнять свои нативные функции. Данный факт можно рассматривать как элемент **мультицелестной** схемы подавления механизма входа вирусных частиц (в данном случае – вируса гриппа), дополняющий целевую активность, направленную на подавление фузогенной активности гемагглютинаина.

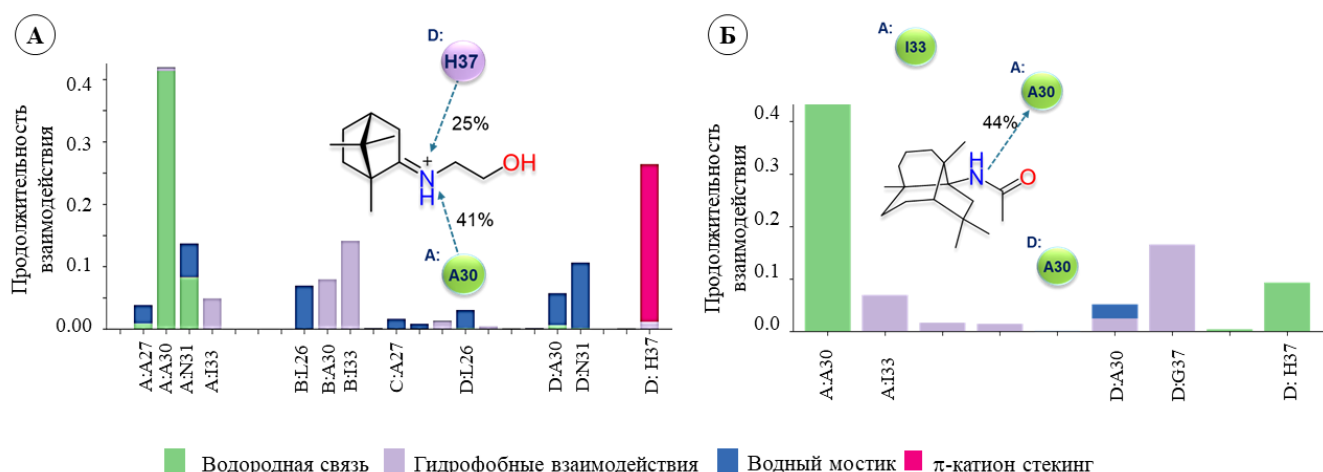


Рисунок 3-42 – Результат молекулярно-динамических симуляций: А, Б – продолжительность межмолекулярных контактов, образующихся между атомами лигандов: камфецина (А) и гинсамида (Б) и атомами а.о. М2 канала. Продолжительность взаимодействий соответствует доле времени молекулярно-динамических симуляций, где значение 0.4 соответствует 40% времени, в течение которого регистрируются межмолекулярные взаимодействия.

Необходимо отметить, что в данной работе был использован уникальный собственный алгоритм для предсказания и сборки полноразмерного протонного М2 канала. Алгоритм представляет собой комбинацию методов молекулярного моделирования, опирающихся на эмпирические данные и расчеты в силовых полях с расширенной параметризацией. Уточнение и коррекция элементов вторичной и третичной структур белка была проведена с помощью методов машинного обучения. Описанный в данном разделе подход может быть использован для предсказания структуры виropинов других вирусных белков, в том числе и патогенных коронавирусов.

3.2. Ингибирующая активность малых молекул в отношении поверхностного белка SARS-CoV-2

3.2.1. Поиск места связывания умифеновира [293]

Ранее в литературном обзоре уже отмечалось, что умифеновир, или арбидол, рассматривался в качестве кандидата на лекарственный препарат против коронавирусной инфекции SARS-CoV-2. Умифеновир (8) (рисунки 1–24), известный противогриппозный препарат, широко используется на территории Российской Федерации против гриппа, и, кроме

того, имеет лицензию на применение в Китае. Согласно [53], Умифеновир демонстрирует широкую активность против ряда штаммов вируса гриппа. Кроме того, в работе [117] показано, что соединение ингибирует вирус SARS-CoV-2 в тестах *in vitro*. Значение 50% эффективной концентрации (EC_{50}) и 50% цитотоксичности (CC_{50}) для арбидола составило 4.11 μM и 31.79 μM соответственно. В другой статье [118] приводятся значения $EC_{50} = 10 \mu M$ и $CC_{50} = 20\text{--}100 \mu M$. Максимальную активность арбидол показывает именно на первых стадиях заражения, т.е. может быть рассмотрен в качестве ингибиторов входа.

Совместно с коллегами из ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», используя лентивирусные частицы, несущие на своей поверхности гликопротеин вируса SARS-CoV-2, провели анализ [293] активности умифеновира (**8**) и другого ингибитора проникновения вирусов – маравирока. Маравирик является ингибитором вируса ВИЧ, взаимодействует с хемокиновым рецептором CCR5 и проявляет активность на ранних стадиях вирусной репликации [294]. В условиях данного эксперимента умифеновир проявляет свою активность с $IC_{50} = 8.32 \pm 3.06 \mu M$ и обладает цитотоксичностью на клетках НЕК293Т в дозе $CC_{50} = 30.99 \pm 3.85 \mu M$. Допущенный к терапии ВИЧ маравирик не проявляет активности в отношении псевдовиральной системы, имеющей белок S на своей поверхности. Результаты данного эксперимента независимо подтверждают, что соединение **8** обладает активностью в отношении вируса SARS-CoV-2, однако терапевтический индекс, отвечающий за эффективность этого агента, невысокий. Тем не менее, значение IC_{50} попадает в интервал опубликованных ранее значений, характеризующих эффективность арбидола 4.1 μM [117] и 10.0 μM [118]. Таким образом, основной биологической мишенью умифеновира является поверхностный S-белок коронавируса SARS-CoV-2.

В разделе [1.2.2.4.](#) упоминаются результаты теоретических экспериментов, опубликованных ранее [55, 56], в которых оценивалась возможность связывания умифеновира в различных областях белка. Так, Ванкадари [119] описывает вероятное место связывания агента **8** в области гептадных повторов S-белка ([рисунок 1–26](#)), а группа авторов [120] рассматривают рецептор-связывающий домен. При этом предполагается, что умифеновир может связываться в зоне контакта домена с клеточным ферментом ([рисунок 1–26](#)).

Для объяснения механизма противовирусной активности умифеновира в отношении SARS-CoV-2 в соавторстве с с.н.с. Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова к.х.н. Гуреевым М. А. и с.н.с. Уфимского института химии УФИЦ к.х.н. Хамитовым Э. М. были проведены масштабные теоретические расчеты. Были проведены молекулярно-динамические симуляции, совмещенные с процедурами гибкого молекулярного докинга и оценкой энергии связывания лиганда и белка. В рамках данной задачи был изменен «шаблонный» подход к подобным теоретическим исследованиям. В большинстве

случаев методы молекулярной динамики используют после процедур молекулярного докинга. Этот подход, безусловно, работает, если достоверно определена не только потенциальная биологическая мишень, но и место связывания рассматриваемого лиганда. В данном случае место связывания умифеновира с поверхностью белка достоверно не определено.

Используя методы молекулярной динамики, была создана модель взаимодействия нескольких молекул умифеновира с рецептор-связывающим доменом и с комплексом РСД-АПФ2. Количество молекул на один протеин было рассчитано, исходя из значений концентраций препарата, используемых в биологических экспериментах. Дополнительно было учтено взаимодействие лигандов с гликозилированной системой РСД-АПФ2, где в положении N₁₃₄₃ расположена молекула олигосахарида. Дополнительно был рассмотрен сайт связывания умифеновира, расположенный в области гептадных повторов пептида слияния S-белка. Принципиально, используемый в рамках данной задачи теоретический подход применяется не впервые. Так, в работе [295] метод мультилигандной реализации был использован для идентификации и характеристики потенциальных сайтов связывания для 10-ти различных биологических мишеней. В другой работе [296] авторы, используя комбинированные методы молекулярной динамики, определяют наиболее вероятные сайты связывания лиганда и биологической мишени. Однако подобные подходы для объяснения механизма противовирусной активности биологически активных соединений в литературе обнаружены не были.

В рамках данной задачи были рассмотрены следующие атомно-молекулярные системы: взаимодействие РСД с некоторым количеством молекул умифеновира/арбидола (RBD-nArb), где n – это количество молекул умифеновира (арбидола) равное 1, 5, 10, 15 и 20, взаимодействие комплекса РСД-АПФ2 (ACE2-RBD-nArb) с n молекулами лиганда ($n = 1, 5, 10, 15$ и 20), взаимодействие гликозилированного домена РСД с n молекулами умифеновира (SUG-RBD-nArb), $n = 1, 20$. И полноразмерная луковичная часть S-белка с тремя молекулами лиганда.

Первой оценкой результатов молекулярно-динамических симуляций является оценка амплитуды флуктуаций среднеквадратичного отклонения положения атомов RMSD систем в течение всего времени симуляции. Флуктуации значений RMSD регистрировались всех рассматриваемых систем и представлены в полном объеме в [приложении](#) данной работы ([рисунок 5–3](#)). Для всех рассмотренных систем изменение значений RMSD для белковых структур (РСД и РСД-АПФ2) и для лиганд-белковых комплексов не является существенным, что означает приемлемое качество моделируемых систем. Флуктуации значений RMSD в пределах 2–4 Å считаются допустимыми для большинства глобулярных белков. Для лигандов в системах, содержащих 1 и 5 молекул умифеновира, наблюдаются возмущения в значениях RMSD, которые исчезают с увеличением числа молекул лиганда. Здесь следует обратить внимание на



Согласно данным работы [297], умифеновир плохо растворим в воде, что сильно влияет на его биодоступность и фармакинетику. Молекулярно-динамические симуляции 20 молекул умифеновира в физиологическом растворе показывают, что к концу симуляций молекулы образуют устойчивые агрегаты (**рисунок 3–43**). Тенденция умифеновира к образованию агрегатов в физиологических растворах, наблюдаемая при моделировании молекулярной динамикой, коррелирует с данными о его плохой растворимости и низкой биодоступности.

Основная цель молекулярно-динамических симуляций – это поиск статистически значимых сайтов связывания умифеновира с поверхностью домена и/или с поверхностью доменно-ферментного комплекса. С этой целью были использованы результаты анализа карт занятости на основе взвешенной атомной плотности и взвешенной атомной занятости, которые позволяют определить, какие аминокислотные последовательности белка преимущественно образуют межмолекулярные взаимодействия с молекулами лиганда. Расположение молекулы (или молекул) регистрируется на каждом фрейме в течение всего времени симуляции. Статистическая обработка изменения геометрических параметров протеина позволяет оценить степень влияния лиганда на вторичную структуру белка.

На [рисунках 3–44 и 3–45](#) показаны карты заселённости (А и В) и анализ изменений вторичной структуры РСД ([рисунк 3–44Б, Г](#)) и комплекса РСД-АПФ2 ([рисунк 3–44Б, Г](#)) в течение молекулярно-динамического моделирования. Размер популяционного «облака» зависит от частоты появления лиганда вблизи поверхности белка, а также от времени удержания лиганда в этом положении. Популяционные карты для остальных изученных систем представлены в приложении данной работы ([рисунк 5–4](#)).

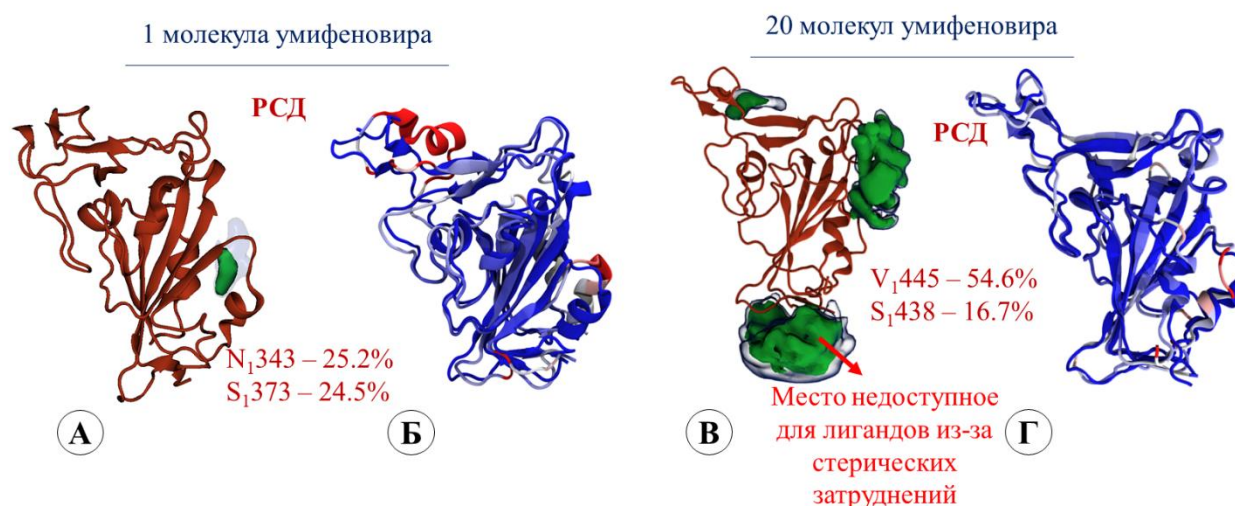


Рисунок 3-44 – Статистическая обработка траекторий молекулярно-динамических симуляций систем RBD-1×Arb и RBD-20×Arb: А, В – карты заселенности, демонстрирующие частоту «появления» лиганда (лигандов) на поверхности белка. Облака указывают на площадь контакта лиганда и белка, в % указано время продолжительности межмолекулярного контакта с указанным а.о. от всего времени симуляции. Б, Г – флуктуация вторичной структуры РСД в присутствии 1 или 20 молекул умифеновира. Сине-красный градиент на вторичных элементах структуры показывает интенсивность структурных изменений: синий цвет указывает на отсутствие изменений, красный – на наличие максимальных изменений.

В системе RBD-1×Arb молекула чаще всего контактирует с а.о. N₁343 и S₁373 ([рисунк 3–44А, таблица 3–15](#)). Эти аминокислоты не входят в контактную область рецептор-связывающего домена, но они также не входят в число запрещенных аминокислот, взаимодействия которых исключены из-за структурных ограничений. Под запрещенной для контакта с лигандом областью подразумевается та часть домена, которая является продолжением S-белка. По этой причине ряд а.о. будут недоступны для лиганда ввиду стерических затруднений. Для мультилигандной системы облака заселенности чаще наблюдаются в области интерфейса взаимодействия домена и фермента. При этом часто регистрируются контакты между атомами лигандов с V₁445 и S₁438 ([рисунк 3–44В, таблица 3–15](#)).

В системе ACE-2-RBD-1×Arb лиганд взаимодействует с а.о. фермента N416 и домена Y₁380, R₁408 ([рисунк 3–45Б, таблица 3–16](#)). При этом вероятность нахождения умифеновира у поверхности фермента несколько выше, чем у поверхности домена. В мультилигандной системе

вероятности образования межмолекулярных взаимодействий между лигандами и аминокислотами фермента и домена примерно равные.

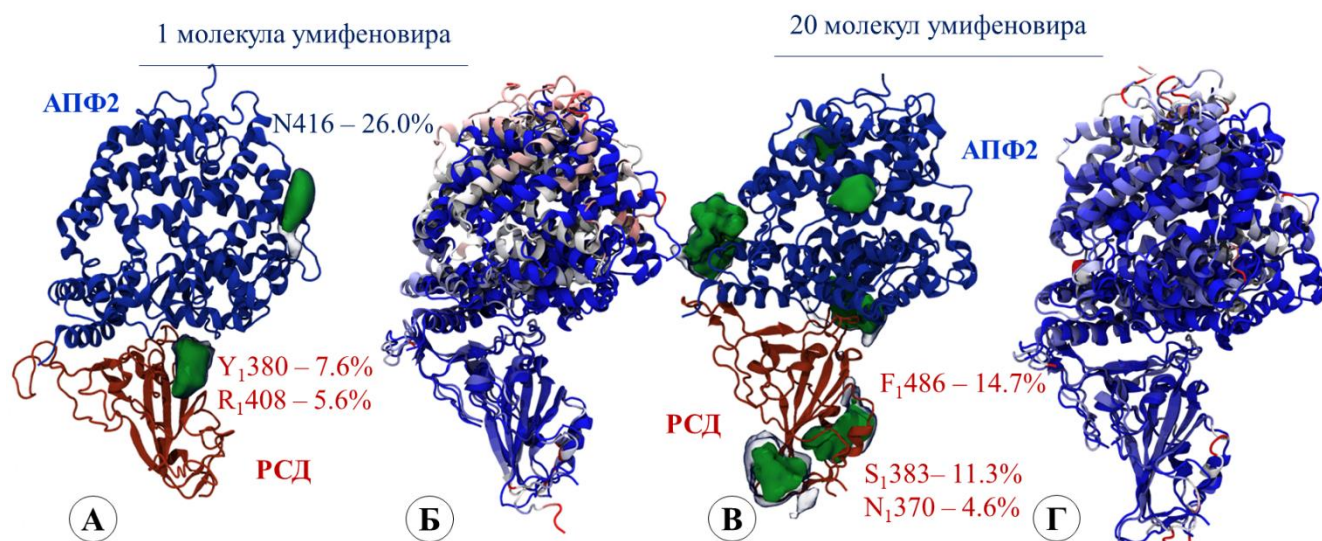


Рисунок 3-45 – Статистическая обработка траекторий молекулярно-динамических симуляций систем ACE2-RBD-1×Arb и ACE2-RBD-20×Arb: А, В – карты заселенности, демонстрирующие частоту «появления» лиганда (лигандов) на поверхности белка. Облака указывают на площадь контакта лиганда и белка, в % указано время продолжительности межмолекулярного контакта с указанным а.о. от всего времени симуляции. Б, Г – флуктуация вторичной структуры комплекса РСД-АПФ2 в присутствии 1 или 20 молекул умифеновира. Сине-красный градиент на вторичных элементах структуры показывает интенсивность структурных изменений: синий цвет указывает на отсутствие изменений, красный – на наличие максимальных изменений.

Анализ изменения вторичной структуры протеина – еще одна возможность оценить место потенциального взаимодействия лиганда с поверхностью домена и комплекса домен-фермент. В системах с одной молекулой лиганда изменения вторичной структуры носят более драматичный характер. На [рисунке 3-44Б](#) обращает на себя внимания α -спираль РСД, окрашенная в красный цвет. Эта часть белка входит в интерфейс контакта домена с ферментом. При исследовании взаимодействия лиганда с комплексом РСД-АПФ2, основное влияние умифеновир оказывает на вторичную структуру фермента ([рисунке 3-45Б](#)). В мультилигандных системах влияние молекул лиганда на вторичную структуру белка выражено слабее. Скорее всего причина заключается в том, что молекулы умифеновира склонны к образованию ассоциатов, на показано на [рисунке 3-43](#) и в приложении ([рисунке 5-4](#)). Анализ карт заселенности ([рисунки 3-44, 3-45](#)) позволяют предположить, что молекулы умифеновира могут связываться в области домена рядом с а.о. N₁₃₄₃. Основываясь на теоретических исследованиях, отметим, что арбидол (или другие потенциальные ингибиторы S-спайка со сходными фармакофорными признаками) может связываться в доменной области, близкой к N₁₃₄₃. Согласно [76,79,298,299], эта кислота является одним из участков гликозилирования РСД. По этой причине был проведен еще ряд молекулярно-динамических симуляций в течение 300 нс

системы RBD-SUG- $n \times \text{Arb}$ ($n = 1, 20$), где было рассмотрено взаимодействие одной и 20 молекул умифеновира с поверхностью рецептор-связывающего домена.

Карта заселенности RBD-SUG-1 $\times$ Arb показывает, что лиганд контактирует с поверхностью белка в области петли с образованием межмолекулярных взаимодействий с а.о. R₁₄₉₁ и Y₁₄₈₉ (рисунок 3–46А, таблица 3–16). На рисунке 3–46Б эта петля, выделенная красным цветом, находится под влиянием лиганда в значительной степени. Анализ симуляции негликозилированной систем RBD $\times$ 1 $\times$ Arb в течение 300 нс показывает, что лиганд чаще контактирует с протеином в области N₁₃₄₃ (рисунок 3–44А), где в течение 25% времени симуляции сохраняется межмолекулярное взаимодействие между атомами лиганда и а.о. (таблица 3–15). При этом дополнительная симуляция этой системы в течение 100 нс при 400 К показывает вероятность контакта умифеновира в области описанной петли интерфейса РСД-АПФ2 (таблица 3–16, рисунок 5–3). Здесь необходимо отметить, что молекулярно-динамическая симуляция показывает вероятность контакта лиганда с поверхностью протеина. И трактовать эти события следует из совокупности получаемых данных, т. е. при взаимодействии одной молекулы с поверхностью РСД обеих систем (RBD-1 $\times$ Arb и RBD-SUG-1 $\times$ Arb) наиболее вероятными зонами связывания следует рассматривать петлю домена, т. е. а.о. R₁₄₅₄; T₁₄₇₀; Y₁₄₈₉; P₁₄₉₁ и полость, расположенную рядом с сайтом гликозилирования с контактными а.о. N₁₃₄₃; S₁₃₇₁; N₁₃₇₀ (таблица 3–16).

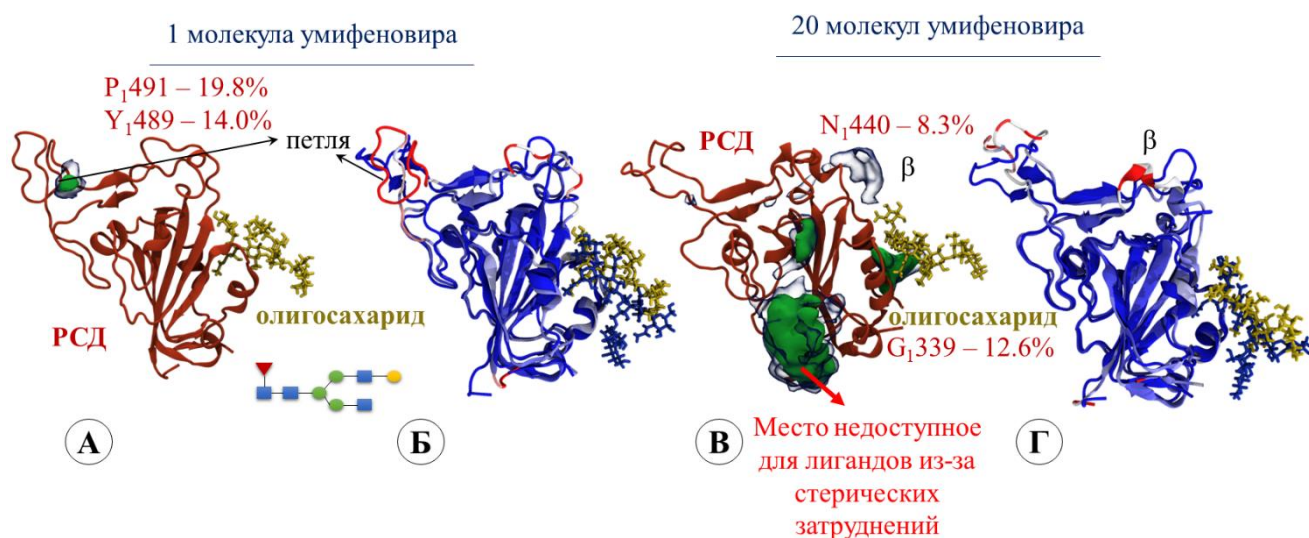


Рисунок 3-46 – Статистическая обработка траекторий молекулярно-динамических симуляций систем RBD-SUG-1 $\times$ Arb и RBD-SUG-20 $\times$ Arb: А, В – карты заселенности, демонстрирующие частоту «появления» лиганда (лигандов) на поверхности белка. Облака указывают на площадь контакта лиганда и белка, в % указано время продолжительности межмолекулярного контакта с указанным а.о. от всего времени симуляции. Б, Г – флуктуация вторичной структуры комплекса гликозилированного РСД в присутствии 1 и 20 молекул умифеновира. Сине-красный градиент на вторичных элементах структуры показывает интенсивность структурных изменений: синий цвет указывает на отсутствие изменений, красный – на наличие максимальных изменений.

Таблица 3-15 – Тип межмолекулярных взаимодействий, регистрируемых в течение времени МД симуляций. Для каждой системы приведены только три а.о., с которыми лиганд (лиганды) контактирует чаще всего. Красным шрифтом выделены области стерических затруднений.

Модельная система (температура симуляции)	А.о.	Тип фармакофора	Тип фармакофора со стороны лиганда	Заселенность, %	Вероятность внутримолекулярного взаимодействия, %	Тип взаимодействия
RBD-1×Arb (310 K)	N343	Донор	O – акцептор	0.8	25.5	H-связь
	S371	Донор	O – акцептор	0.8	24.5	H-связь
	N370	Донор	O – акцептор	0.4	12.6	H-связь
RBD-1×Arb (400 K)	T470	Донор	O – акцептор	0.8	27.6	H-связь
	P491	Донор	Ароматическое кольцо	0.3	10.3	π-катион
	R545	Донор	O – акцептор	0.3	10.3	H-связь
RBD-SUG-1×Arb (310 K)	P491	Гидрофобные		0.4	19.8	Гидрофобные
	Y489	Гидрофобные		0.4	14.0	Гидрофобные
	Y473	Гидрофобные		0.2	9.0	Гидрофобные
RBD-5×Arb (310 K)	G496	Донор	O – акцептор	25.4	35.6	H-связь
	N370	Донор	O – акцептор	13.2	18.6	H-связь
	G446	Донор	O – акцептор	9.8	13.4	H-связь
RBD-10×Arb (310 K)	T393	Донор	Ароматическое кольцо	3.7	9.9	π-катион
	K378	Донор	N – акцептор	3.5	9.4	H-связь
	N343	Акцептор	O – донор	1.8	5.1	H-связь
RBD-15×Arb (310 K)	V362	Донор	Ароматическое кольцо	6.3	16.0	π-катион
	N360	Донор	O – акцептор	6.3	15.9	H-связь
	D389	Донор	O – акцептор	2.6	6.5	H-связь
RBD-20×Arb (310 K)	V445	Донор	O – акцептор	31.3	54.6	H-связь
	S438	Донор	Ароматическое кольцо	9.6	16.7	π-катион
	N388	Акцептор	O – донор	2.6	4.5	H-связь
RBD-SUG-20×Arb (310 K)	G381	Донор	Акцептор	12.5	21.6	H-связь
	G339	Донор	Акцептор	7.4	12.5	H-связь
	N440	Донор	Акцептор	6.7	8.3	H-связь
RBD-20×Arb (400 K)	V445	Донор	O – акцептор	29.3	39.2	H-связь
	S438	Донор	Ароматическое кольцо	6.2	8.3	π-катион
	Q93	Донор	O – акцептор	3.9	5.2	H-связь

Таблица 3-16 – Тип межмолекулярных взаимодействий, регистрируемых в течение времени МД симуляции. Для каждой системы приведены только три а.о., с которыми лиганд (лиганды) контактирует чаще всего. Красным шрифтом выделены области стерических затруднений.

Модельная система (температура симуляции)	А.о.	Тип фармакофора	Тип фармакофора со стороны лиганда	Заселенность, %	Вероятность внутримолекулярного взаимодействия, %	Тип взаимодействия
ACE-2-RBD-1×Arb (310 K)	N456 (ACE-2)	Донор	O – акцептор	1.8	35.1	H-связь
	P263 (ACE-2)	Донор	Ароматическое кольцо	1.4	29.4	π-катион
	A614 (ACE-2)	Донор	O – акцептор	0.6	12.0	H-связь
ACE-2-RBD-1×Arb (400 K)	N456 (ACE-2)	Донор	O – акцептор	1.7	26.0	H-связь
	Y380 (RBD)	Донор	O – акцептор	0.4	7.6	H-связь
	P590 (ACE-2)	Донор	Ароматическое кольцо	0.3	5.6	π-катион
ACE-2-RBD-5×Arb (310 K)	L585 (ACE-2)	Акцептор	O – донор	5.9	23.9	H-связь
	E171 (ACE-2)	Акцептор	O – донор	2.4	9.7	H-связь
	R115 (Ace-2)	Донор	N – акцептор	1.4	5.5	H-связь
ACE-2-RBD-10×Arb (310 K)	N195 (ACE-2)	Донор	O – акцептор	6.0	9.5	H-связь
	K81 (ACE-2)	Донор	N – акцептор	3.9	6.2	H-связь
	Q474 (RBD)	Донор	N – акцептор	3.3	5.3	H-связь
ACE-2-RBD-15×Arb (310 K)	S349 (RBD)	Донор	O – акцептор	18.5	26.6	H-связь
	N354 (RBD)	Донор	O – акцептор	10.2	14.6	H-связь
	S371 (RBD)	Донор	O – акцептор	2.9	4.3	H-связь
ACE-2-RBD-20×Arb (310 K)	S383 (RBD)	Донор	O – акцептор	11.1	11.6	H-связь
	A522 (RBD)	Донор	O – акцептор	8.2	8.5	H-связь
	T393 (RBD)	Донор	Ароматическое кольцо	6.4	6.7	π-катион
ACE-2-RBD-20×Arb (400K)	K61 (ACE-2)	Донор	N – акцептор	13.0	15.2	H-связь
	F486 (RBD)	Донор	O – акцептор	12.6	14.7	H-связь
	T582 (ACE-2)	Донор	O – акцептор	9.6	11.3	H-связь

Увеличение количества молекул умифеновира несколько меняет место контакта ввиду склонности этого вещества к образованию агрегатов. По совокупности данных можно отметить контактными с лигандом аминокислоты в интерфейсе фермент-домен ближе к N-концу (V₁₄₄₅; S₁₄₃₈; N₁₃₈₈) и в месте гликозилирования (G₁₃₃₉) (рисунки 3–46В), несмотря на наличие полисахарида, привязанного к N₁₃₄₃. При этом степень влияния молекул умифеновира на петлю домена несколько снижена (рисунки 3–46Г). Большее изменение вторичной структуры наблюдается в β-листе в области N₁₄₄₀. В этом случае данные области протеина остаются доступны для контакта с лигандами, несмотря на наличие углеводного остатка. Углеводный остаток представляет собой подвижную боковую цепь. С другой стороны, умифеновир представляет собой молекулу, насыщенную различными фармакофорными областями, такими как ароматические кольца и области донорно-акцепторного взаимодействия. Эти особенности молекулы проявляются в ее возможности образовывать различные межмолекулярные контакты как с аминокислотами, так и с углеводными остатками.

Статистическая обработка результатов молекулярной динамики помогла идентифицировать потенциальные места связывания умифеновира с поверхностью белка. Исследование модельных систем RBD-nArb; RBD-SUG-nArb и ACE-2-RBD-nArb (n = 1, 5, 10, 15, 20) привело к определению ряда а.о. (рисунки 3–44 – 3–46 таблицы 3–15, 3–16), которые могут с высокой вероятностью образовывать межмолекулярные контакты с молекулами лиганда. Все это позволило идентифицировать потенциальные места связывания умифеновира в рецептор-связывающем домене поверхностного белка. В РСД было определено 3 вероятных сайта связывания: один расположен на границе взаимодействия фермента и домена, и два – в непосредственной близости к области гликозилирования. Дополнительно была оценена аффинность умифеновира к сайту связывания, описанного в работе [120].

Необходимо отметить, что, согласно результатам анализа траектории МД симуляций, вероятность контактов лиганда с указанными в публикации а.о. невысокая (рисунки 3–47А). Поэтому сайт 1 был рассмотрен только исходя из данных, приведенных в работе [120], а сайты 2–4 были идентифицированы на основании данных молекулярно-динамических симуляций. Далее была проведена процедура гибкого молекулярного докинга с целью оценки аффинности умифеновира к сайтам 1–4. Согласно анализу результатов молекулярного докинга, аффинность умифеновира к сайтам 1–3 незначительна (рисунки 3–47). При этом энергетические параметры связывания практически одинаковы (таблица 3–17). Высокую аффинность лиганд проявляет к сайту, расположенному в области гликозилирования (сайт 4). Лиганд образует водородную связь с D₁₃₆₄ и π-π стекнинг-взаимодействие с ароматическим кольцом F₁₃₃₈.

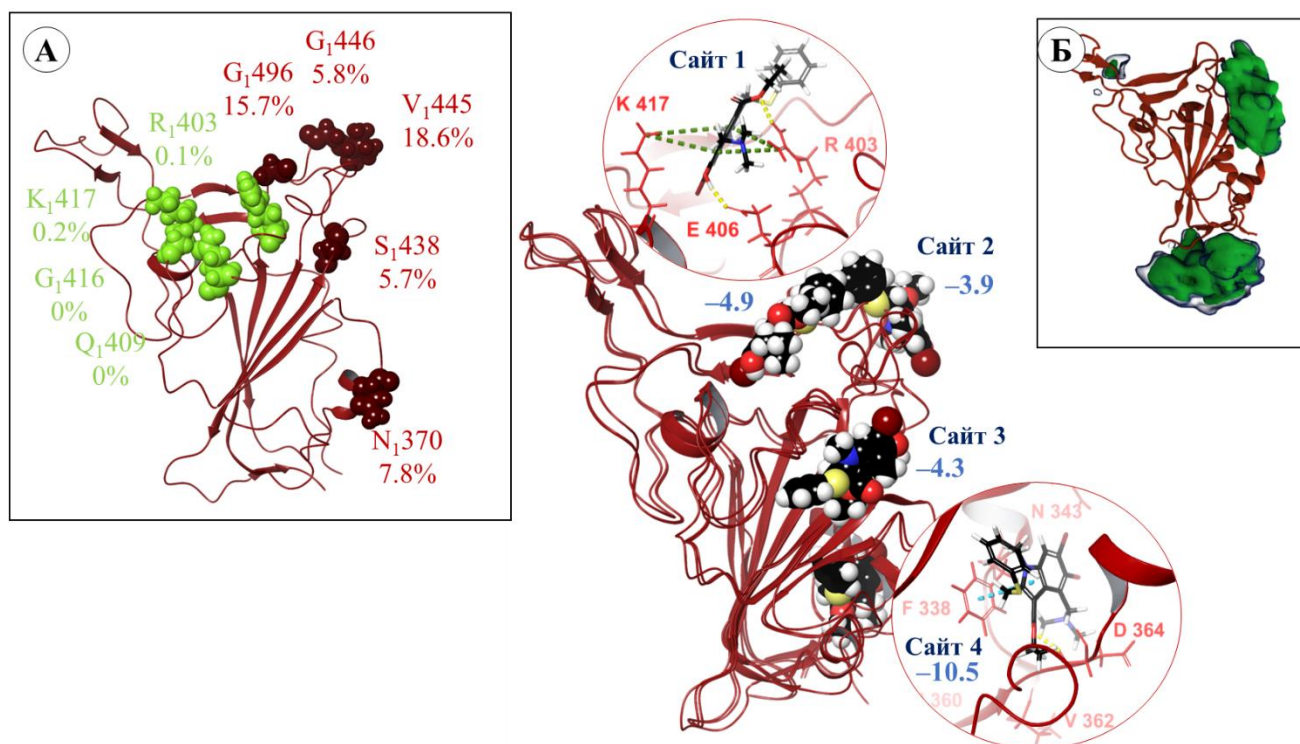


Рисунок 3-47 – Результаты молекулярного докинга в потенциальные сайты связывания РСД S-белка. Синими цифрами указаны энергетические параметры аффинности умифеновира (docking score) в ккал/моль. Водородные связи и солевые мостики показаны желтой и фиолетовой прерывистыми линиями, π -катион и π - π стеклинг-взаимодействия зелеными и голубыми линиями, соответственно. А – аминокислотные остатки, с которыми наиболее вероятно взаимодействие молекул умифеновира, показаны темно-красным цветом; светло-зеленые а.о. описаны в [120] в качестве контактных с умифеновиром. В – показаны взвешенные заселенности молекулами умифеновира поверхности белка в результате статистической обработки данных молекулярно-динамической симуляции системы RBD-20×Arb.

Таблица 3-17 – Результаты молекулярного докинга умифеновира в вероятные сайты связывания РСД S-белка SARS-CoV-2

Сайт связывания	Docking score, ккал/моль	LE	Emodel	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.	
					Водородные связи	Другие
Сайт 1	-4.9	0.17	-56.8	-379.0	R1403 E406	K417 R403 π -катион
Сайт 2	-3.9	0.13	-42.5	-387.3	V445	N439 – солевой мостик
Сайт 3	-4.3	0.15	-47.6	-388.0	нет	нет
Сайт 4	-10.5	0.36	-88.7	-397.3	D364	F338 π - π
Сайт 4* (RBD-SUG)	-9.9	0.34	-84.8	-411.0	NAG	F373 π -катион F374 π - π

В непосредственной близости к а.о. N1343 наблюдается ряд гидрофобных карманов (рисунок 3–48), в которых могут располагаться части молекулы арбидола.

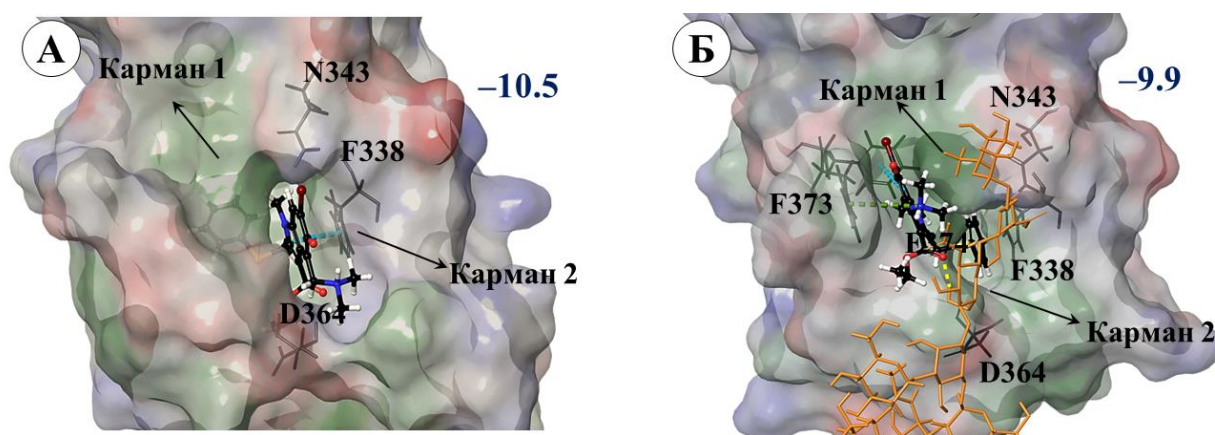


Рисунок 3-48 – Гидрофобные карманы сайта 4, расположенного в области гликозилирования: А – связывание умифеновира в РСД без олигосахарида, Б – в РСД с молекулой олигосахарида (показана оранжевым цветом). Водородные связи показаны прерывистой желтой линией, π - π стекинг и π -катион стекинг – голубой и зеленой. Синими цифрами указаны энергетические параметры аффинности умифеновира (docking score) в ккал/моль.

В отсутствии олигосахарида на поверхности РСД в гидрофобном кармане 1, насыщенном гидрофобными а.о. V₁₅₁₁, L₁₅₁₃, F₁₃₄₂, F₁₃₃₈, C₁₃₃₆, L₁₃₅₅ располагается ароматическое кольцо лиганда. Индольный фрагмент образует π - π -стекинг-взаимодействие с F₁₃₃₈, карбонильный кислород – водородную связь с D₁₃₆₄. Во втором кармане протонированный диметиламмоний образует гидрофобные контакты с V₁₃₆₂, L₁₂₂₄, C₁₃₃₆, P₁₃₃₇ (рисунок 3–48А). Присутствие углеводного остатка создает незначительное стерическое затруднение, в результате чего молекула арбидола «разворачивается», и ароматический заместитель укладывается в гидрофобном кармане 2 (рисунок 3–48Б). Водородная связь между карбонильным кислородом и NAG не позволяет умифеновиру глубже погрузиться в гидрофобный карман 1. Кроме того, индольная часть молекулы образует π - π стекинг-взаимодействие с F₁₃₇₄, а протонированный азот – π -катионное стекинг-взаимодействие с A₁₃₇₃. При этом аффинность лиганда по отношению к описанному месту связывания от присутствия углеводного остатка зависит слабо (таблица 3–17). Таким образом, наличие углеводного остатка рядом с N₁₃₄₃ оказывает влияние на расположение умифеновира относительно поверхности протеина, но при этом вероятные зоны контакта лиганда с поверхностью белка остаются практически прежними.

В комплексе домен-фермент молекулы умифеновира с приблизительно равной вероятностью контактируют с поверхностью фермента и домена (рисунок 3–49А). На основании данных статистики (рисунок 3–49Б) в качестве потенциальных сайтов связывания были рассмотрены две области, расположенные в интерфейсе связывания домена и фермента: сайты 1 и 2. Первый сайт, расположенный в месте контакта петли домена поверхностного белка и спирали фермента, включает себя аминокислоты F₁₄₈₆, S₁₄₇₇ со стороны домена, и T₈₂, T₂₁, Q₈₇, Y₈₃ со стороны фермента. Вторым сайтом (сайт 2 – снаружи), выбранным на основании МД

симуляций, расположен рядом с аминокислотой фермента K61, с внешней стороны поверхности белок-белкового комплекса.

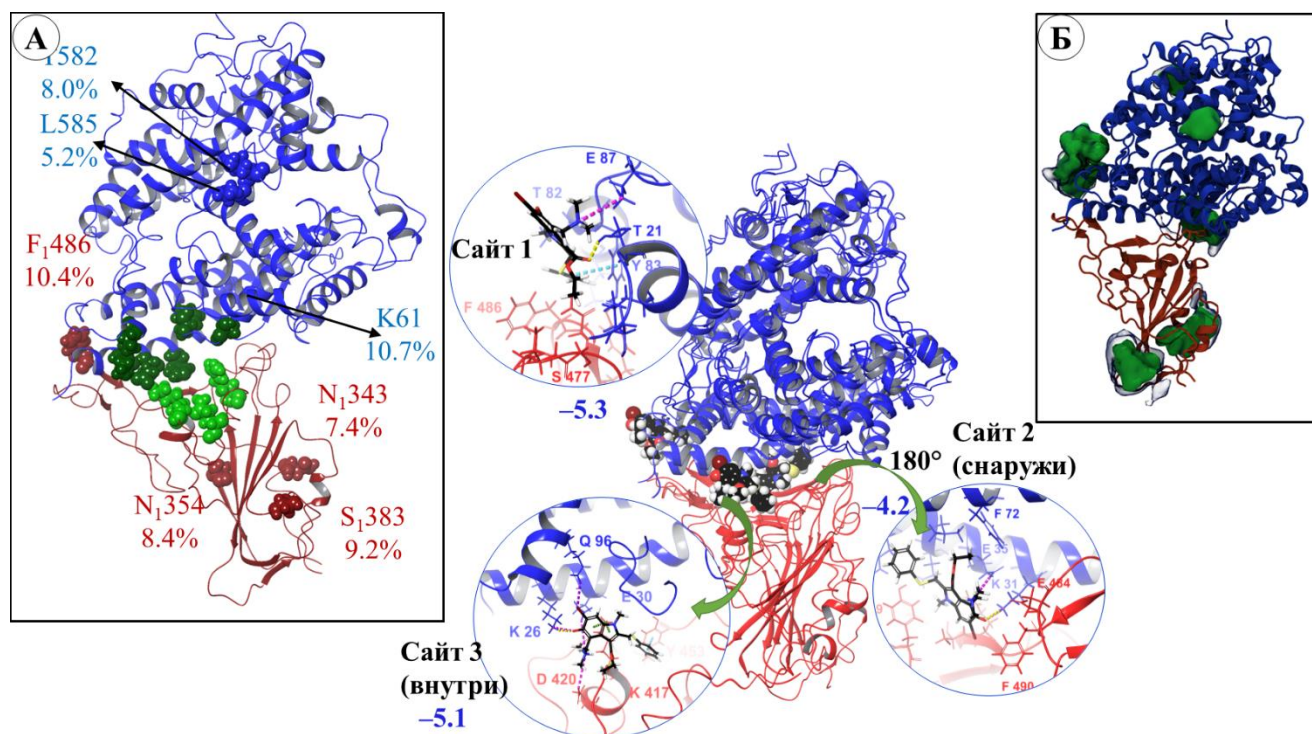


Рисунок 3-49 – Результаты молекулярного докинга в потенциальные сайты связывания в комплексе РСД-АПФ2: цифрами указаны энергетические параметры аффинности умифеновира (docking score) в ккал/моль. Водородные связи и солевые мостики показаны желтой и фиолетовой прерывистыми линиями; π -катионное и π - π стекинг-взаимодействия зелеными и голубыми линиями соответственно. А – аминокислотные остатки, с которыми наиболее вероятно взаимодействие молекул умифеновира, показаны темно-красным цветом; зеленые а.о. описаны в [120] в качестве контактных с умифеновиром: темно-зелёные аминокислоты относятся к АПФ2; светло-зелёные к РСД). Б – показаны взвешенные заселенности молекулами поверхности белка в результате статистической обработки данных молекулярно-динамической симуляции системы ACE-2-RBD-20×Arb.

Третий сайт (сайт 3 – внутри), расположенный в зоне контакта α_1 -спирали фермента и петель домена, выбран на основании результатов, описанных в работе [120]. Анализ результатов МД симуляций взаимодействия разных количеств умифеновира с поверхностью белка показывает, что ни одна из молекул лиганда не контактирует с а.о. области связывания, описанной в указанной работе. Докинг в потенциальные сайты связывания клеточного фермента не проводили, так как поиск ингибиторов АПФ2 не является основной целью данной задачи. Аффинность арбидола к сайтам 1–3 соизмерима и невысока (таблица 3–18).

Таблица 3-18 – Результаты молекулярного докинга умифеновира в вероятные сайты связывания, расположенные в комплексе РСД-АПФ2.

Сайты связывания	Docking score, ккал/моль	LE	Glide Emodel	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия	
					Водородные связи	Другие
Сайт 1	-5.3	0.18	-50.2	-1690.2	АПФ2: T21	АПФ2: E87 – солевой мостик Y83 – π -cation
Сайт 2 (снаружи)	-4.2	0.15	-46.6	-1684.1	АПФ2: K31	АПФ2: K31, E35 – солевые мостики
Сайт 3 (внутри)	-5.1	0.17	-52.7	-1689.9	АПФ2: K26 РСД: K417	АПФ2: Q96 – галоген-связь K26, E30 – солевые мостики РСД: K417 – π -катион Y453 – π - π

Принимая во внимание результаты молекулярно-динамических симуляций и процедуры молекулярного докинга, можно отметить, что лиганд может связываться как в месте гликозилирования, так и в зоне контакта домена и фермента. Такой разброс мест связывания нельзя рассматривать в качестве противоречивых данных. Очевидно, что реальная ситуация взаимодействия умифеновира с рецептор-связывающим доменом поверхностного белка SARS-CoV-2 сложнее.

3.2.1.2. Взаимодействие умифеновира с гептадными повторами S₂ субъединицы SARS-CoV-2

Согласно данным работы [119] умифеновир может связываться в области гептадных повторов второй субъединицы S₂ поверхностного белка SARS-CoV-2 по аналогии с его расположением в гликопротеине вируса гриппа [50]. Умифеновир связывается в области гептадных повторов каждого протомера гемагглютинина. Другими словами, на один поверхностный белок приходится три молекулы лиганда. Тогда можно предположить, что умифеновир связывается в области гептадных повторов поверхностного S-белка SARS-CoV-2 по аналогии с гемагглютинином. На основании результатов, опубликованных в работе [119], была создана модельная система, в которой в область гептадных повторов S-белка поместили три молекулы умифеновира. К сожалению, применение мультилигандного подхода в данном случае не представлялось возможным ввиду большого размера модельной системы. Основная цель проведения молекулярно-динамических симуляций заключалась в описании поведения лиганда внутри белка и оценке энергии связывания. МД симуляции были проведены в течение 300 нс. Анализ МД симуляций позволяет утверждать, что лиганды не покидают сайт связывания в течение всего времени симуляции (рисунки 3–50А). Обращает на себя внимание плотное облако заселенности в области гептадных повторов белка.

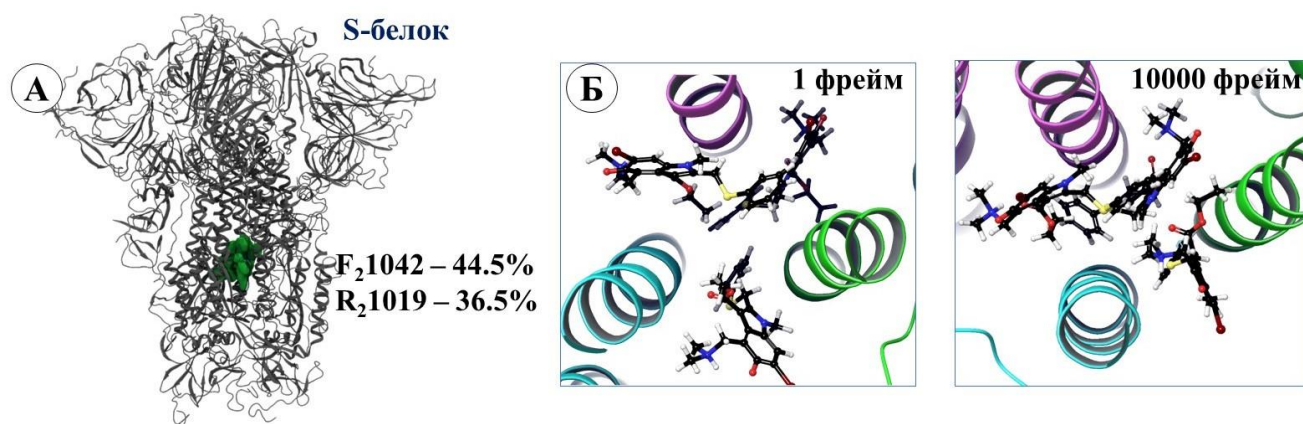


Рисунок 3-50 – Результат молекулярно-динамической симуляции полноразмерной луковичной головки S-протеина с 3-мя молекулами умифеновира, расположенными в области гептадных повторов S₂: А – карты заселенности, показывающие место расположение лигандов и частоту (%) взаимодействия с а.о. Б – начальные и конечный фрейм МД симуляции.

При этом, анализируя стартовый и конечный фреймы симуляции, можно отметить, что три молекулы умифеновира стремятся образовать агломерат (рисунок 3–50Б). Потенциальный сайт связывания насыщен гидрофобными а.о., такими как аланин, изолейцин, лейцин и фенилаланин. Наиболее часто лиганд контактирует с F₂1042; R₂1019 и N₂1023. Водородные связи регистрируются с E₂725; L₂1024; N₂1023 и R₂1019 (таблица 3–19). Результаты молекулярного докинга показывают умеренную аффинность Умифеновира к сайту связывания в области пептида слияния (таблица 3–19).

Таблица 3-19 – Результаты молекулярного докинга умифеновира в область гептадных повторов S-белка.

Сайт связывания	Docking score, ккал/моль	LE	Emodel	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.	
					Водородные связи	Другие
S ₂ (гептадные повторы, область пептида слияния)	-7.7	0.27	-67.6	-3605.2	R ₂ 1019	E ₂ 780 – солевой мостик L ₂ 727, V ₂ 1040, F ₂ 1042, L ₂ 1024 – гидрофобные

Для определения места связывания умифеновира в поверхностном S-белке был проведен анализ всех результатов молекулярного моделирования: была рассмотрена вероятность связывания лиганда в области РСД и в области гептадных повторов. Оптимальные докинг-позиции были использованы для оценки энергии связывания (таблица 3–20).

Таблица 3-20 – Оценка энергии связывания (ΔG_{bind}) и константы диссоциации (K_D) лиганда в различных сайтах связывания S-белка

Сайт связывания	Место расположения	Способ определения	ΔG_{bind} , ккал/моль	K_D , mM
Сайт 1	Интерфейс связывания РСД и АПФ2	На основании анализа работы [120]	-48.7	14.49
Сайт 4	Область гликозилирования карман 1	МД симуляции не-гликозилированной системы RBD-n×Arb, n = 1, 5, 10, 15, 20	-69.8	0.47
Сайт 4*	Область гликозилирования карман 2	МД симуляции гликозилированной системы RBD-SUG-n×Arb, n = 1, 20	-69.5	0.50
Сайт 3	Интерфейс связывания домена и фермента	МД симуляции не-гликозилированной системы ACE2-RBD-n×Arb, n = 1, 5, 10, 15, 20	-46.2	21.74
Сайт в S ₂	Область гептадных повторов, пептид слияния	МД симуляции полноразмерной луковичной головки S-протеина с тремя молекулами Умифеновира, анализ работы [119]	-71.2	0.38

Согласно данным [таблицы 3–20](#), связывание умифеновира в интерфейсе контакта (сайт 1 и сайт 3) домена и фермента характеризуется высокими значениями энергии связывания. При этом минимальная энергия связывания характерна для расположения лиганда в области гептадных повторов второй субъединицы S₂. Энергия связывания умифеновира в области гликозилирования не зависит от присутствия углеводного остатка при N₁₃₄₃. С одной стороны, анализ результатов молекулярно-динамических симуляций не исключает возможность связывания умифеновира в области рецептор-связывающего домена и/или в интерфейсе контакта домена и фермента. Связывание лиганда в данной полости белка может оказать влияние на структурную гибкость последнего. С другой стороны, расположение умифеновира в области гептадных повторов второй субъединицы S-белка характеризуется минимальной энергией лиганд-белкового комплекса. Связывание лиганда в этой области протеина кажется предпочтительным. Можно предположить, что умифеновир энергетически стабилизирует префузионную конформацию, «оставляя» гептадные повторы в сжатом состоянии. Подобное воздействие малой молекулы на S-белок аналогично его воздействию на гемагглютинин вируса гриппа.

Расположение умифеновира в стеблевой части НА подтверждено расшифрованной рентгеноструктурным анализом пространственной структуры лиганд-белкового комплекса (PDB коды 5T6N; 5T6S). Умифеновир связывается в ТБГХ-сайте, насыщенном гидрофобными а.о., которые расположены в непосредственной близости к лиганду, а именно ароматические W₂₉₂,

Y₂₉₄, F₁₂₉₄ и алифатические V₂₅₅, L₂₉₉ аминокислоты. Кроме того, между атомами лиганда и заряженными а.о. (K₁₃₀₇ и D₂₉₀) могут образовываться водородные и солевые мостики (рисунк 3–51А). В стеблевой части HA одного белка связываются три молекулы умифеновира. В гептадных повторах S-белка также, вероятно, связываются три лиганда. В сайте связывания расположены гидрофобные а.о.: F₂₁₀₄₂, L₂₁₀₂₄, A₂₁₀₂₀ и положительно заряженный лизин K₂₁₀₂₈ (рисунк 3–51Б).

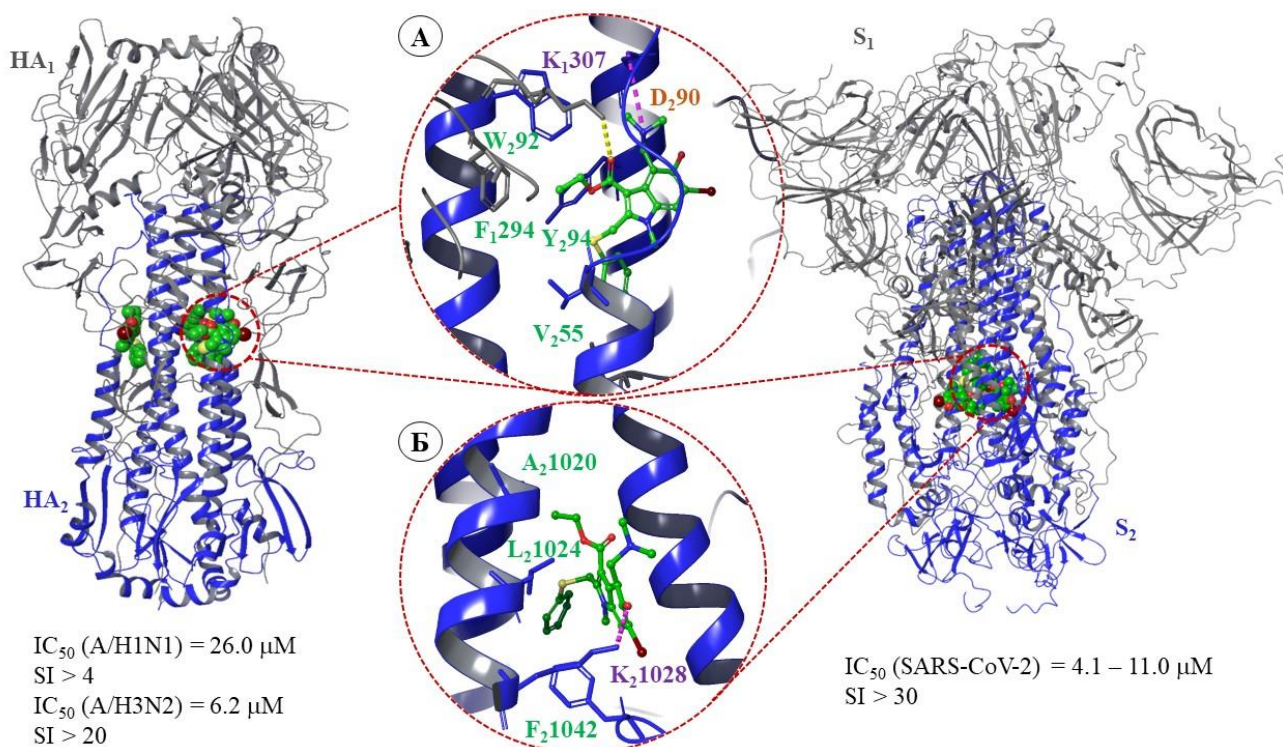


Рисунок 3-51 – Сайты связывания умифеновира в HA вируса гриппа и S-белке SARS-CoV-2: А – расположение лиганда в ТБГХ-сайте гемагглютинина Б – расположение лиганда в области гептадных повторов S-белка.

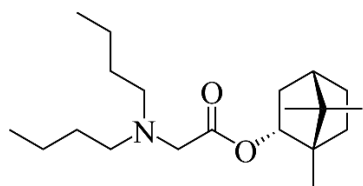
Вероятные места связывания умифеновира в поверхностных белках вируса гриппа и SARS-CoV-2 имеют схожий фармакофорный профиль: с одной стороны присутствуют гидрофобные а.о., с которыми лиганд образует гидрофобные межмолекулярные взаимодействия, а с другой стороны – это ароматические аминокислоты, которые способны к образованию π-π стекинг-взаимодействий с индольным фрагментом соединения. Можно предположить, что умифеновир может нарушать конформационные перегруппировки белков именно за счет формирования стойких π-π стекинг-взаимодействий. Образование π-π стекинг-взаимодействий между умифеновиром и рядом аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин) подтверждается

наблюдаемым тушением флуоресценции данных ароматических аминокислот умифеновиром¹. Кроме того, результаты масс-спектропии в месте протеолиза [300] также свидетельствуют о том, что умифеновир связывается в полости между двумя α -спиралями двух протомеров поверхностного S-белка, образуя ряд межмолекулярных контактов с а.о. S₂1021, L₂1024 и T₂1027

Совокупный анализ биологических экспериментов (тестов с псевдовиральной системой, изучение люминесцентных свойств) и результатов молекулярного моделирования (масштабные молекулярно-динамические мультитигандные симуляции, молекулярный докинг) позволяют утверждать, что умифеновир связывается в области гептадных повторов S₂ субъединицы поверхностного белка SARS-CoV-2. Умифеновир подавляет фузогенную активность S-белка SARS-CoV-2, не препятствуя связыванию рецептор-связывающего домена с клеточным ферментом, что было показано в дополнительных биологических экспериментах с помощью иммуоферментного анализа. Таким образом, механизм противовирусного действия умифеновира в отношении SARS-CoV-2, скорее всего, **аналогичен** механизму ингибирования вируса гриппа. Вероятно, умифеновир **затрудняет** конформационные перегруппировки поверхностного белка при переходе из префузионной в постфузионную конформацию, что впоследствии препятствует слиянию вирусной и клеточной мембран.

3.2.2. Оценка аффинности производных эфиров (–)-борнеола к сайту связывания S-белка [301]

Среди 35 синтезированных в отделе медицинской химии НИОХ СО РАН производных эфиров (–)-борнела и протестированных в отношении псевдовиральной системы, несущей на своей поверхности S-белок SARS-CoV-2 штамма Delta Lineage B.1.617.2, были выбраны два соединения лидера **176** и **177** (рисунок 3–52).

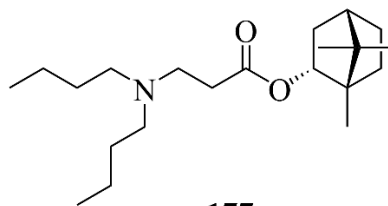


176

$IC_{50}^1 = 9.6 \mu M$ $SI = 32$

$IC_{50}^2 = 17.6 \mu M$ $SI = 17$

$IC_{50}^3 = 7.7 \mu M$ $SI = 40$



177

$IC_{50} = 4.7 \mu M$ $SI = 71$

$IC_{50} = 3.5 \mu M$ $SI = 96$

$IC_{50} = 3.3 \mu M$ $SI = 102$

¹ Wuhan Lineages B

² Delta Lineage B.1.617.2

³ Omicron Lineage B.1.1.529

Рисунок 3-52 – Производные сложных эфиров борнеола, проявляющие активность против вируса SARS-CoV-2 разных штаммов.

¹ Эксперименты проводились в лаборатории химической физики УФИХ УФИЦ РАН под руководством с.н.с., к.х.н. С. С. Остахова.

Согласно биологическим тестам, эфиры **176** и **177** проявляют противовирусную активность в отношении живого вируса SARS-CoV-2 трех штаммов: Wuhan Lineages B (hCoV-19/Australia/VIC01/2020); Delta Lineage B.1.617.2 (hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021) и Omicron Lineage B.1.1.529 (hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021). Следует отметить, что активность соединений против разных штаммов вируса соизмерима. Это очень важное наблюдение может помочь определить потенциальное место связывания соединений **176** и **177** в S-белке SARS-CoV-2.

Анализ структурных особенностей эфиров **176** и **177** показывает наличие гидрофобного фрагмента (рисунок 3–53), схожего с гидрофобными фрагментами известных ингибиторов гемагглютинаина, таких как камфецин **125** и четвертичная аммонийная соль на основе (–)-борнеола **160**. Кроме того, в каждом из соединений присутствует протонированный атом азота – донор водородной связи. Константы кислотности были оценены на основании результатов расчетов методом квантовой химии. Подробнее эти данные представлены в п. 2.2.3.

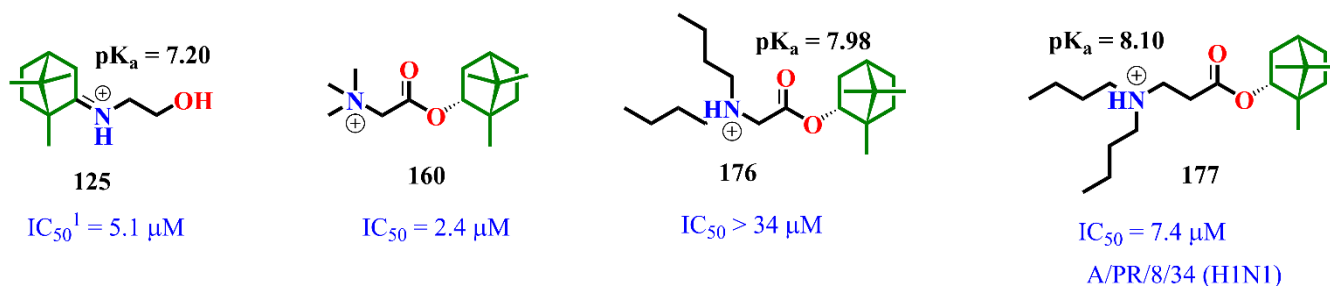


Рисунок 3-53 – Сравнение структурных дескрипторов ингибиторов НА (74–75) и S-белка (126–127).

Соединения **176** и **177** проявляют умеренную противовирусную активность в отношении вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1) [302]. Можно предположить, что эфиры могут связываться со стеблевой частью НА, по аналогии с камфецином (**125**) и солью **160**, в ТБГХ-и/или в К-сайтах связывания. Тогда вероятный механизм их противогриппозной активности, по-видимому, связан с подавлением фузогенной активности гемагглютинаина. Процедуры молекулярного докинга соединений **176** и **177** в сайты связывания НА не проводились. Однако учитывая их фармакофорный профиль и структурные особенности, схожие как с четвертичной аммонийной солью **160**, так с рядом аналогов камфецина, можно предполагать, что **176** и **177** могут связываться в стеблевой части НА и в похожей области S-белка. Поверхностные вирусные белки НА и S-белок имеют схожий набор гептадных повторов и общий механизм конформационных перестроек, который предшествует процессу слияния вирусных и клеточных мембран. Все эти рассуждения в совокупности с данными биологических экспериментов позволяют рассматривать поверхностный S-белок SARS-CoV-2 в качестве потенциальной биологической мишени, объясняющей механизм противовирусной активности соединений **176** и

177. Место связывания, вероятнее всего, располагается именно во второй субъединице S₂, в области гептадных повторов (HR1). В пользу этого свидетельствует то, что противовирусная активность **176** и **177** на разные штаммы вируса соизмерима.

При этом хорошо известно, что в течение продолжающейся пандемии коронавирусной инфекции происходит адаптация вируса к человеку-хозяину [12] в результате мутаций аминокислотных последовательностей именно в поверхностном S-белке (рисунок 3–54).

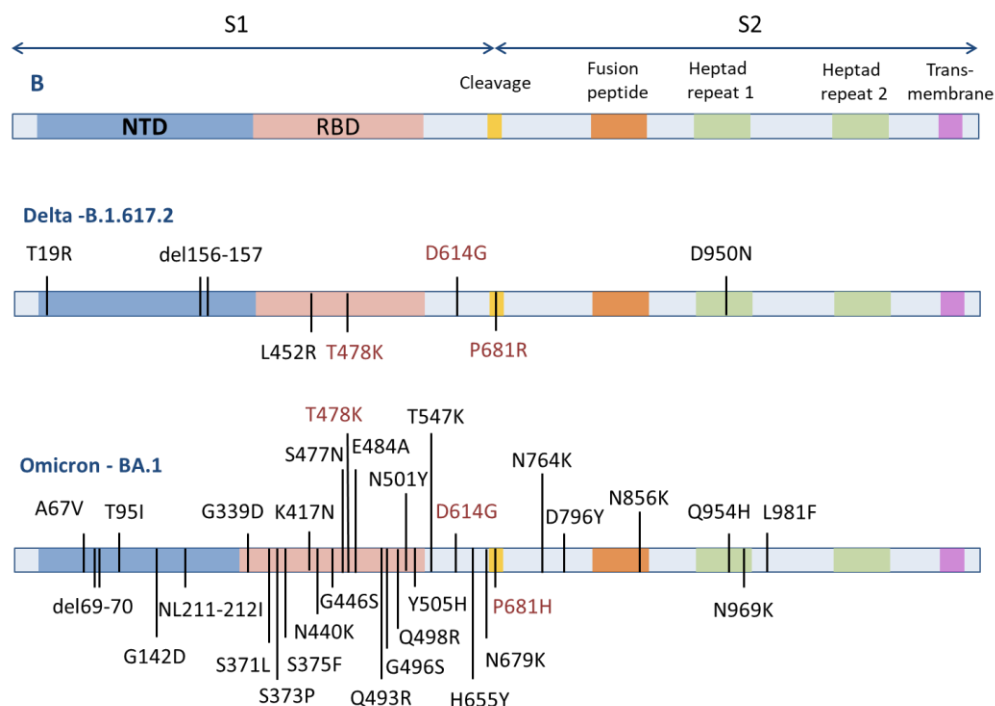


Рисунок 3-54 – Мутации аминокислотных остатков в разных штаммах вируса SARS-CoV-2.

Множественные мутации встречаются в S₁ в N-терминальном и рецептор-связывающем доменах, в то время как во второй субъединице они носят точечный характер. Таким образом, результаты биологических экспериментов, структурные особенности исследуемых соединений и анализ аминокислотной последовательности поверхностного S-белка SARS-CoV-2 позволяют предположить, что соединения **176** и **177** могут связываться в стеблевой части домена S₂. В этой связи необходимо оценить аффинность эфиров к вероятному сайту связывания, расположенному в области гептадных повторов S-белка. Предполагаемое место связывания малых молекул в S-белке (на примере умифеновира) было определено на основании молекулярного моделирования. Сайт связывания умифеновира был динамически аннотирован в рамках данного исследования. Результаты расчетов находят свое подтверждение в ранее опубликованных работах [51, 56, 65]. Для проведения молекулярно-динамических симуляций была создана стартовая система лиганд-белкового комплекса: в область центральных и гептадных повторов S-белка были помещены три молекулы эфира **177**. Стартовое положение эфиров соответствовало положению молекул

умифеновира, определенных ранее и описанных в предыдущем разделе данной работы. Молекулярно-динамическая симуляция была проведена в течение 90 нс.

Анализ показателей графиков RMSD системы показал, что лиганд-белковый комплекс достиг равновесия уже на 40 нс симуляции (см [приложение](#), [рисунок 5–5](#)). Анализ траектории МД симуляции был проведен относительно положения каждой молекулы эфира **177** в сайте связывания. Лиганды формируют серию межмолекулярных взаимодействий с а.о. места связывания. Все три молекулы эфира **177** располагаются в области гептадных и центральных повторов S-белка, включающих а.о. с 726 по 1057. Три молекулы эфира **177** активно контактируют примерно с одинаковым набором аминокислот той цепи, в которой расположен лиганд ([рисунок 3–55](#)).

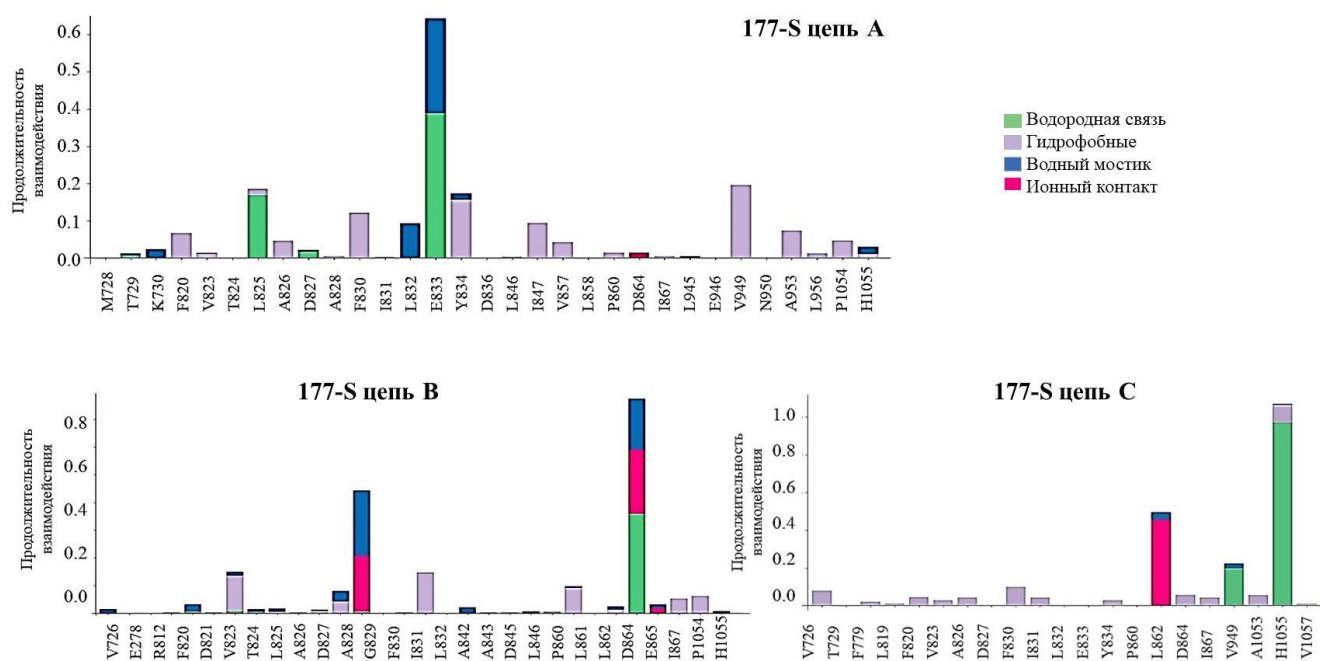


Рисунок 3-55 – Анализ траектории молекулярно-динамической симуляции трех молекул эфира **177** расположенных в области гептадных повторов S-белка SARS-CoV-2. Продолжительность взаимодействия соответствует доле времени молекулярно-динамических симуляций, где 1.0 соответствует 100% времени, в течение которого регистрируется той или иной межмолекулярный контакт.

Наиболее продолжительными контактами являются следующие межмолекулярные взаимодействия: более 60% времени симуляции регистрируется водородная связь, частично опосредованная водой, между эфиром и E2833, более 50% – водородная связь и солевой мостик с D2864, практически все время симуляции сохраняется водородная связь с H21055. Кроме того, лиганды формируют серию гидрофобных контактов с окружающими а.о. A21053/826, V2949/726, F2830/820, L2825. Данный факт говорит о специфичном удержании лиганда в активном сайте. На

рисунке 3–55 гидрофобные контакты показаны в виде сиреневых столбцов на гистограммах. Совокупность статистических данных расположения трех молекул эфира **177** и суммарная частота образования водородных связей с а.о. S-белка представлена на рисунке 3–56. Анализ карты взвешенной атомной заселенности позволяет определить вероятное положение молекул лиганда в течение всего времени симуляции и определить частоту образования водородных мостиков с определенными аминокислотами. Согласно карте заселенности (рисунк 3–56А), каждая молекула располагается в отдельном протомере, между α -спиралями центральной части второй субъединиц S₂. Размер облаков свидетельствует о том, что лиганды прочно располагаются в сайте связывания, и их перемещения весьма ограничены.

На рисунке 3–56Б представлено выравнивание аминокислотных остатков, входящих в вероятный сайт связывания, различных штаммов SARS-CoV-2. Эволюция вируса здесь представлена в виде точечных мутаций. Анализ молекулярно-динамической симуляции показывает, что водородные связи образуются между атомами эфира **177** и консервативными аминокислотами. Факт, что противовирусная активность соединений **176** и **177** на исследуемые штаммы вируса примерно соизмерима, может быть рассмотрен в качестве дополнительного доказательства места связывания.

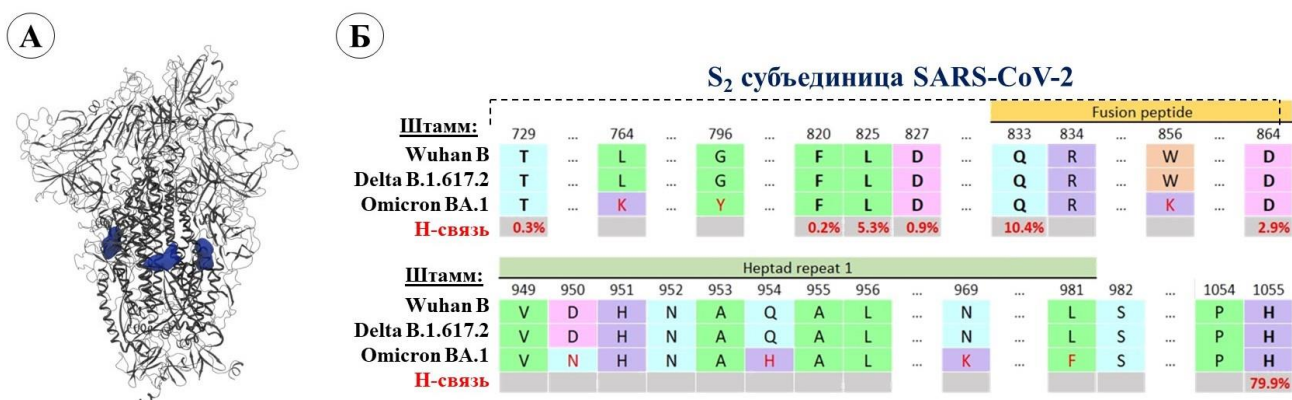


Рисунок 3-56 – Анализ траектории молекулярно-динамической симуляции комплекса **177-S**: А – карта взвешенной атомной плотности, суммирующее расположение трех молекул эфира в областях центральных и гептадных повторов S-белка. Б – Выравнивание аминокислотных последовательностей участка связывания в S2 субъединицы SARS-CoV-2 разных штаммов. Точечные мутации показаны красным шрифтом. Продолжительность водородной связи между атомами лиганда и а.о. показана в % и указывает % от всего времени симуляции.

Таким образом, анализ молекулярно-динамической симуляции в совокупности с данными биологических экспериментов позволяет предположить, что сайт связывания ингибиторов S-белка располагается в области центральных (CHR) и гептадных повторов (HR1). Эта область расположена во второй субъединице S-протеина, в наиболее консервативной части белка

([рисунок 3–57А](#)), по сравнению с N-терминальным доменом первой субъединицы S_1 . Сайт связывания насыщен гидрофобными аминокислотами, такими как аланин, лейцин и валин.

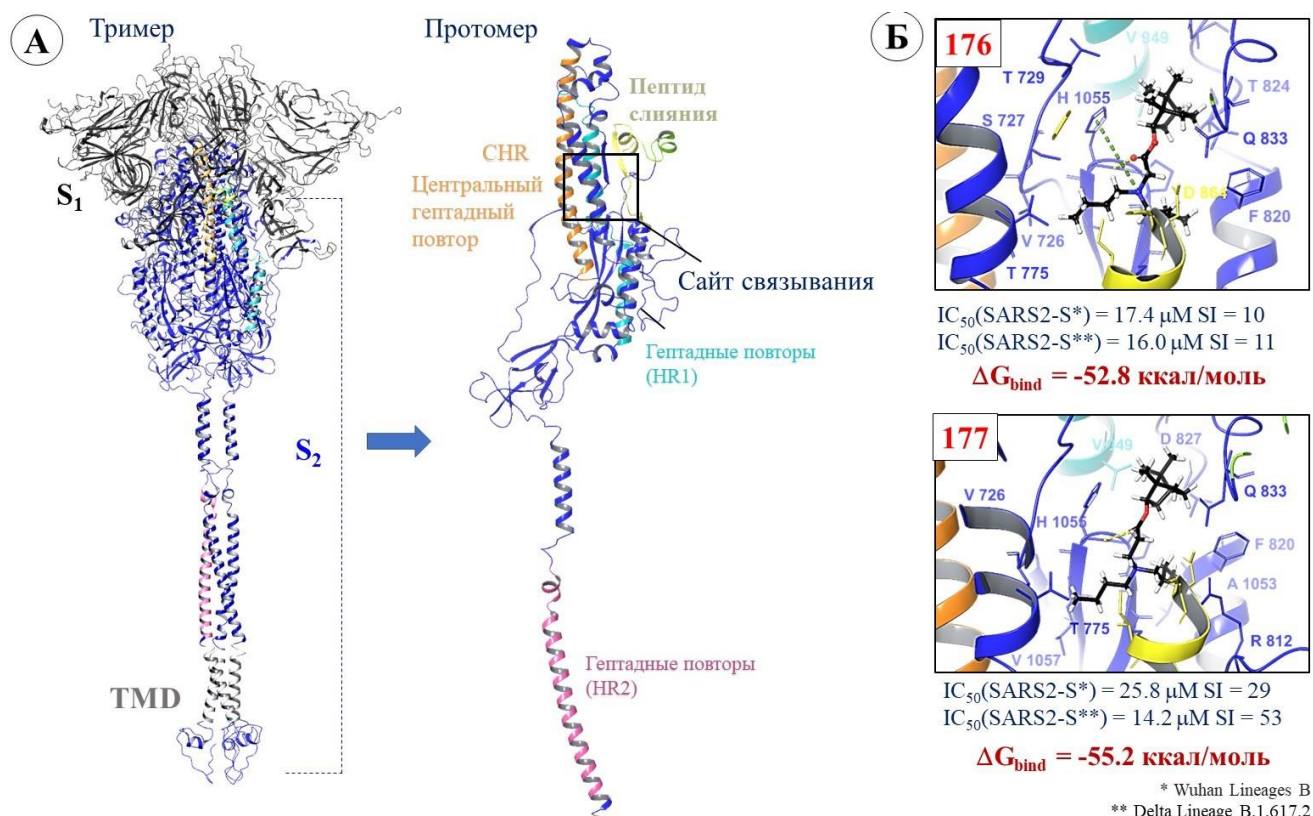


Рисунок 3-57 – Результаты молекулярного моделирования: А – полноразмерная визуализация поверхностного белка: S_1 и S_2 субъединицы, TMD – трансмембранный домен, CHR, HR1, HR2 – центральный и гептадные повторы 1 и 2, соответственно, FP1, FP2 – пептиды слияний; Б – расположение соединений **176** и **177** в предполагаемом сайте связывания: водородные связи показаны желтой прерывистой линией, π -катион стекинг-взаимодействие – зеленой прерывистой линией.

Геометрические параметры наиболее стабильного (по данным RMSD) лиганд-белкового комплекса были выгружены, комплекс минимизирован методом силового поля и использован для процедуры оценки энергии связывания лиганда и белка. Дополнительно была проведена процедура гибкого молекулярного докинга эфира **176** в сайт связывания, где на лиганд были наложены позиционные ограничения. При анализе результатов докинга эфира **176** учитывалось положение агента **177** в качестве референс-соединения. Соединения **176** и **177** располагаются в сайте связывания преимущественно с образованием водородной связи с H₂1055 ([рисунок 3–56Б](#)). Это самый продолжительный контакт между атомами лиганда и а.о. сайта связывания, кроме липофильных контактов с гидрофобными аминокислотами. Дополнительно **176** образует π -катионное стекинг-взаимодействие между протонированным атомом азота и ароматическим кольцом H₁1055. Во всех случаях наблюдаются гидрофобные взаимодействия между липофильными частями ингибиторов (норборнанный фрагмент и бутильные заместители) и

гидрофобными аминокислотами сайта связывания. Энергии связывания (ΔG_{bind}) обоих лигандов в сайтах связывания соизмеримы, что коррелирует с результатами биологических экспериментов (рисунок 3–57Б).

Дополнительно сотрудниками ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были проведены биологические эксперименты по оценке конкурентного ингибирования взаимодействия рецептор-связывающего домена с клеточным ферментом в присутствии исследуемых эфиров. Результаты тестов показали, что исследуемые лиганды не препятствуют связыванию домена с ферментом, а значит наиболее вероятный механизм их ингибирующей активности заключается во влиянии на процесс слияния вирусных и клеточных мембран. Таким образом, описанный в данном разделе масштабный теоретический эксперимент в совокупности с данными биологического эксперимента позволяет утверждать, что соединения **176** и **177** могут связываться в гидрофобных пространствах между α -спиралями центральных и гептадных повторов S_2 субъединицы гликопротеина, подавляя тем самым фузогенную активность белка.

3.2.3. Механизм противовирусной активности производных усниновой кислоты [303,304].

Ряд производных (+)-усниновой кислоты проявляют противовирусную активность в отношении ряда патогенных штаммов SARS-CoV-2, а именно: Wuhan Lineages B (hCoV-19/Australia/VIC01/2020); Delta Lineage B.1.617.2 (hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021) и Omicron Lineage B.1.1.529 (hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021). Для описания механизма противовирусного действия данных соединений были проведены дополнительные анализы с целью оценки нейтрализации псевдовирусной модели, несущей на своей поверхности S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2. Результатом подобного тестирования стал выбор трех активных соединений (**178–180**), которые могут рассматриваться в качестве ингибитора входа SARS-CoV-2 (рисунок 3–58).

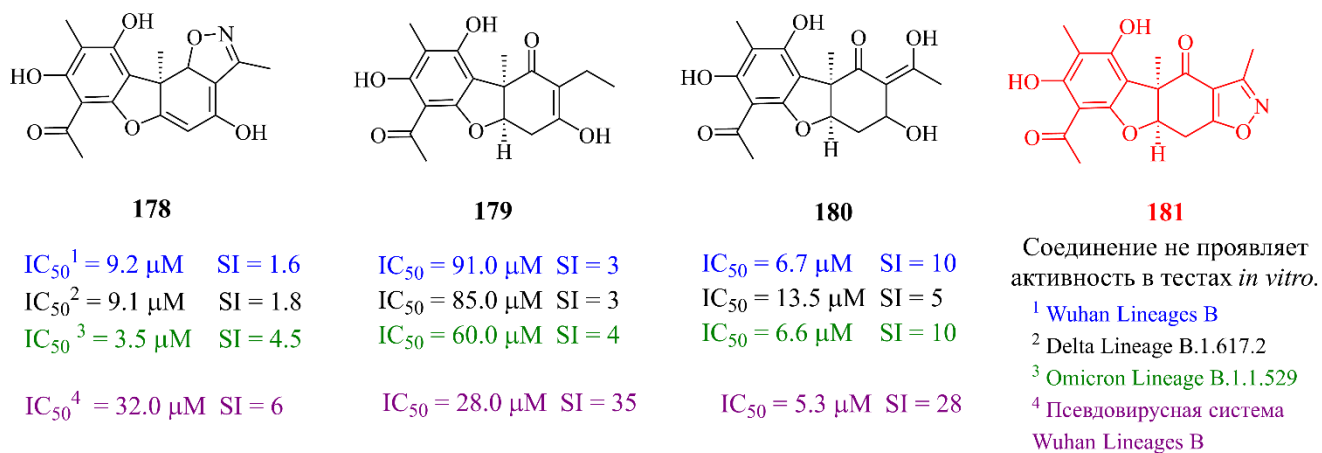


Рисунок 3-58 – Производные (+)-усниновой кислоты активные в отношении SARS-CoV-2

Методы молекулярного моделирования были использованы для поиска вероятного места связывания производных **178–180**, где соединение **181** было рассмотрено в качестве отрицательного контроля.

3.2.3.1. Фармакофорные профили вероятных сайтов связывания производных (+)-усниновой кислоты

Несмотря на детальное изучение строения и функций поверхностного S-белка SARS-CoV-2, место связывания потенциальных ингибиторов входа достоверно не определено. Геометрические параметры полноценного S-белка в базе данных присутствуют в различных конформациях, для различных штаммов, и/или связанных с антителами. Однако структуры S-белка или его части (например, рецептор-связывающего домена) в комплексе с противовирусным агентом отсутствуют до сих пор. Этот факт, конечно, осложняет поиск потенциального сайта связывания ингибиторов входа.

Результаты биологических экспериментов, проведенных в отношении производных (+)-усниновой кислоты, позволяют рассматривать поверхностный белок SARS-CoV-2 в качестве потенциальной биологической мишени. Однако оценка конкурентного ингибирования взаимодействия рецептор-связывающего домена с клеточным ферментом в присутствии соединений **178–180** показывает, что исследуемые вещества не препятствуют связыванию домена с ферментом. При этом активность соединений в отношении разных патогенных штаммов вируса SARS-CoV-2 соизмерима, что наводит на мысль о возможном связывании молекул с консервативной частью поверхностного белка. Между тем известно [12], что в рецептор-связывающем домене, соответствующем различным штаммам вируса SARS-CoV-2, встречаются множественные мутации ([рисунок 3–54](#)). Было проведено аннотирование вероятных полостей в поверхностном S-белке, которые могли бы быть рассмотрены в качестве потенциальных мест связывания активных производных (+)-усниновой кислоты.

Во-первых, в качестве вероятного места связывания был рассмотрен комплекс N-терминального домена с зелёным желчным пигментом – биливердином (**32**). Сайт насыщен липофильными аминокислотными остатками ([рисунок 3–59А](#)), а также гидрофильными аминокислотами, такими как аргинин и гистидин, склонных к донорно-акцепторным взаимодействиям с лигандом. Согласно авторам работы [84], биливердин плотно прилегает к карману связывания с образованием ряда межмолекулярных взаимодействий с боковыми цепями а.о. N₁₂₁, R₁₉₀, H₁₂₀₇. Фармакофорный анализ сайта связывания предполагает, что потенциальный лиганд должен содержать ароматические кольца, как минимум, один гидрофобный фрагмент, группы способные к донорно-акцепторному взаимодействию, и один отрицательно заряженный заместитель.

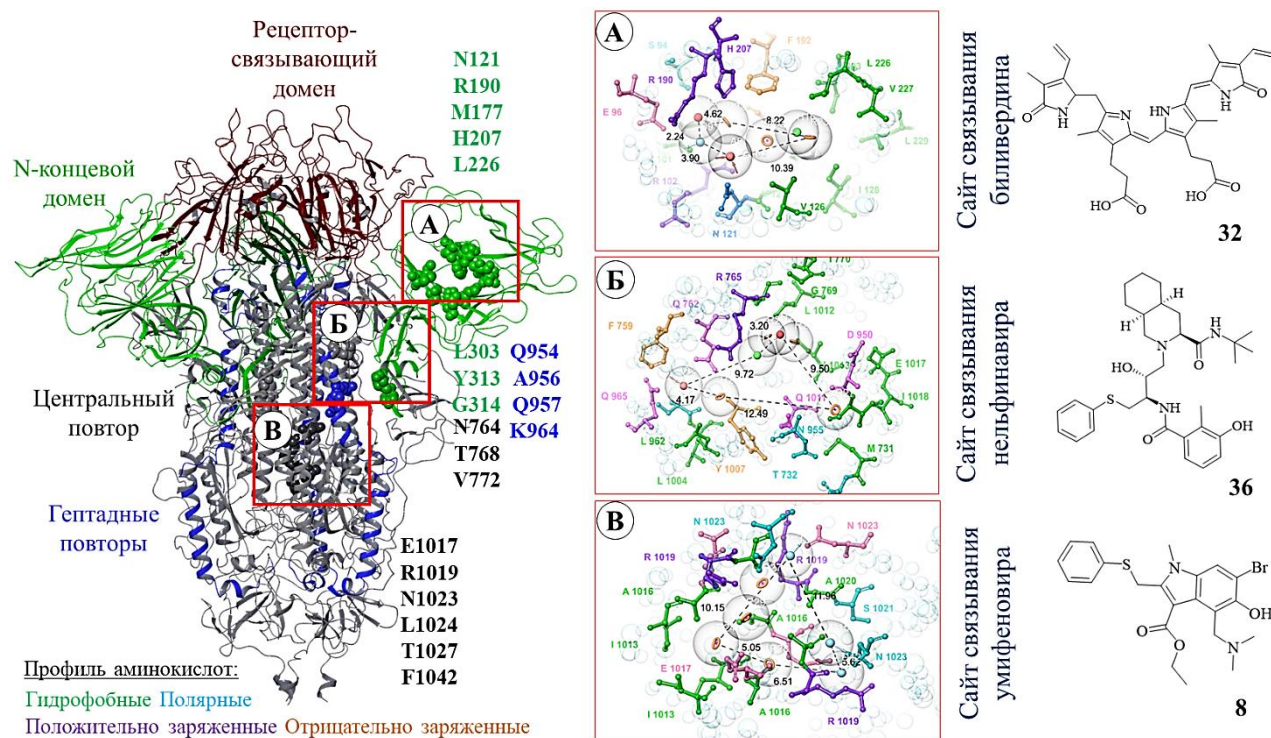


Рисунок 3-59 – Вторичная структура поверхностного белка SARS-CoV-2. Визуализация выполнена на основании PBD кода 7BNM [78]: вторичная структура N-концевого домена (а.о. с 14–330) показана зеленым цветом; рецептор-связывающего домена (а.о. с 330–528) – темно-красным цветом; гептадные повторы (а.о. с 910–985) показаны синим цветом. А-В – фармакофорный профиль сайтов связывания ингибиторов. Точками указаны необходимые фармакофорные признаки потенциального лиганда: зеленый шарик соответствует гидрофобному признаку, голубой и розовый – донору и акцептору, соответственно, оранжевым цветом указаны ароматические кольца, красный – отрицательно заряженный. Расстояния между фармакофорными признаками указаны в Å. Аминокислоты показаны в радиусе 4Å от вероятного расположения лиганда. Нейтральные гидрофобные алифатические аминокислоты окрашены в зеленый цвет, основные гидрофильные – в фиолетовый цвет, нейтральные гидрофильные – в голубой цвет, ароматические алифатические – в оранжевый цвет, и, гидрофильные кислотные аминокислоты показаны розовым цветом.

Второе место связывания было определено на основании результатов молекулярного моделирования и данных биологических экспериментов по созданию резистентного к ингибитору UA-30 (37) штамма вируса [124]. В полости, расположенной между двумя субъединицами, ближе к гептадным повторам (HR) предположительно [123] связывается и нельфинавир (36). Сайт связывания содержит гидрофобные и ароматические аминокислоты (рисунок 3–59Б). Для выраженной аффинности лиганд должен быть достаточной объемным, содержать ароматические кольца, акцептор-группу, отрицательно заряженный фрагмент и гидрофобный признак.

И, наконец, было рассмотрено место связывания умифеновира (8), расположенного в области центральных и гептадных повторов [119,293]. В сайте присутствуют гидрофильные

основные аминокислоты, а.о. способные к донорным взаимодействиям и гидрофобные остатки (рисунок 3–59В). Для плотного прилегания к карману связывания потенциальный лиганд должен состоять из набора ароматических колец и групп, доноров водородной связи. Ранее было показано [305–307], что ряд производных усниновой кислоты проявляет активность в отношении вируса гриппа. По аналогии с умифеновиром было сделано предположение, что исследуемые молекулы могут одновременно связываться с обоими поверхностными белками: гемагглютинином вируса гриппа и S-белком коронавируса.

3.2.3.2. Оценка аффинности производных (+)-усниновой кислоты к сайтам связывания S-белка

Производные (+)-усниновой кислоты (**178–180**) были подвержены процедуре молекулярного докинга в указанные сайты связывания. Кроме того, было оценено соответствие фармакофорного профиля лигандов фармакофорному профилю рассмотренных сайтов связывания (таблица 3–21).

Анализ результатов молекулярного докинга (энергетические параметры, визуализация межмолекулярных контактов и соответствие фармакофорному профилю сайтов) позволяет предположить, что место связывания биливердина можно рассматривать в качестве вероятного сайта связывания производных (+)-усниновой кислоты. Подобный вывод был основан на следующих рассуждениях: во-первых, подходящие фармакофорные признаки, соответствующие фармакофорному профилю сайту связывания, характерны для всех производных **178–181**. Реализуются 3–4 признака среди 7 возможных, а именно, ароматические кольца, гидрофобный фрагмент и акцептор водородной связи. Во-вторых, расположение активных соединений (**179**, **180**) в сайте связывания биливердина не сопровождается стерическими затруднениями. И, наконец, связывание соединения-лидера **180** характеризуется самыми низкими значениями энергетических параметров, в то время как связывание неактивного соединения **181** – самыми высокими (таблица 3–21). Таким образом, результаты молекулярного докинга находятся в согласии с экспериментально определенными значениями IC₅₀.

Анализ фармакофорного профиля лигандов позволил определить четыре соответствующих сайту связывания нельфинавира фармакофорных признака только у агента **178**. Следовательно, данное место связывания наиболее благоприятно для расположения именно этого лиганда. Об этом свидетельствуют и энергетические параметры связывания соединения **178**. Во всех остальных структурах только один ароматический фрагмент может укладываться в соответствующее место полости связывания. Кроме того, энергетические параметры аффинности всех исследуемых соединений **178–181** соизмеримы, что противоречит значениям их противовирусной активности (таблица 3–21).

Таблица 3-21 – Результаты процедуры молекулярного докинга в возможные сайты связывания ингибиторов S-белка

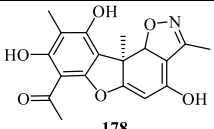
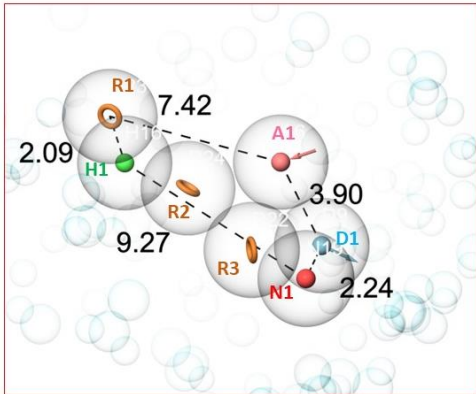
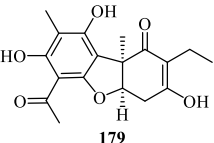
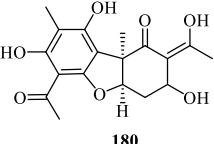
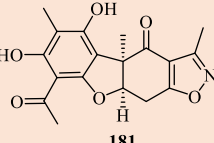
Структура	Сайт связывания	Соответствие сайту связывания	Docking score	Emodel	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.		
						Водородные связи	Другой тип взаимодействий	Стерические затруднения
						Сайт связывания биливердина (32)		
 178		R1; H1; R2; A1	-8.12	-57.93	-613.9	N ₁ 121; R ₁ 102 I ₁ 101	W ₁ 104 – гидрофобные	Отсутствуют
 179		H1; R2; A1	-8.12	-55.76	-616.8	N ₁ 121; I ₁ 101 R ₁ 190	F ₁ 92 W ₁ 104 I ₂ 203 – гидрофобные	Отсутствуют
 180		H1; R2; A1	-9.00	-70.97	-615.6	N ₁ 121; I ₁ 101 S ₁ 94	R ₁ 190 – π-катион	Отсутствуют
 181		H1; R2; A1	-5.41	-43.41	-615.9	отсутствуют	H ₁ 207 – π-π стекинг I ₁ 101; W ₁ 104 – гидрофобные	I ₁ 101

Таблица 3–21 – продолжение.

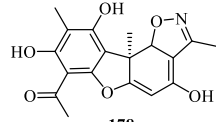
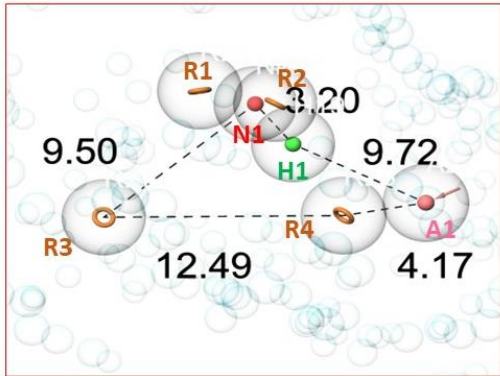
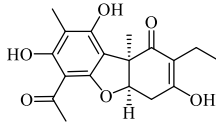
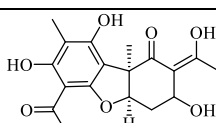
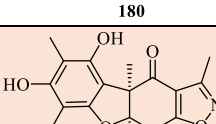
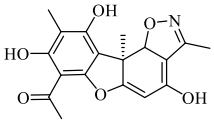
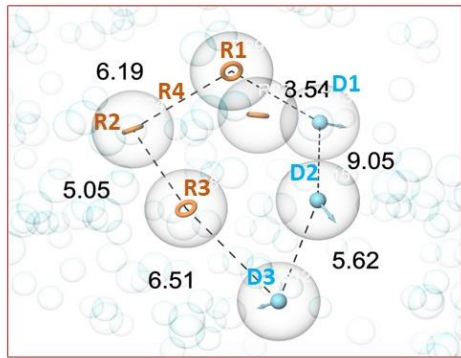
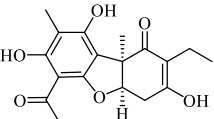
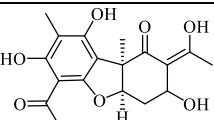
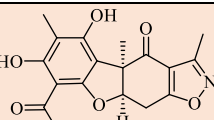
Структура	Сайт связывания	Соответствие сайту связывания	Docking score	Emodel	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.		
						Водородные связи	Другой тип взаимодействий	Стерические затруднения
	Сайт связывания нелфинавира (36) и UA-30 (37)							
 178		A1; H1; R2; R4	-7.46	-63.04	-6011.4	A: Q ₂ 1010 B: R ₂ 765	A: Q ₂ 954; L ₂ 1013 B: L ₂ 1013 – гидрофобные	B: R ₂ 765
 179		R2	-6.18	-54.71	-6009.8	A: Q ₂ 1010 E ₂ 1012 B: R ₂ 765	B: A ₂ 766; L ₂ 1012 – гидрофобные	отсутствуют
 180		R1	-7.22	-59.13	-6010.3	A: Q ₂ 1010	B: A ₂ 766; I ₂ 770 – гидрофобные	отсутствуют
 181		R1	-6.19	-48.88	-6011.77	A: Q ₂ 957; T ₂ 961 B: T ₂ 761	B: R ₂ 765; S ₂ 768	A: T ₁ 302

Таблица 3–21 – продолжение.

Структура	Сайт связывания	Соответствие сайту связывания	Docking score	Emodel	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.		
						Водородные связи	Другой тип взаимодействий	Стерические затруднения
Сайт связывания умифеновира (8)								
 178		R3	-4.36	-36.16	-6085.6	T ₂ 1027	отсутствуют	R ₂ 1019
 179		R3	-4.32	-36.64	-6081.8	R ₂ 1019	L ₂ 1024; F ₂ 1042 – гидрофобные	R ₂ 1019
 180		D3; R3	-4.38	-36.67	-6081.82	R ₂ 1019 N ₂ 1023	L ₂ 1024; A ₂ 1020 – гидрофобные	Отсутствуют
 181		D3; R3; R2	-6.53	-36.52	-6180.97	R ₂ 1019	F ₂ 1042; L ₂ 1024; A ₂ 1020 – гидрофобные	T ₂ 1027

Результаты молекулярного докинга лигандов в сайт связывания умифеновира не коррелируют с экспериментальными данными. Согласно анализу теоретических расчетов, наиболее активным ингибитором S-белка должен быть неактивный, согласно тестам *in vitro*, агент **181**. Значения, характеризующие его энергетические параметры связывания в данном сайте, минимальны, по сравнению со связыванием других соединений **178–180**. Кроме того, фармакофорный профиль лиганда **181** лучше других соответствует профилю сайта связывания умифеновира. Аффинность остальных (+)-производных усниновой выражена слабее, кроме того, расположение соединений **178–180** в данном сайте связывания сопровождается стерическими затруднениями (таблица 3–21).

Соединение-лидер **180** может находиться в двух возможных изомерных формах E и Z. Связывание изомеров в исследуемых сайтах связывания может различаться. Методами квантовой химии была оценена разница в энтальпии двух изомеров, и было показано, что E-изомер на 6.5 ккал/моль стабильнее Z-изомера (рисунок 3–60А).

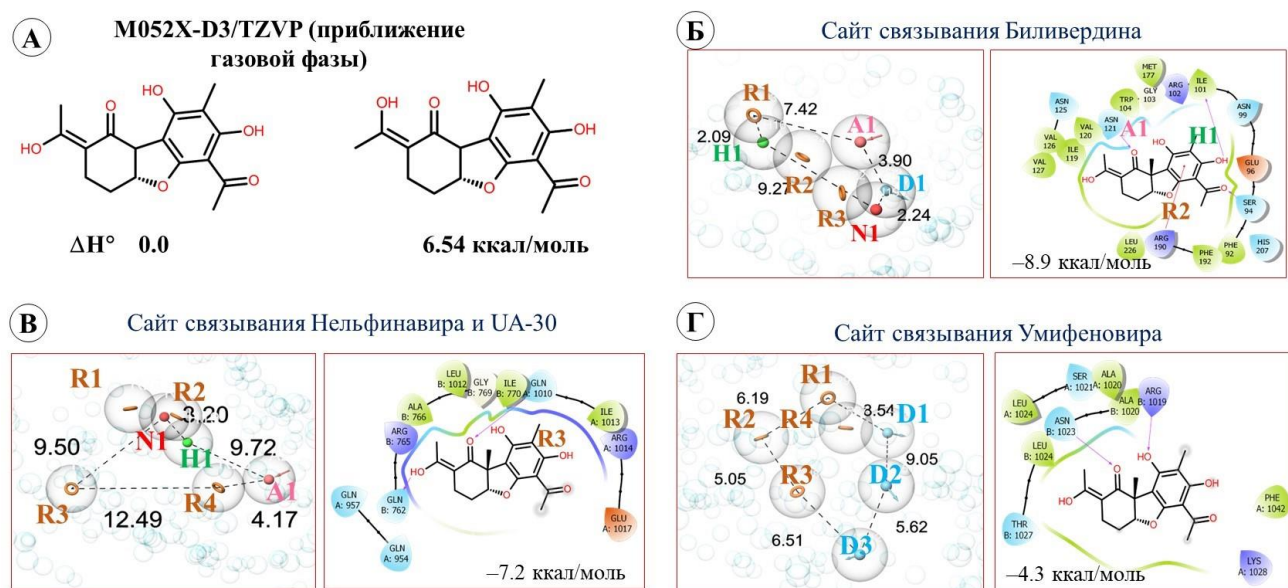
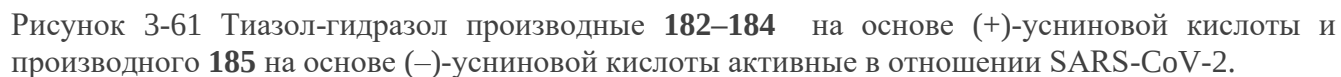


Рисунок 3-60 – Результаты квантово-химических расчетов и процедуры молекулярного докинга противовирусного агента **180** в вероятные сайты связывания S-белка.

По этой причине анализ результатов молекулярного докинга проводился только для E-изомера. Расположение лиганда **180** в сайте связывания биливердина характеризуется образованием водородных связей между атомами кислорода лиганда и аминокислотами I₁101, N₁121 и S₁94. Между ароматическим кольцом соединения-лидера и R₁190 формируется π -катион стекинг-взаимодействие. Три фармакофорных признака сайта связывания соответствуют лиганду (рисунок 3–60Б). Связываясь в области гептадных повторов (HR1), агент **180** образует только водородную связь с Q₂1080 (рисунок 3–60С). Наличие фармакофорного признака R3 в

Вышеописанные результаты позволяют предположить, что механизм противовирусного действия тиазол-гидрозон производных **182–184** на основе (+)-усниновой кислоты и производного **185** на основе (–)-усниновой кислоты (рисунк 3–61) также может быть связан с блокированием N-терминального домена. Соединения **182-185** нейтрализуют ряд патогенных штаммов инфекционного вируса SARS-CoV-2 в микромолярных концентрациях, а также ингибируют псевдовирусную систему, несущую на своей поверхности S-гликопротеин [304]. При этом, согласно результатам иммуноферментного анализа, производное **182** может ингибировать связывание рецептор-связывающего домена с клеточным ферментом (АПФ2), но в очень высоких концентрациях, порядка 250 мМ. Функция N-терминального домена связана с раскрытием РСД для обнажения мотива связывания с АПФ2. Расположение соединений **182-185** в сайте связывания биливердина N-ТД может оказать влияние на вторичную структуру домена и подвижность рецептор-связывающего домена.



Как уже упоминалось выше, полость связывания биливердина содержит ряд гидрофобных I₁₁₀₁, W₁₁₀₄, I₁₁₁₉, I₁₂₀₃, V₁₁₂₆, M₁₁₇₇, F₁₁₉₂, L₁₂₂₆, полярных N₁₉₉, N₁₁₂₁, N₁₁₈₈, S₁₂₀₅, H₁₂₀₇, положительно заряженных R₁₁₀₂, R₁₁₉₀ аминокислотных остатков, включая глицин в положении 103 (рисунок 3–59А). Аминокислотные последовательности N-концевого домена S-белка SARS-CoV-2 штаммов Wuhan B, Delta D.1.617.2 и Omicron B.1.1.529 различаются [308,309]. Однако в сайте связывания биливердина в радиусе до 4 Å расположены а.о. 95–214. Аминокислотные замены, которые описаны в указанных штаммах, удалены от сайта связывания на расстояние от 11 до 25 Å (таблица 3–22). Другими словами, можно предположить, что сайт связывания биливердина консервативен для большинства штаммов вируса SARS-CoV-2

Таблица 3-22 – Анализ аминокислотных замен в N-терминальном домене S-белка SARS-CoV-2 трех штаммов.

Штамм вируса	А.о. замены	Расстояние от сайта связывания, Å	Делеции	Расстояние от сайта связывания, Å
Delta (B.1.617.2)	T95I	~ 11	156-157	~ 10-12
	G142D	~ 13		
	Y145H	~ 20		
	F158G	~ 16		
Omicron BA.1	T95I	~ 11	143-145	~ 15
Omicron BA 5.2	G142D	~ 13		
	V213G	~ 18		
Omicron XBB.1.5	H146Q	~ 25	144	~ 22
	Q183E	~ 15		
	V213E	~ 18		
Omicron BQ1.1	G142D	~ 13		
	V213G	~ 18		

Процедура гибкого молекулярного докинга агентов **182–185** была проведена в сайт связывания биливердина (рисунок 3–59А, рисунок 3–62А). В качестве биологической мишени были использованы геометрические параметры N-терминального домена SARS-CoV-2 штамма Wuhan Lineages B. Оптимальная докинг-позиция соответствовала стабильному лиганд-белковому комплексу. Выбор был основан на анализе траекторий молекулярной метадинамики. На рисунке 3–62Б приведен анализ метадинамики для соединения-лидера **182**. Графики для других производных усниновой кислоты приведены в [приложении](#) данной работы (рисунок 5–6). Энергетические параметры молекулярного моделирования приведены в [таблице 3–23](#).

Анализ результатов расчетов позволяет отметить, что все исследуемые производные усниновой кислоты (**182–185**) могут связываться в сайте связывания биливердина. Расположение лигандов сопровождается образованием водородных связей с а.о. N₁₁₂₁ и L₁₁₀₁. Наибольшее количество водородных связей образует лиганд **185**.

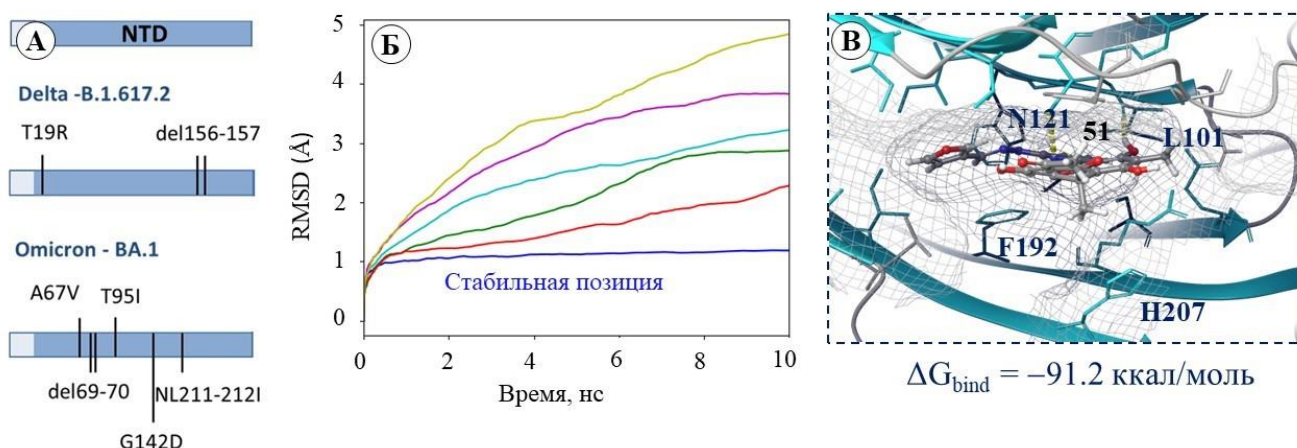


Рисунок 3-62 – Анализ результатов молекулярного моделирования: А – выравнивание аминокислотных последовательностей N-терминального домена трех штаммов вируса SARS-CoV-2; Б – изменение значений RMSD для рассматриваемых докинг-позиций агента **182** в течение метадинамики; В – расположение лиганда в сайте связывания.

Ароматические кольца соединений **183–185** образуют π - π стекинг-взаимодействия с ароматическими а.о. F₁₉₂, H₁₂₀₇ или с W₁₀₄. В целом энергетические параметры, характеризующие аффинность исследуемых соединений соизмеримы. Однако, согласно результатам молекулярной метадинамики, оптимальная докинг-позиция **182** наиболее стабильная. Величина pose score, которая характеризует суммарное колебание положений атомов лиганд-белковом комплексе, минимальная.

Таблица 3-23 – Результаты молекулярного моделирования

Агент	pIC ₅₀	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.		Pose Score (MD)	ΔG_{bind} , kcal/mol
					Водородные связи	другие		
182	6.19	-9.08	-96.26	-657.16	N ₁₂₁ L ₁₀₁	отсутствуют	1.18	-91.2
183	5.03	-10.27	-109.66	-657.93	N ₁₂₁ L ₁₀₁ Q ₁₇₃	F ₁₉₂ π - π стекинг	1.21	-70.5
184	5.97	-10.57	-100.47	-654.42	N ₁₂₁ I ₁₀₁	H ₁₂₀₇ π - π стекинг	2.37	-76.3
185	5.69	-7.18	-90.02	-653.17	Y ₁₇₀ I ₁₀₁ N ₁₉₉ R ₁₉₀ H ₁₂₀₇	W ₁₀₄ π - π стекинг	1.85	-84.1

В целом результаты молекулярного моделирования находятся в согласии с результатами биологических экспериментов. Соединение-лидер **182** ингибирует псевдовирусную систему в минимальных концентрациях и образует стабильный комплекс с N-терминальным доменом белка, согласно значению энергии связывания (ΔG_{bind}). Менее активное производное **183**

характеризуется самыми высокими значениями ΔG_{bind} . Все это свидетельствует об адекватном выборе биологической мишени.

Таким образом, совокупный анализ результатов биологических экспериментов и молекулярного моделирования позволяет предположить, что производные усниновой кислоты **178–185** проявляют активность в отношении SARS-CoV-2, по-видимому, за счет **влияния** на функцию N-терминального домена первой субъединицы поверхностного S-белка SARS-CoV-2. Вероятно, расположение лигандов в сайте связывания биливердина **стабилизирует** домен, что приводит к снижению его подвижности.

3.3. Ингибирующая активность малых молекул в отношении поверхностного F-белка РСВ

3.3.1. Фармакофорный профиль сайта связывания

Сайт связывания известных ингибиторов (или полость DS-Cav1 [129]) поверхностного F-белка респираторно-синцитиального вируса расположен в центральной части тримера. Ключевыми (с точки зрения связывания ингибиторов F-белка) аминокислотами являются F137; L138; F140; F141 со стороны пептида слияния и E487; F488; D489 со стороны гептадного повтора ([рисунок 3–63А](#)). Пептид слияния, расположенный на конце F₁ субъединицы, и α -спираль гептадного повтора (HRB), расположенная на C-конце F₂, претерпевают резкие конформационные перестройки в процессе слияния. Согласно [127], связывание ингибиторов внутри сайта связывания оказывает влияние на конформацию боковых цепей указанных а.о. и как следствие влияет на термодинамическую составляющую перехода из префузионной в постфузионную конформацию. Фармакофорный профиль сайта связывания был построен на основании расположения ключевых а.о. и содержит ряд значимых фармакофорных признаков ([рисунок 3–63Б](#)). Согласно профилю, лиганд должен содержать более одного ароматического фрагмента, донорную и акцепторную группу и минимум один гидрофобный фрагмент. Ранее в работах [81, 82] было показано, что высокая аффинность ингибиторов F-белка связана с наличием ароматического, в частности индольного, скаффолда и бокового положительно заряженного заместителя.

Полость сайта связывания ингибиторов F-белка была анализирована с помощью методологии идентификации SiteMap. Согласно результатам анализа, оценка сайта превышает 1 балл ([таблица 3–24](#)), что говорит о перспективности данного места связывания. Размер сайта подходит для связывания молекул, содержащих от 67 до 101 атома. Объем сайта более 500 Å³, гидрофобная составляющая более 3 единиц, донорно-акцепторный баланс равен 1.

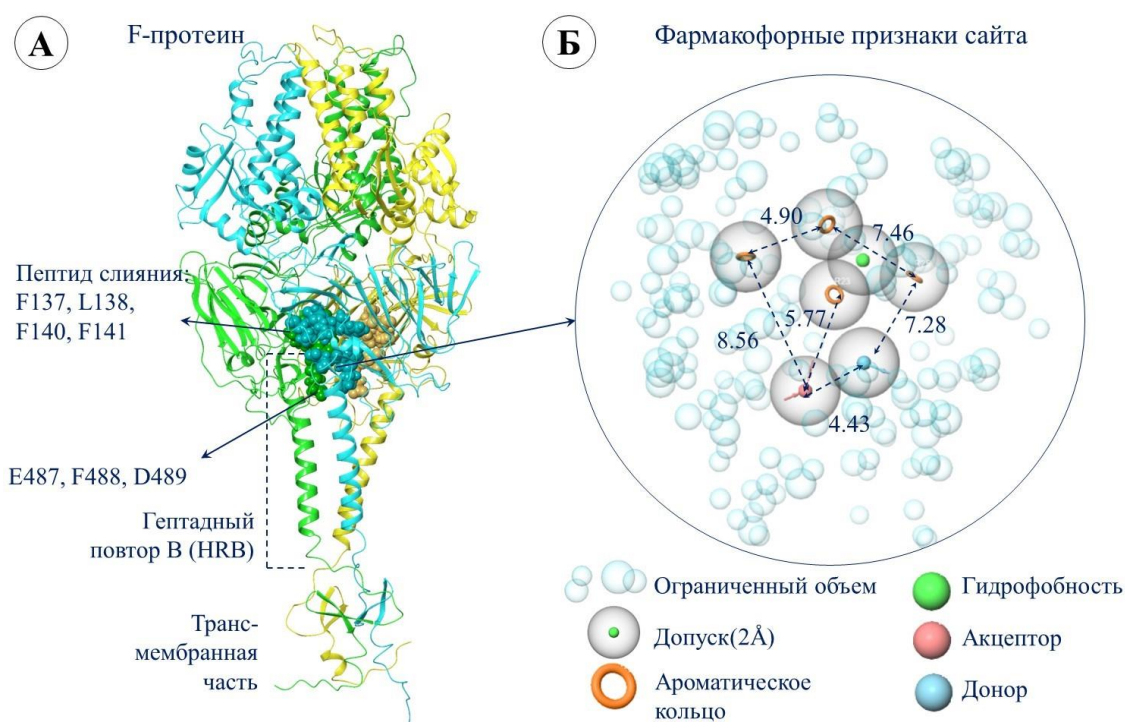


Рисунок 3-63 – Третичная структура F-белка респираторно-синцитиального вируса: А – показаны функциональные а.о. пептида слияния (а.о. 137–155) и гептадного повтора (HBR, а.о. 476–524); Б – фармакофорный профиль сайта связывания, расстояние между фрагментами указаны в Å.

Таблица 3-24 – Физико-химические дескрипторы сайта связывания ингибиторов F-белка.

Сайт	Балл сайта	Размер сайта	Объем, Å ³	Баланс	Донор/акцептор	Место расположение в протеине *
Полость связывания ингибиторов F-белка	1.158	202	532.0	3.094	1.075	Симметричное пространство внутри тримера а.о. петли слияния 137–141, и гептадного повтора 335, 337, 394, 396, 484-490

Таким образом, анализ сайта связывания позволяет предположить наличие следующих структурных и фармакофорных признаков подходящего для связывания лиганда: наличие трех-четырех ароматических колец, объёмных гидрофобных заместителей и по одной донорной и акцепторной группе. Объем лиганда не должен превышать 500 Å³, количество атомов в молекуле не более 100. Природа и характер связывания лигандов, описание которых представлено ниже, будет сравниваться с референсным соединением **RV521 (46)**, содержащим гидрофобные заместители, ароматические кольца и по одной донорной и акцепторной группе ([рисунок 1–28](#)). Объем молекулы **46** равен 405 Å³, количество атомов составляет 55.

3.3.2. Оценка аффинности производных кумаринов к сайту связывания ингибиторов F-белка [310,311]

Ряд замещенных кумаринов проявляют активность против респираторно-синцитиального вируса типа А и В [310]. Согласно результатам эксперимента по времени добавления, соединение-лидер **186** (рисунки 3–64) активно в течение 6 часов после заражения клеток РСВ, что позволяет рассматривать поверхностные вирусные белки F и G в качестве потенциальных биологических мишеней.

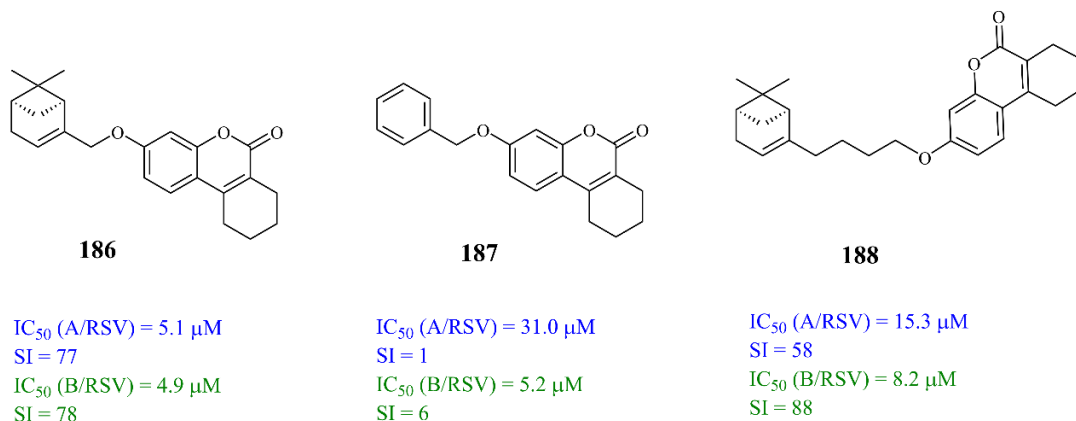


Рисунок 3-64 – Производные кумаринов активные в отношении РСВ.

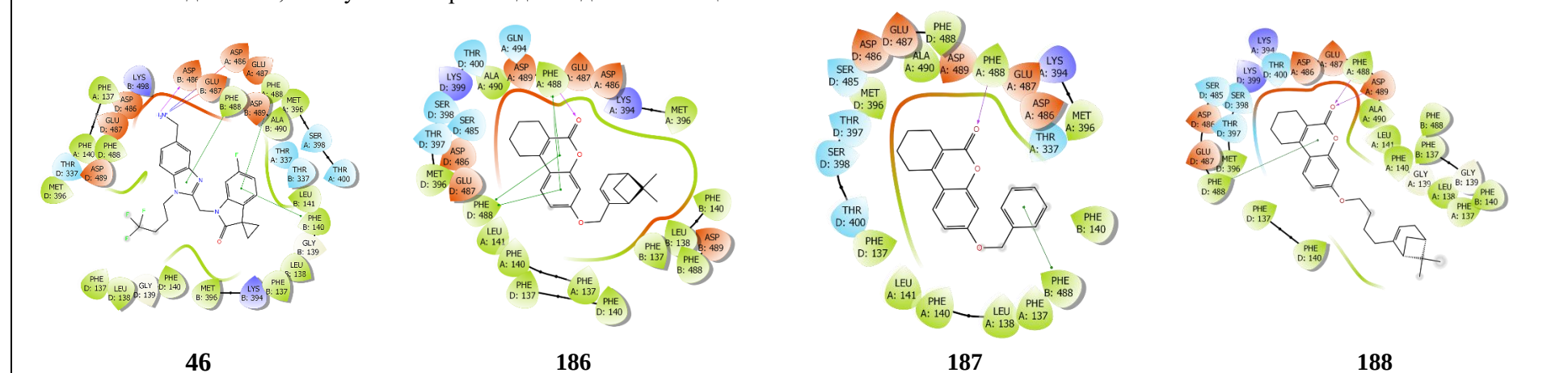
Активность агентов **186–188** в отношении РСВ типов А и В практически одинаковая. Известно, что гомологичность F-белка РСВ типов А и В составляет около 90%, в отличие от G-белка, который характеризуется высокой изменчивостью [131]. Эти рассуждения позволяют предположить, что производные кумаринов **186–188** проявляют противовирусную активность именно за счет ингибирования F-белка

Исследуемые соединения обладают схожими с референсным противовирусным агентом **RV521** или сисунатовир (**46**) фармакофорными признаками (рисунки 3–65), из которых ключевым является ароматический фрагмент, способный к образованию различного рода стекинг-взаимодействий с фенилаланинами (F137, F140, F141 и F488), расположенными в сайте связывания ингибиторов F-белка. Процедуры молекулярного докинга лигандов **46**, **186–188** были проведены в полость DS-Cav1 связывания ингибиторов F-белка. Энергетические параметры результатов стыковки производных кумаринов **186–188** сравнивали с референсным агентом **RV521** (сисунатовир) (таблица 3–25).

Таблица 3-25 – Результаты процедуры молекулярного докинга **46**, **186–188** в сайт связывания ингибиторов F-белка.

Структура	Кол-во позиций (макс 20)	LE (диапазон)	Docking score, ккал/моль (диапазон)*	Emodel (диапазон)	IFD score, ккал/моль (диапазон)	Взаимодействия с а.о.	Тип взаимодействия
46	20	0.35 (0.31 – 0.35)	-11.24 (-9.92 – -11.24)	-112.83 (-92.89 – -112.84)	-2963.43 (-2961.15 – -2963.43)	A: D486 B: E487	Солевой мостик
						B: D486	Водородная связь
						A: F488 B: F488 B: F140	π - π стекинг
186	20	0.37 (0.32 – 0.37)	-9.57 (-8.40 – -9.57)	-70.74 (-70.74 – -74.95)	-2960.50 (-2958.93 – -2960.50)	A: F488	Водородная связь
						A: F488 D: F488	π - π стекинг
187	15	0.37 (0.32 – 0.37)	-8.43 (-7.29 – -8.59)	-60.55 (-53.18 – -63.84)	-2960.72 (-2959.62 – -2960.72)	A: F488	Водородная связь
						B: F488	π - π стекинг
188	19	0.32 (0.24 – 0.33)	-9.23 (-6.97 – -9.23)	-71.71 (-54.43 – 71.71)	-2961.78 (-2959.07 – -2961.78)	A: F488; D489	Водородная связь
						B: F488	π - π стекинг

* – чем меньше диапазон, тем лучше воспроизведение докинг-позиций



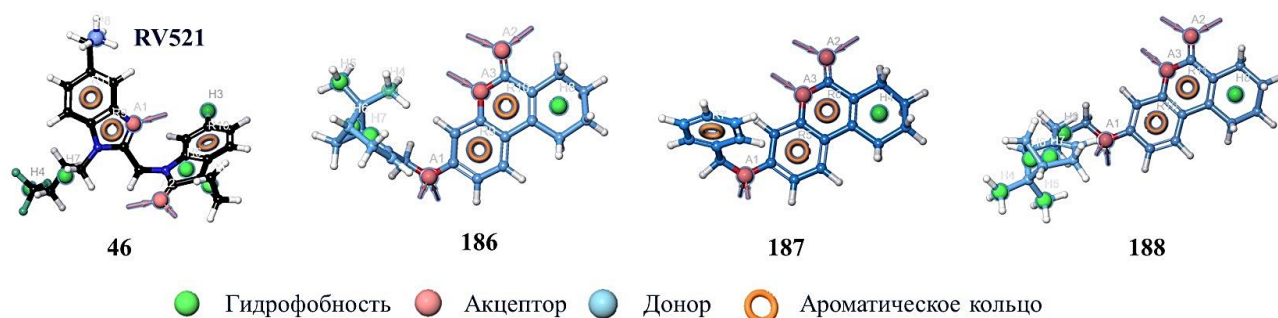


Рисунок 3-65 – Фармакофорные признаки соединений **46** и **186–188**.

Обращали внимание на расположение лигандов в сайте связывания и наличие межмолекулярных контактов с функциональными а.о. В целом энергетические параметры, характеризующие аффинность соединений **186–188** к сайту связывания, выше, чем значения, описывающие расположение референс-соединения- **46**. Связывание агента **RV521** характеризуется самыми низкими значения балла стыковки (docking score), энергии кластеризации (Emodel) и энергии лиганд-белкового комплекса (IFD score).

Показано [141], что сисунатовир (**46**) ингибирует репликацию РСВ в наномолярных концентрациях. Другими словами, результаты молекулярного докинга находятся в согласии с данными *in vitro* экспериментов. Связывание соединения **187** характеризуется высокими значениями энергетических параметров по сравнению с данными, соответствующими расположению в сайте связывания агентов **186** и **187**. Аффинность **186** и **188** примерно равная, однако в случае соединения **186** интервалы рассчитанных значений уже, что говорит о лучшем воспроизведении докинг-позиций. В целом результаты теоретических расчетов коррелируют с данными биологических экспериментов (таблица 3–25). Соединения **186–188** связываются в полости DS-Cav1 с образованием ряда π - π стекинг-взаимодействий с фенилаланинами пептида слияния и гептадного повтора (HRB). На рисунке 3–66А полость связывания DS-Cav1 выделена красным кругом. Элементы вторичной структуры F-протеина (рисунок 3-66А) соответствующие пептиду слияния показаны красным цветом, мембранному якорю – желтым цветом.

Кумариновый фрагмент лигандов **186–188** располагается в полости связывания в непосредственной близости к фенилаланинам F-белка и образует с ними π - π стекинг-взаимодействия (рисунок 3–66В-Д, таблица 3–25). Терпеновый фрагмент агентов **186** и **188** укладывается в гидрофобную полость, состоящей из а.о. пептида слияния (рисунок 3–66В и 3–66Д). Бензильный фрагмент соединения **187** в полость пептида слияния не попадает ввиду короткого линкера, соединяющего его с кумариновой частью молекулы. Лиганд **187** образует межмолекулярные взаимодействия только с а.о. мембранного якоря. Таким образом, в дополнение к высоким значениям энергетических параметров, характеризующим аффинность

производного кумаринов **187** к сайту связывания, можно отметить неполное заполнение лигандом функциональной полости сайта связывания.

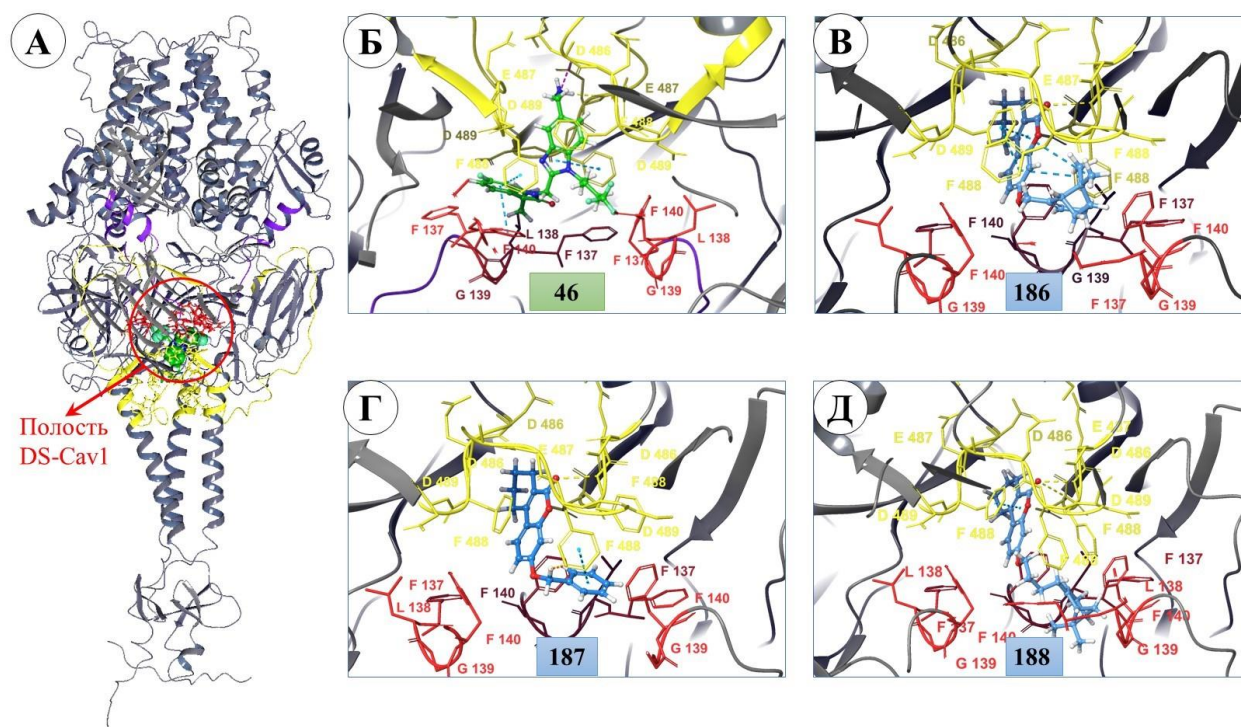


Рисунок 3-66 – Визуализация третичной структуры F-белка РСВ: А – тример F-белка РСВ: вторичная структура региона пептида слияния показана фиолетовым цветом (а.о. 137–157), функциональные а.о. (137–140) показаны красным цветом; а.о. (454–499) мембранного якоря показаны жёлтым цветом, структура сисунатовира (**46**) показана желтым цветом; Б – расположение соединения-референса **46** в сайте связывания; В–Д – расположение в сайте связывания ингибиторов **186–188** F-белка. π - π стекинг-взаимодействия показаны голубой прерывистой линией, водородные связи и солевые мостики – желтой и фиолетовой, соответственно.

Основной целью данной задачи был обоснованный выбор потенциальной биологической мишени, объясняющей противовирусную активность монотерпен-замещенных кумаринов. Выбор F-белка в качестве мишени был сделан на основании следующих рассуждений. Во-первых, анализ результатов биологических экспериментов свидетельствует о том, что соединение лидер **186** проявляет соизмеримую противовирусную активность в отношении РСВ типов А и В и наиболее активен в первые часы заражения клеток вирусом. Во-вторых, согласно общеизвестным данным, для F-белка РСВ типов А и В характерна высокая (более 90%) гомологичность, в отличие от G-белка, который характеризуется высокой изменчивостью. Наконец, анализ результатов молекулярного моделирования позволяет сделать вывод, что производные кумаринов **186–188** могут связываться в полости DS-Cav1 аналогично референс-соединению- **46** и оказывать влияние на конформацию боковых цепей функциональных а.о. сайта связывания.

Геометрические параметры оптимальной докинг-позиции соединения-лидера **186** в F-белке (далее комплекс **186-F**) были использованы для проведения молекулярно-динамической симуляции с целью оценки поведения лиганда в сайте связывания. Модельная система **186-F** была построена таким образом, чтобы трансмембранный домен белка (а.о. 525–550) был погружен в вирусную мембрану. Согласно анализу графика возмущений (RMSD), система лиганд-белок уравнилась к концу молекулярно-динамических симуляций (см. [приложение](#) к данной работе, [рисунок 5–7](#)). В течение всего времени симуляции лиганд **186** располагается внутри симметричного сайта связывания и не диффундирует в растворитель. Об этом также свидетельствуют данные контактов с а.о. сайта связывания в течение всего времени симуляции ([рисунок 3–67](#)). При анализе траектории временами регистрируются более 8 контактов между атомами а.о. сайта связывания и лиганда. В данном случае учитываются все возможные межмолекулярные взаимодействия: водородные связи, солевые мостики, гидрофобные контакты, а также контакты, опосредованные водой. Ряд аминокислот контактирует с лигандом в течение всего времени симуляции, а именно а.о. цепи А: F140; F488; цепи В: F140; F488; и цепи D: F137; R339; F448.

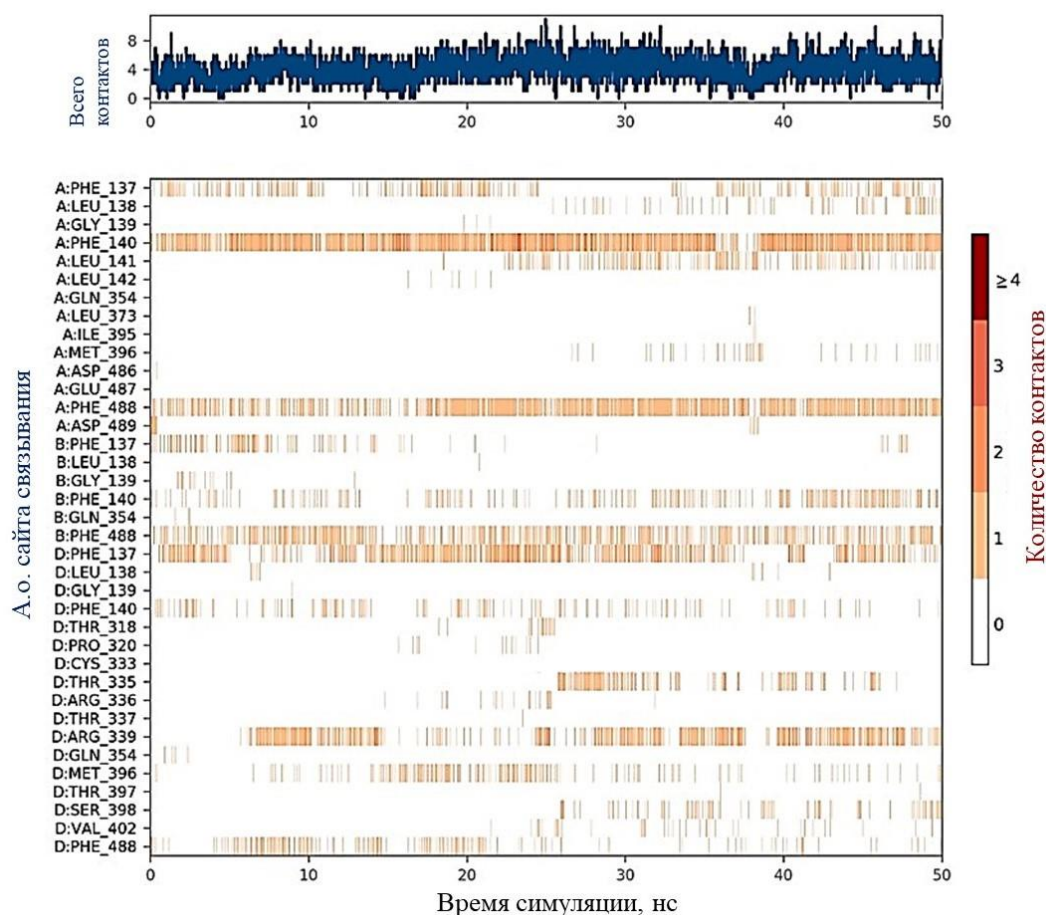


Рисунок 3-67 – Количество контактов, возникающих в течение времени симуляции комплекса **183-F**

Расположение лиганда **183** изменилось в течение МД симуляции по сравнению со стартовой позицией (рисунк 3–68А, Б). В стартовой позиции, соответствующей началу расчета, обращает на себя внимание расположение кумаринового фрагмента, выделенного на рисунке 3–66 сферой. Во время симуляции молекула разворачивается, и положение данного фрагмента изменяется. Располагаясь в сайте связывания, лиганд образует в основном гидрофобные взаимодействия с симметричным набором а.о. сайта связывания. Лиганд контактирует с а.о. трех протомеров (рисунк 3–68В, Г). В основном регистрируются гидрофобные π - π катионные стекинг-взаимодействия с фенилаланинами (F137, F140) петли слияния и F488 гептадного повтора (HRB). Подобные контакты фиксируются в течение 80% времени симуляции (рисунк 3–68Г). Дополнительно регистрируются непродолжительные по времени водородные связи и контакты, опосредованные водой, самым продолжительным из которых является взаимодействие с R339 (рисунк 3–68В).

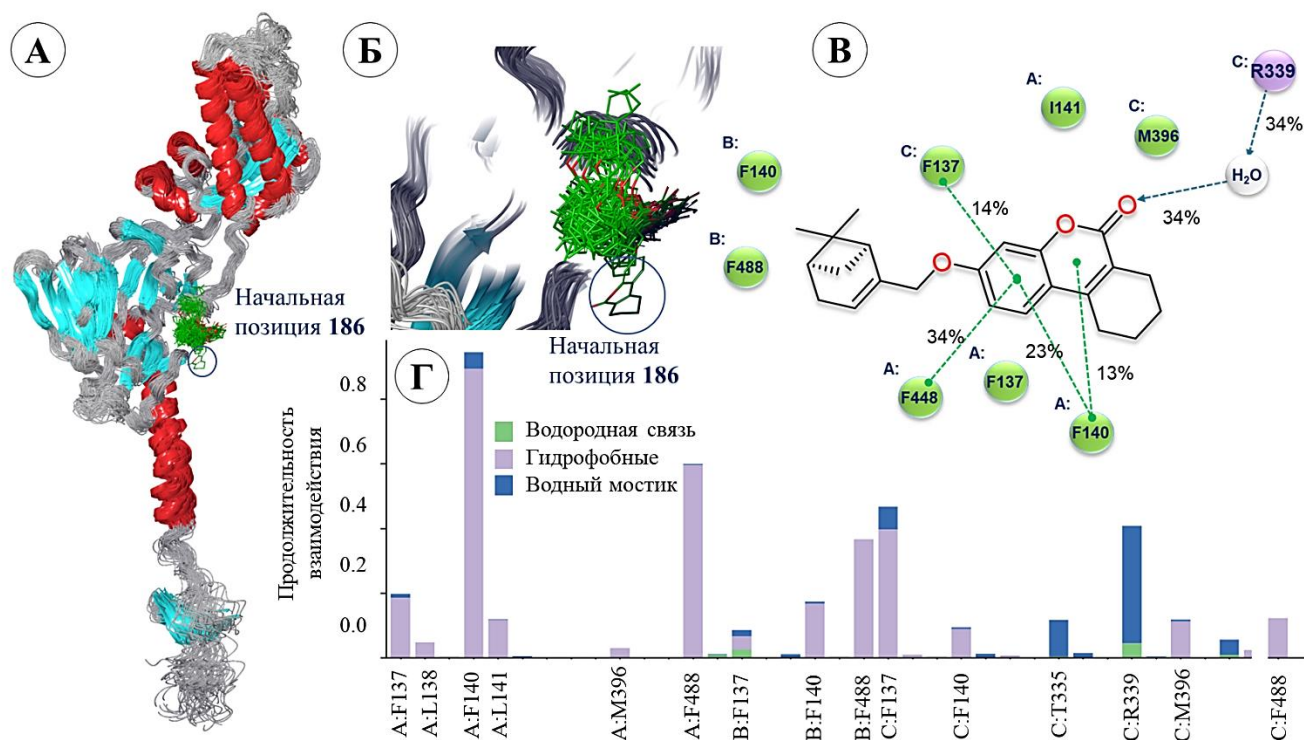


Рисунок 3-68 – Результаты молекулярно-динамической симуляций комплекса **186-F**: А – наложение геометрических параметров лиганд-белкового комплекса (для облегчения иллюстрации показан только протомер F-белка) соответствующих 50-ти фреймам с шагом 100, зеленым цветом показаны молекулы лиганда; Б – увеличение изображения суперпозиций лигандов в зависимости от времени симуляции; В – показана частота (в %) контактов между а.о. сайта связывания и атомами лиганда: π - π стекинг-взаимодействия показаны зелеными линиями, водородные связи – фиолетовой стрелкой; Г – гистограмма взаимодействия лиганда и а.о. сайтов связывания, по оси Y отложено время контакта (в долях) лиганда с а.о. Продолжительность взаимодействий соответствует доле времени молекулярно-динамических симуляций, где значение 0.8 соответствует 80% времени, в течение которого регистрируются межмолекулярные взаимодействия.

На основании результатов процедуры молекулярно-динамической симуляции можно отметить следующее: активное соединение **186** располагается внутри тримера F-белка в гидрофобной полости DS-Cav1, расположенной между пептидом слияния и α -спиралью гептадного повтора. Молекула образует ряд межмолекулярных контактов, в основном π - π стекинг-взаимодействий между ароматическими кольцами лиганда и ключевыми а.о., такими как фенилаланин. Межмолекулярные контакты продолжительны и сохраняются в течение всего времени симуляции. Таким образом, ингибирующее действие исследуемого соединения может быть связано с **влиянием на конформацию** боковых цепей F488, как это описано в работе [127].

Результаты молекулярного моделирования и биологических экспериментов, описанные выше, позволяют предположить, что и другие производные фенилкумаринов (**189–217**) могут рассматриваться в качестве потенциальных ингибиторов F-белка. С целью выяснения данного предположения соединения, представленные на [рисунке 3–69](#) были подвержены процедуре оценки на их соответствие фармакофорному профилю сайта связывания.

Соединения **189–217** были разделены на три основные группы: **первая** группа – производные пинена (бициклического монотерпена), соединенного с фенил-кумариновыми производными линкером разной длины (**189–206**); **вторая** группа – диеновый фрагмент, соединенный с фенил-кумариновыми производными (**210–213**) и ароматическое кольцо, соединенное с фенил-кумариновыми производными разной длины (**214–217**). Отдельно в третью группу были вынесены пары соединений стереоизомеров **189** и **190**, **194** и **195**, **199** и **200**, **203** и **204**. Ряд структурных дескрипторов исследуемых структур и их соответствие фармакофорному профилю сайта связывания представлены в [таблицах 3–26–3–28](#). Анализ данных [таблицы 3–26](#) позволяет отметить, что увеличение размера линкера приводит к увеличению значения липофильности (AlogP). При этом сумма поверхности всех полярных атомов (PSA) не превышает $49 \text{ \AA}^2$, что позволяет сделать вывод, что все исследуемые лиганды должны обладать хорошей мембранной проницаемостью [312]. В большинстве исследуемых лигандов наблюдается соответствие их фармакофорных фрагментов фармакофорным признакам сайта связывания. В основном это ароматические кольца лигандов. Наличие нужных структурных дескрипторов в лиганде вовсе не означает его расположение в «нужном» пространстве сайта, что также является важным параметром соответствия. Для соединений первой группы ([таблица 3–26](#)), содержащих гидрофобный пиненовый фрагмент, с минимальной длиной линкера $n = 1$, содержащего кислород (**189**, **194** и **199**), реализуется три соответствия: акцептор водородной связи и два ароматических фрагмента. У соединения **207** параметры соответствуют сайту связывания: донор водородной связи ($-\text{NH}-$), гидрофобный бициклический монотерпеновый и ароматический фрагменты. Соединение **207** более остальных соответствует фармакофорному профилю полости DS-Cav1.

Однако при этом его противовирусная активность невысокая в сравнении с остальными агентами. Для соединений с длиной линкера $n = 2$ или 3 наблюдается три соответствия: одно со стороны гидрофобного пиненового фрагмента и два со стороны фенил-кумариновой части. Для соединений с длиной линкера $n = 3$ характерно менее 3-х соответствий. Между тем, чем больше соответствий у лигандов фармакофорному профилю сайта связывания, тем более полноценно лиганд будет занимать все пространство сайта.

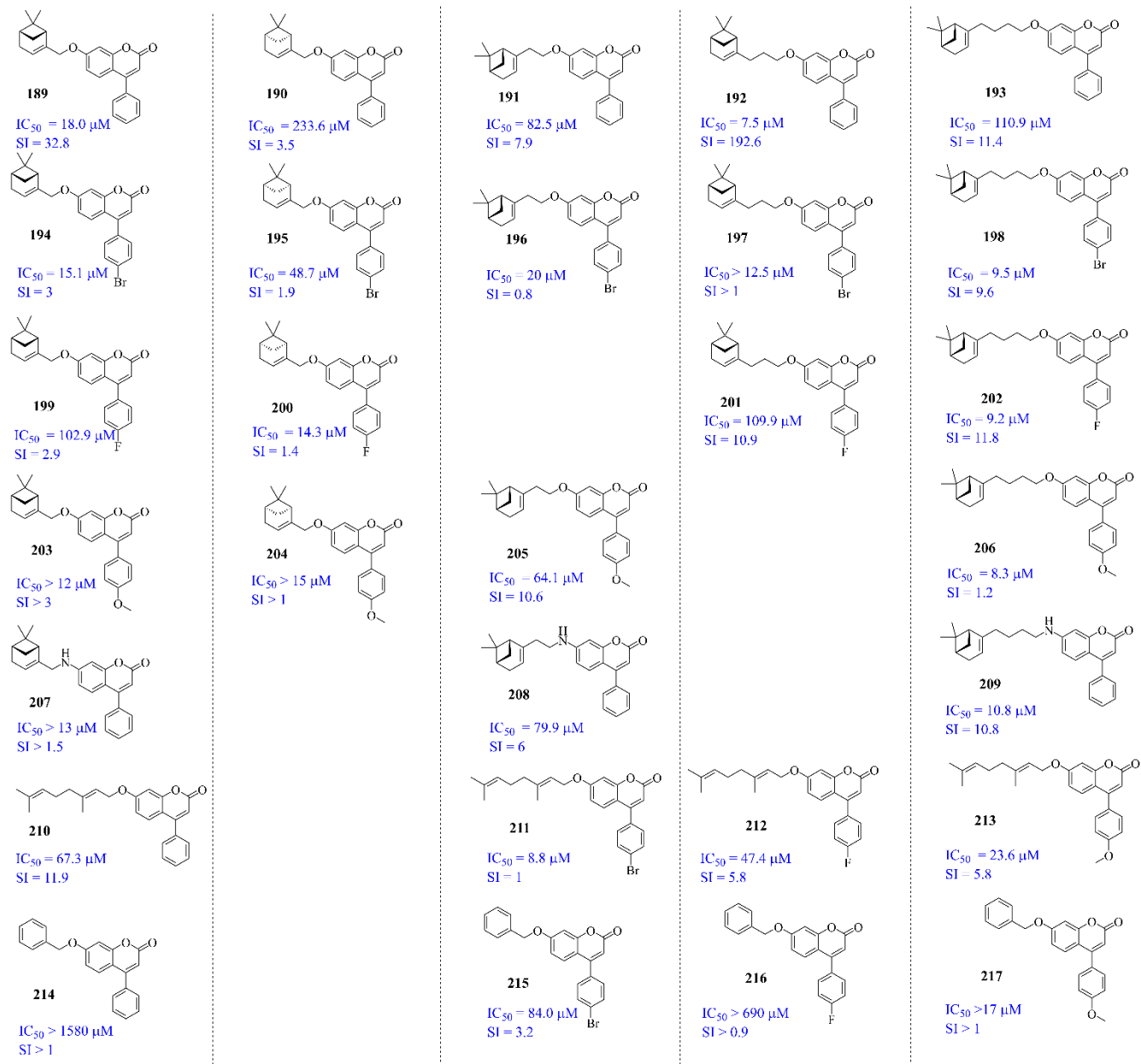


Рисунок 3-69 — Производные фенилкумаринов активные в отношении РСВ типа А — потенциальные ингибиторы F-белка.

Соединения с диеновыми заместителями (**210–213**) (таблица 3–27) имеют менее 3-х соответствий гидрофобной полости DS-Cav1, а соединения с ароматическим фрагментом (**214–217**) подходят сайту связывания только из-за наличия ароматических колец.

Таблица 3-26 – Анализ структурных дескрипторов соединений **группы 1** и их соответствие фармакофорному профилю сайта связывания ингибиторов F-белка.

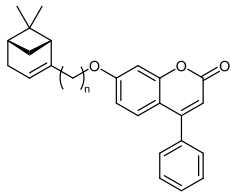
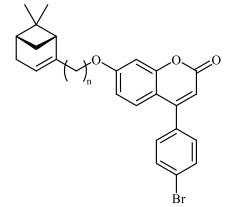
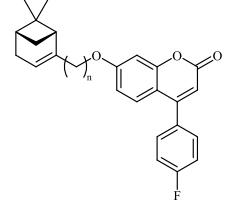
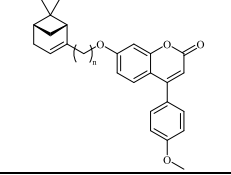
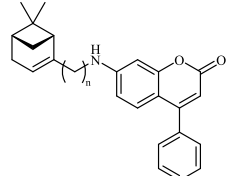
Структура и номер		–(CH ₂) _n –	M, Да	AlogP	PSA, Å ²	HBD	HBA	Соответствие сайту связывания	pIC ₅₀	SI
	189	1	372.5	5.65	39.44	0	3	3: A – 1 ; R – 2	4.75	32.8
	191	2	386.5	5.97	39.44	0	3	3: HP – 1 ; R – 2	4.08	7.9
	192	3	400.5	6.43	39.44	0	3	3: HP – 1 ; R – 2	5.10	192.6
	193	4	414.5	6.89	39.44	0	3	<3	3.95	11.4
	194	1	451.2	6.40	39.44	0	3	3: A – 1 ; R – 2	4.82	3.0
	196	2	465.4	6.72	39.44	0	3	3: HP – 1 ; R – 2	<4.7	<0.8
	197	3	479.4	7.18	39.44	0	3	3: HP – 1 ; R – 2	<4.9	<1
	198	4	493.4	7.64	39.44	0	3	<3	5.02	9.6
	199	1	390.5	5.86	39.44	0	3	3: A – 1 ; R – 2	3.99	2.9
	201	3	418.5	6.64	39.44	0	3	3: HP – 1 ; R – 2	3.96	10.9
	202	4	432.5	7.09	39.44	0	3	<3	5.03	11.8
	203	1	402.5	5.64	48.67	0	4	3: A – 1 ; R – 2	<4.9	<1
	205	2	416.5	5.96	48.67	0	4	3: HP – 1 ; R – 2	4.19	10.6
	206	4	444.5	6.87	48.67	0	4	3: HP – 1 ; R – 2	4.61	1.2
	207	1	371.5	5.48	42.24	1	2	4: D – 1 ; HP – 1 ; R – 2	<4.9	<1.5
	208	2	385.5	5.80	42.24	1	2	3: HP – 1 ; R – 2	4.10	6
	209	4	413.5	6.71	42.24	1	2	<3	4.70	10.8

Таблица 3-27 – Анализ структурных дескрипторов соединений **группы 2** и их соответствие фармакофорному профилю сайта связывания ингибиторов F-белка.

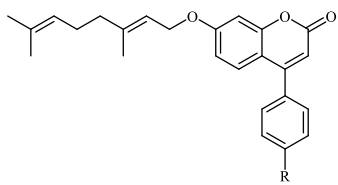
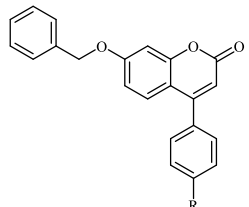
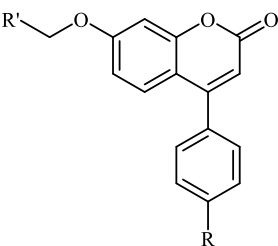
Структура и номер		–R	M, Да	AlogP	PSA	HBD	HBA	Соответствие сайту связывания	pIC ₅₀	SI
	210	–H	374.5	6.81	39.44	0	3	<3	4.17	11.9
	211	–Br	453.4	7.55	39.44	0	3	<3	5.05	1.0
	212	–F	392.5	7.01	39.44	0	3	<3	4.32	5.8
	213	–OCH ₃	404.5	6.79	48.67	0	4	<3	4.23	5.8
	214	–H	328.4	5.10	39.44	0	3	<3	<2.80	<0.9
	215	–Br	407.3	5.85	39.44	0	3	3: R – 3	4.08	3.2
	216	–F	346.4	5.30	39.44	0	3	3: R – 3	3.16	<0.9
	217	–OCH ₃	358.4	5.08	48.67	0	4	3: R – 3	<4.77	<1

Таблица 3-28 – Анализ структурных дескрипторов соединений пар стереоизомеров **группы 3** и соответствие фармакофорному профилю сайта связывания ингибиторов F-белка.

Структура и номер		$\begin{matrix} -R \\ -R' \end{matrix}$	M, Да	AlogP	PSA	HBD	HBA	Соответствие сайту связывания	pIC ₅₀	SI
	189	$\begin{matrix} R = H \\ R' = \end{matrix}$ 	372.5	5.65	39.44	0	3	3: A – 1 ; R – 2	4.75	32.8
	190	$R' = H$ 	372.5	5.65	39.44	0	3	<3	3.63	3.5
	194	$\begin{matrix} R = Br \\ R' = \end{matrix}$ 	451.2	6.40	39.44	0	3	3: A – 1 ; R – 2	4.82	3.0
	195	$R' =$ 	451.2	6.40	39.44	0	3	<3	4.31	1.9
	199	$\begin{matrix} R = F \\ R' = \end{matrix}$ 	390.5	5.86	39.44	0	3	3: A – 1 ; R – 2	3.99	2.9
	200	$R' =$ 	390.5	5.86	39.44	0	3	<3	4.84	1.4
	203	$\begin{matrix} R = -OCH_3 \\ R' = \end{matrix}$ 	402.5	5.64	48.67	0	4	3: A – 1 ; R – 2	<4.9	<1
	204	$R' =$ 	402.5	5.64	48.67	0	4	<3	<4.8	10.6

При этом агенты **214–217** характеризуются невысокими значениями противовирусной активности в отношении РСВ. В целом можно отметить, что лиганды, для которых характерно высокое значение pIC_{50} , имеют три и более соответствий фармакофорному профилю сайта. Структурные особенности стереоизомеров (таблица 3–28) влияют на их фармакофорное соответствие сайту связывания. Так, для стереоизомеров SS характерны более трех соответствий: акцептор водородной связи и ароматические кольца (таблица 3–26), а для RR – менее трех. При этом анализ значений pIC_{50} показывает, что в парах соединений **189–190** и **199–200** SS-стереоизомеры ингибируют репликацию вируса в меньших концентрациях, чем их RR-стереоизомеры.

Теоретический анализ, при котором рассматривается структурное соответствие фармакофорных дескрипторов потенциальных лигандов фармакофорному профилю сайта связывания, может быть использован в качестве первоначальной оценки. Корреляция фармакофорных соответствий сайту со значениями pIC_{50} , характеризующими противовирусную активность рассматриваемых соединений, весьма поверхностна. По этой причине исследуемые соединения были подвержены процедуре молекулярного докинга с последующей оценкой энергии связывания (ΔG_{bind}).

Молекулярный гибкий докинг был проведен для всех соединений **189–217**. Однако для оценки энергии связывания (ΔG_{bind}) были выбраны те агенты, значение противовирусной активности IC_{50} которых является значимым числом (рисунок 3–69). Выбор основывался на анализе энергетических параметров связывания, а также на расположении лигандов в сайте без стерических затруднений. Согласно результатам молекулярного докинга, все исследуемые соединения связываются в полости DS-Cav1 преимущественно с образованием π - π стекинг-взаимодействий с ароматическими а.о. сайта связывания. В ряде случаев расположение лигандов (**195**, **205**, **206**, **212**, **213**) сопровождается образованием водородной связи с аспарагиновой кислотой в положении 489 (D489). Агенты **197** и **206** формируют водородные связи с D486 и K488, соответственно (таблица 3–29).

На рисунке 3–70А показано расположение соединения-лидера **192** в сайте связывания F-белка. Лиганд располагается в центральной части протеина и окружен фенилаланинами петли слияния (F137, F140) и гептадного повтора (F488). В целом значения ΔG_{bind} коррелируют со значениями pIC_{50} (рисунок 3–70Б). Точка, соответствующая агенту **190**, «выпадает». При исключении ее из графика индекс корреляции возрастает с 0.51 до 0.68 единиц. Соединения **189** и **190** являются стереоизомерами, и, вероятно, их разная противовирусная активность может быть связана с их различным расположением в сайте связывания. Эта гипотеза будет рассмотрена в следующем разделе.

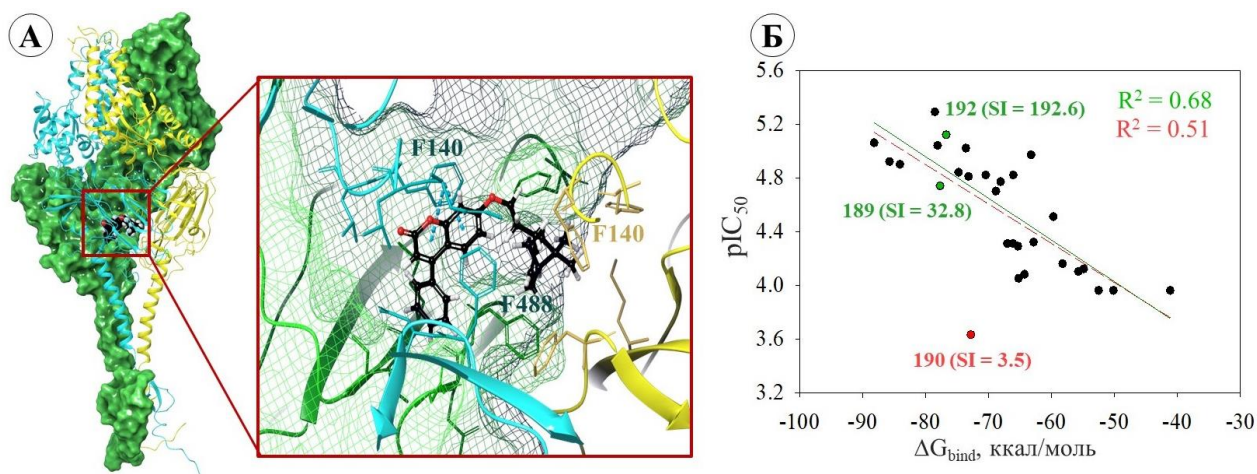


Рисунок 3-70 – Результаты молекулярного моделирования: А – расположение соединения-лидера **192** в полости DS-Cav1: разные протомеры белка показаны разными цветами, π - π стекинг-взаимодействия между ароматическими кольцами агента **192** и F140 показаны голубыми прерывистыми линиями; Б – взаимосвязь результатов оценки энергии связывания (ΔG_{bind}) и значений противовирусной активности (pIC_{50}) агентов **189-217** в отношении РСВ типа А.

Геометрические параметры лиганд-белкового комплекса соединения-лидера **192**, расположенного в полости F-белка (далее комплекс **192-F**), были использованы для проведения молекулярно-динамической симуляции. Трансmemбранный домен комплекса **192-F** был помещен в вирусную мембрану. Согласно анализу графику возмущений RMSD, система лиганд-белок уравнилась к 80 нс молекулярно-динамической симуляции (см. [приложение рисунок 5–8](#)). В течение всего времени лиганд располагается внутри симметричного сайта связывания и не диффундирует в растворитель. Располагаясь в полости DS-Cav1, лиганд **192** образует в основном гидрофобные взаимодействия с симметричным набором а.о. пептида слияния и гептадного повтора ([рисунок 3–71А](#)).

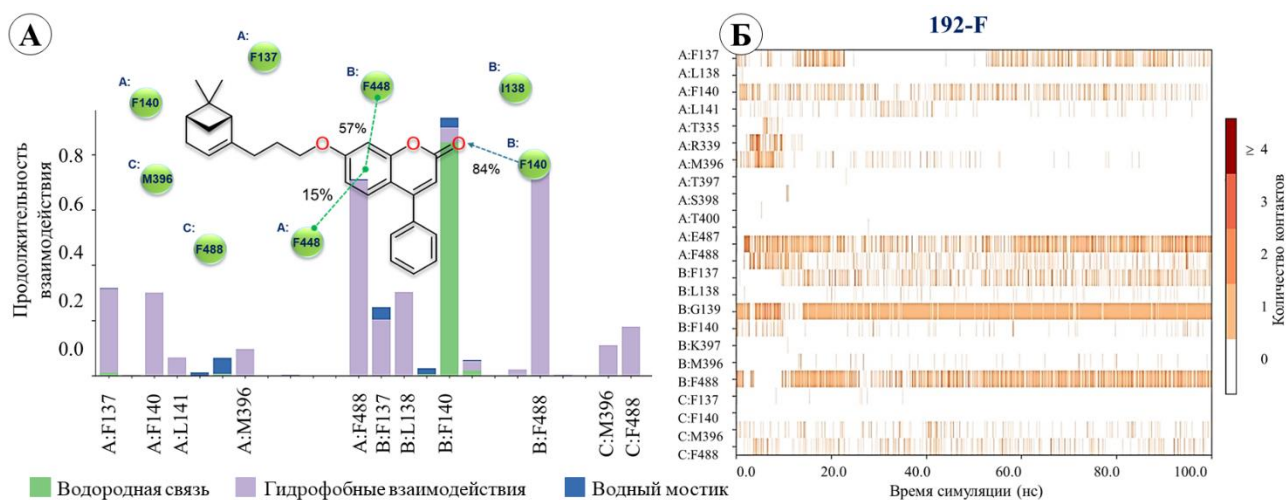


Рисунок 3-71 – Анализ траектории молекулярно-динамической симуляции комплекса **192-F**.

Более 80% времени симуляции сохраняется водородная связь между карбонильным кислородом и F140, более 50% – гидрофобный контакт с F488. Дополнительно регистрируются непродолжительные по времени контакты, опосредованные водой. В течение всего времени молекулярно-динамической симуляции лиганд образует продолжительные контакты с F140, E487, F488 и G139 ([рисунок 3–71Б](#)).

Таким образом, результаты молекулярного моделирования в совокупности с данными биологических экспериментов позволили обнаружить ингибитор F-протеина респираторно-синцитиального вируса среди производных фенил-кумаринов. Соединение лидер **192** характеризуется тремя из семи возможных фрагментов, соответствующих фармакофорному профилю полости DS-Cav1, и низкими значениями энергетических параметров связывания. Расположение агента **192** в сайте связывания сопровождается набором π - π стекинг-взаимодействий с функциональными ароматическими аминокислотами белка. Тем не менее, анализ молекулярно-динамической симуляции показывает, что расположение лиганда в сайте достаточно свободное. Количество межмолекулярных контактов, сохраняющихся более 50% времени симуляции, только два. Это наблюдение позволяет сделать предположение о необходимости структурной модификации данного соединения. Как минимум это должно быть введение одной функциональной группы – донора водородной связи, например, **формалинового** фрагмента или **аминогруппы**. Именно похожие фрагменты в известных ингибиторах F-белка **41** и **44** ([рисунок 1–28](#)) приводят к образованию дополнительного солевого мостика между положительно-заряженными фрагментами лиганда и отрицательно заряженными а.о.: D486 и E487 [127].

Таблица 3-29 – Результаты процедуры молекулярного докинга производных фенил-кумаринов (189–217) в сайт связывания ингибиторов F-белка

Номер соединения	pIC50	Кол-во докинг-позиций (max 20)	Docking score, ккал/моль	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.		ΔG_{bind} , ккал/моль
					Водородные связи	Другие типы взаимодействий	
189	4.75	12	-9.27	-3108.97	Отсутствуют	A: F488 – π - π стекинг B: F140; F488 – π - π стекинг B: F140; L141 – гидрофобные D: F140; F488 – π - π стекинг	-77.7
190	3.63	9	-8.31	-3106.42	Отсутствуют	A: F488 – π - π стекинг B: F488 – π - π стекинг D: F137; L138; Fe140; L141 – гидрофобные	-72.8
191	4.08	16	-9.05	-3106.64	Отсутствуют	D: F488 – π - π стекинг D: F137; L138; F140; L141 – гидрофобные	-64.8
192	5.12	17	-10.26	-3108.15	Отсутствуют	A: F140 – гидрофобные B: F140 – π - π стекинг B: F488 – π - π стекинг B: F137; L138; F140; L141 – гидрофобные D: F137; L138; F140; L141 – гидрофобные	-76.3
193	3.95	17	-9.22	-3107.32	Отсутствуют	A: F488 – π - π стекинг B: F488 – π - π стекинг	-50.2
194	4.82	14	-9.70	-3108.88	Отсутствуют	A: F488 – π - π стекинг A: F137; F140 – гидрофобные B: F140; L141 – гидрофобные B: F488 – π - π стекинг D: F140; F488 – π - π стекинг	-70.5
195	3.92	19	-8.14	-3106.38	A: D489	D: F137; L138; F140 – гидрофобные	-66.1
197	5.02	12	-9.72	-3110.20	A: F488 D: D486	A: F140 – гидрофобные B: F488 – гидрофобные D: F137, F138 – гидрофобные D: F488 – π - π стекинг	-73.6
198	3.99	17	-9.03	-3107.49	Отсутствуют	A: F488 – π - π стекинг D: Fe488 – π - π стекинг D: F137; L138; F140 – гидрофобные	-52.5
200	4.84	6	-9.07	-3109.40	Отсутствуют	A: F488 – π - π стекинг A: F137; F140 – гидрофобные B: F140; L141 – гидрофобные D: F140; F488 – π - π стекинг	-74.7
201	3.96	17	-9.20	-3107.86	Отсутствуют	A: F140 – π - π стекинг A: F140 – гидрофобные B: M396 – гидрофобные B: F140 – π - π стекинг D: F137; L138; F140 – гидрофобные	-41.1
202	5.03	13	-9.99	-3108.68	Отсутствуют	A: F488 – π - π стекинг B: F140 – π - π стекинг D: F140 – π - π стекинг D: F137; L138; F140 – гидрофобные	-78.1

Таблица 3–27 – Продолжение.

Номер соединения	pIC ₅₀	Кол-во докинг-позиций (max 20)	Docking score, ккал/моль	IFD score, ккал/моль	Взаимодействия с а.о.		ΔG_{bind} , ккал/моль
					Водородные связи	Другие типы взаимодействий	
205	4.16	18	-8.94	-3107.42	A: F×488 A: D489	A: K498 – π-катион стекинг D: F488 – π-π стекинг D: F137; L138; F140; L141 – гидрофобные	-58.2
206	4.97	18	-9.86	-3110.34	A: F488 A: D489 B: K498	B: P484 – гидрофобные D: F488 – гидрофобные	-63.2
208	4.10	17	-8.86	-3106.99	Отсутствуют	A: F140 – гидрофобные A: F488 – π-π стекинг B: F488 – π-π стекинг D: F137; L138; F140; L141 – гидрофобные D: F140 – π-π стекинг	-55.7
209	4.29	17	-9.48	-3109.86	Отсутствуют	A: F488 – π-π стекинг B: F140 – π-π стекинг; F488 – гидрофобные D: F140 – π-π стекинг D: F140, L141 – гидрофобные	-65.4
210	4.12	17	-8.70	-3108.00	Отсутствуют	A: F488 – π-π стекинг A: F140 – гидрофобные B: F140 – π-π стекинг D: F137; L138; M396; F488 – гидрофобные D: F140 – π-π стекинг	-54.9
211	5.06	17	-9.50	-3110.11	Отсутствуют	A: F488 – π-π стекинг A: F137; F140 – гидрофобные B: F140; L141 – гидрофобные B: F488 – π-π стекинг D: F140; F488 – π-π стекинг	-88.2
212	4.32	15	-8.86	-3108.25	A: D489 A: F488	A: K498 – π-катион стекинг B: F137; F140; F488 – гидрофобные D: F140; F488 – гидрофобные	-62.8
213	4.31	13	-8.97	-3109.54	A: D489 A: F488	B: F488 – π-π стекинг B: F137; L138; F140 – гидрофобные	-67.02
215	4.05	8	-8.99	-3109.05	Отсутствуют	A: F488 – π-π стекинг B: F140; F488 – π-π стекинг B: F140; L141 – гидрофобные D: F140; F488 – π-π стекинг	-65.3

3.3.3. Могут ли методы молекулярной динамики и метадинамики объяснить разную противовирусную активности разных стереоизомеров? [313]

Согласно результатам биологических экспериментов разные стереоизомеры монотерпеновых производных фенилкумаринов в парах (**189** и **190**, **194** и **195**, **199** и **200**) проявляют различную противовирусную активность в отношении РСВ типа А (рисунок 3–69). Анализ их фармакофорного профиля позволил определить, что для SS-стереоизомеров (**189**, **194** и **199**) характерно более трех соответствий фармакофорному профилю сайта связывания ингибиторов F-белка (таблица 3–28), а именно два ароматических кольца и акцептор водородной связи. Для RR-изомеров отмечается менее трех соответствий, только два ароматических кольца, способных к образованию стекинг-взаимодействий с ароматическими а.о. сайта связывания. Этот результат предполагает различное расположение стереоизомеров в полости DS-Cav1.

Противовирусная активность пары стереоизомеров **189** и **190** различается более чем на порядок (рисунок 3–69). Оба соединения связываются в сайте связывания ингибиторов F-белка примерно с соизмеримыми значениями энергетических параметров молекулярного докинга (таблица 3–29). При этом значения энергии связывания (ΔG_{bind}) также соизмеримы: агент **189** связывается в полости белка с энергией связывания равной -77.7 ккал/моль, в то время как его стереоизомер **190** характеризуется значением в -72.8 ккал/моль. Как было показано выше, при поиске взаимосвязи значений противовирусной активности pIC_{50} и энергий связывания, точка на графике (рисунок 3–70Б), соответствующая агенту **190**, «выпадает».

Визуальный анализ результатов молекулярного докинга показывает, что оба стереоизомера, **189** и **190**, располагаются в полости DS-Cav1 в центре тримера. Фенилкумариновый фрагмент SS-стереоизомера **189** размещен в центре тримера между цепями А, В и С (на рисунке 3–72 протомеры белка окрашены в различные цвета, цепь А в зеленый; цепь В – в синий, цепь С – в желтый). Между ароматическим фрагментом **189** и F488 образуются π - π стекинг-взаимодействия (рисунок 3–72А). Монотерпеновая часть расположена ближе к протомеру В, образуя ряд гидрофобных контактов с F140 и L141 (таблица 3–29). Оптимальная докинг-позиция RR-стереоизомера **190** отличается от расположения агента **189** (рисунок 3–72Б). Фенилкумариновый фрагмент молекулы **190** также образует π - π стекинг-взаимодействия с фенилаланинами гептадных повторов (F488), однако монотерпеновая часть молекулы обращена к протомеру С с образованием гидрофобных взаимодействий с F137, L138, F140 и L141.

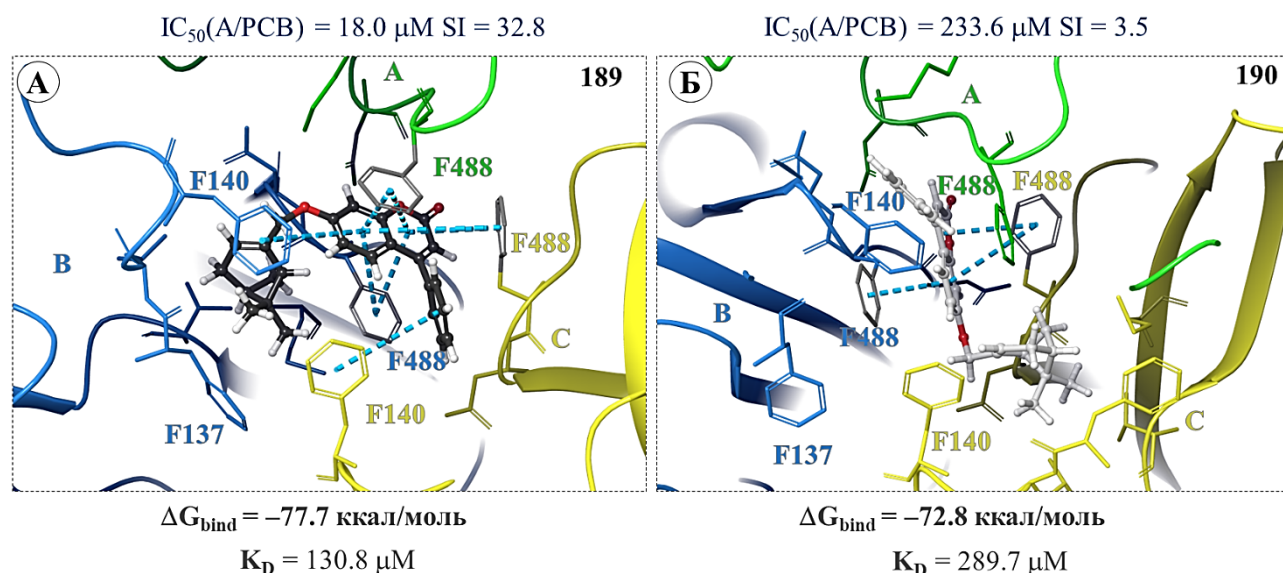


Рисунок 3-72 – Расположение стереоизомеров **189** (А) и **190** (Б) в сайте связывания ингибиторов F-белка. Цепочки разных протомеров окрашены в разные цвета: цепь А в зеленый; цепь В – в синий, цепь D – в желтый. Голубыми прерывистыми линиями показаны π-π стекинг-взаимодействия.

Оцененная методом, сочетающим молекулярную механику и модель непрерывной сольватации, энергия связывания соединения **189** с F-белком на 4.9 ккал/моль ниже энергии связывания агента **190**. С точки зрения термодинамики, комплекс **189-F** энергетически стабильнее, чем комплекс **190-F**. Однако здесь возникает закономерный вопрос: 4.9 ккал/моль – это достаточно ли существенная разница в энергии связывания, чтобы объяснить различия в противовирусной активности производных кумаринов **189** и **190**? Молекулярный докинг с последующими уточняющими расчетами позволяет получить термодинамическую характеристику связывания, которая может быть преобразована в константу ингибирования по формулам 2-8 – 2-10 (п.2.4.4.). В результате расчета (рисунок 3-72) можно отметить, что ингибирующая способность агента **189** должна быть в два раза выше, чем агента **190**. Однако биологические эксперименты показывают существенную разницу в противовирусной активности данных соединений. Конечно, проводить прямое сравнение теоретического значения константы ингибирования и экспериментального значения IC₅₀, характеризующего активность соединений в отношении инфекционного вируса, не совсем корректно. Тем не менее, взаимосвязь между K_D и IC₅₀ все же существует [314]. Тщательный анализ результатов молекулярного докинга позволяет сделать вывод, что связывание двух исследуемых стереоизомеров **189** и **190** различается расположением молекул в пространстве сайта и их энергетическими параметрами.

Геометрические параметры оптимальных докинг-позиций, соответствующих комплексам **189-F** и **190-F**, были использованы для построения стартовых систем для молекулярно-динамических симуляций. Модельные системы включали вирусную мембрану, расположенную

в области трансмембранного домена белка. Поведение лигандов было исследовано в течение 100 нс с интервалом в 20 пс (5000 фреймов). Анализ графиков RMSD показывает, что обе системы уравнились к концу расчета (см. [приложение рисунок 5–9](#)). Колебания RMSD для протеина и лиганда не превышают 2–3 Å, что свидетельствует об адекватности стартовых систем и используемого протокола симуляции. Кроме того, было рассмотрено среднеквадратичное смещение положений атомов боковой цепи протеина (RMSF) в комплексах **189-F** и **190-F** с целью оценки степени влияния лиганда на боковые цепи а.о. сайта связывания ([рисунок 3–73](#)). На [рисунке 3–73](#) голубым цветом показаны графики смещения атомов боковых цепей а.о. F-белка. Нумерация а.о. всего белка сквозная и начинается с номера 1 протомера А и не соответствует нумерации PDB кода. Взаимодействия атомов лиганда с а.о. протеина показаны зеленым цветом.

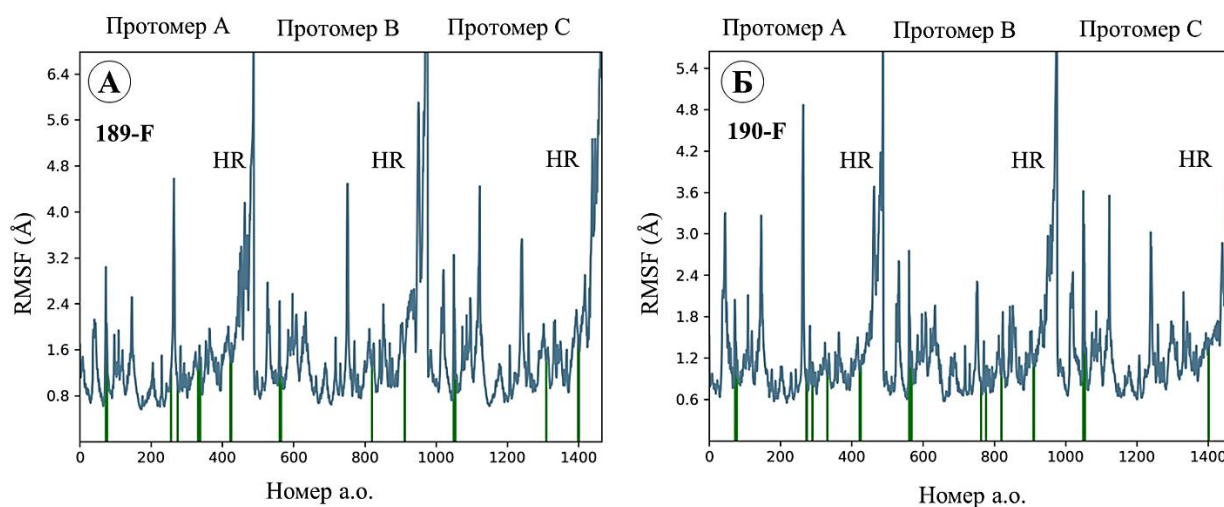


Рисунок 3-73 – Среднеквадратичные флуктуации смещения атомов боковых цепей а.о. в комплексах А – **189-F** и Б – **190-F**. HR – гептадные повторы. Пояснения в тексте.

Анализ [рисунка 3–73](#) позволяет отметить, что оба лиганда преимущественно контактируют с аминокислотами петли слияния и гептадных повторов, причем количество регистрируемых контактов примерно равное для обоих стереоизомеров. Тем не менее, флуктуация боковых цепей гептадных повторов в комплексе **189-F** превышает 6.4 Å ([рисунок 3–73А](#)), в то время как в комплексе **190-F** это значение на 1 Å меньше ([рисунок 3–73Б](#)). Количество и продолжительность контактов между атомами лиганда и аминокислотами сайта связывания представлены на [рисунке 3–74](#). Анализ гистограмм позволяет отметить, что соединение **190** контактирует с большим количеством а.о. ([рисунок 3–67А](#)), чем агент **189**. Самые частые гидрофобные взаимодействия в случае SS-стереоизомера **189** регистрируются между атомами лиганда и F137 протомера А, F140, F488 протомера В и F488 протомера С. Также наблюдается образование непродолжительного по времени солевого мостика с D486. Атомы RR-

стереоизомера **190** чаще всего контактируют с F488 протомера А, F140, F488 протомера В и F488 протомера С.

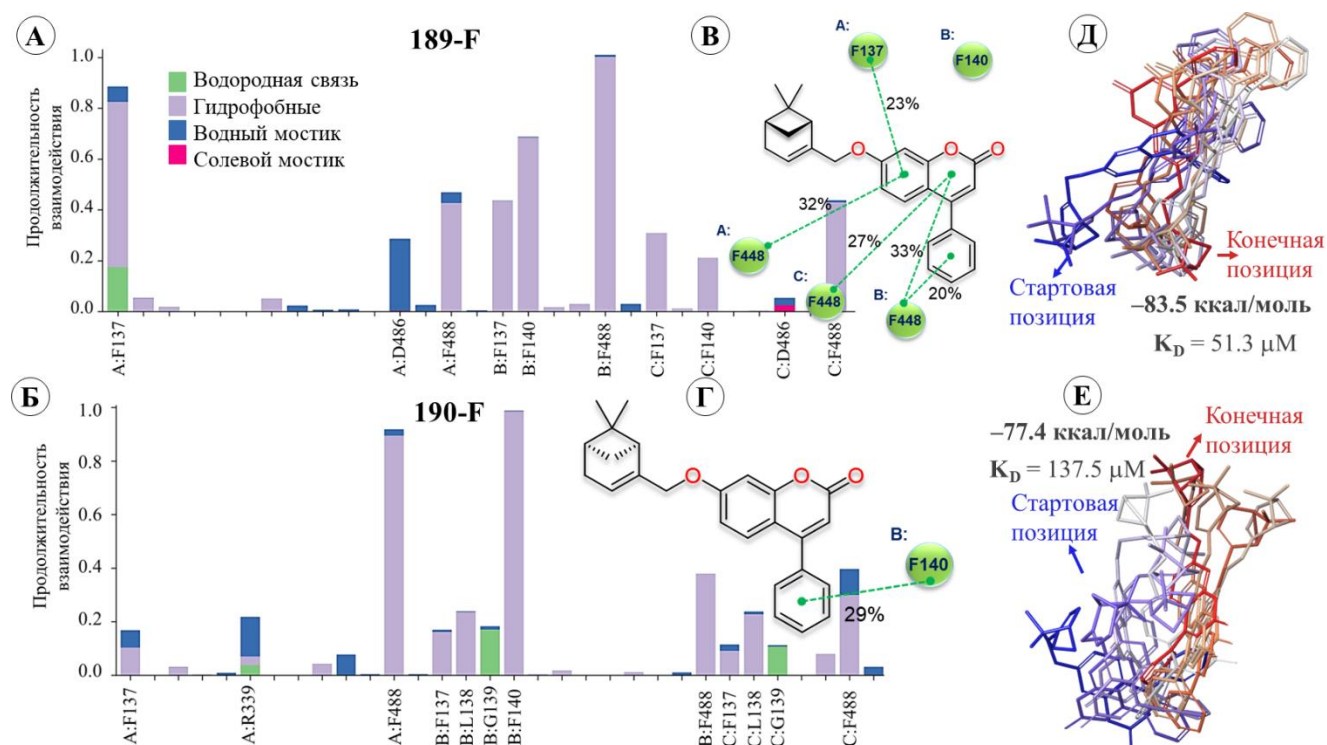


Рисунок 3-74 – Результаты молекулярно-динамических симуляций комплексов **189-F** и **190-F**: А, Б – гистограммы частоты взаимодействий атомов лиганда и а.о. сайта связывания. За 1 принято значение в 100% времени симуляции. В, Г – продолжительность межмолекулярных взаимодействий между атомами лиганда и а.о. сайта связывания. Г, Д – наложение геометрических параметров лигандов, начиная со стартовой позиции (синяя молекула), до конечной (красная) с шагом 500. Энергия связывания (ΔG_{bind}) представлена в ккал/моль.

Более 20% времени симуляции сохраняются π - π стекинг-взаимодействия между фенилкумариновым фрагментом соединения **189** и фенилаланинами сайта связывания, а именно с F137 протомера А с фенилаланинами F488 трех протомеров (рисунок 3-74В). В случае производного **190** продолжительный по времени симуляции π - π стекинг регистрируется только между ароматическим заместителем кумаринового фрагмента и F140 протомера В (рисунок 3-74Г). Анализ молекулярно-динамических симуляций также демонстрирует разницу в связывании двух стереоизомеров. Запись геометрических параметров лигандов на каждом 500-м шаге симуляции (рисунок 3-74Д и Е) позволяет отметить, что соединение **190** более свободно перемещается в сайте связывания, чем агент **189**. На рисунке 3-74Д и Е лиганд, соответствующий стартовой позиции моделирования, окрашен в синий цвет, в то время как лиганд, соответствующий конечной позиции – в красный. Геометрические параметры комплексов, соответствующих последним шагам симуляции, были выгружены, минимизированы и использованы для оценки энергии связывания и константы ингибирования. Процедуры

молекулярной динамики позволили найти более энергетически выгодные положения лигандов в сайте связывания, что привело к уменьшению значений энергии связывания на 5–6 ккал/моль. Разница в значениях констант ингибирования **189** и **190** стала более заметной.

Для процедуры метадинамики, позволяющей оценить поверхность потенциальной энергии взаимодействия лигандов с заданными а.о. сайта связывания, были использованы геометрические параметры комплексов, соответствующих последним фреймам симуляции. В качестве коллективных переменных были заданы расстояния от центра масс лиганда и аминокислот, с которыми в течение молекулярно-динамических симуляций были зарегистрированы частые и продолжительные по времени межмолекулярные контакты. Так, для системы **189-F** были выбраны расстояния от центра масс лиганда **189** до F137 протомера А и F488 протомера В. В случае расчета комплекса **190-F** в качестве коллективных переменных были назначены расстояния от молекулы **190** до аминокислот F488 протомера А и F140 протомера В. Согласно данным гистограмм (рисунок 3–74В и Г), продолжительность межмолекулярных взаимодействий с этими аминокислотами превышает 80% времени МД симуляции. МД симуляции методом метадинамики были проведены в течение 50 нс. В результате были получены срезы поверхности потенциальной энергии (рисунок 3–75).

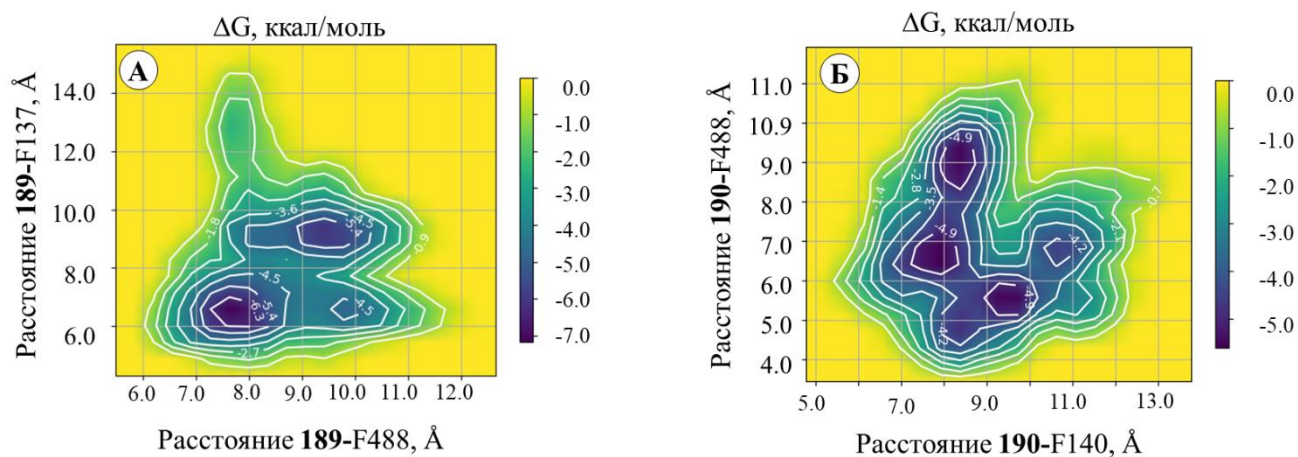


Рисунок 3-75 – Энергетический профиль нековалентного взаимодействия соединений **189** и **190** с аминокислотами сайта связывания ингибиторов F-белка.

Анализ энергетических бассейнов позволяет отметить, что минимальные расстояния между производным кумарина **189** и заданными аминокислотами соответствуют минимуму энергии (рисунок 3–75А), в отличие от анализа поверхности свободной энергии взаимодействия агента **190** с а.о. F140 и F488 (рисунок 3–75Б). Минимальные расстояния между парами **190-F140** и **190-F488** не соответствуют минимуму энергии. Различная противовирусная активность стереоизомеров **189** и **190** может быть объяснена различным расположением лигандов в сайте

связывания и различными энергетическими характеристиками связывания. Результаты молекулярного моделирования согласуются с результатами экспериментов.

3.3.4. Аналоги борнеола – ингибиторы F-белка [315]

Как показывают результаты биологических и теоретических исследований, соединения на основе эфиров (–)-борнеола могут проявлять противовирусную активность как против вируса гриппа [12, 67], так и против патогенных штаммов SARS-CoV-2 [301]. Кроме того, недавние исследования показывают, что *N*-содержащие эфиры (–)-борнеола (рисунк 3–76) проявляют активность против РСВ типа А.

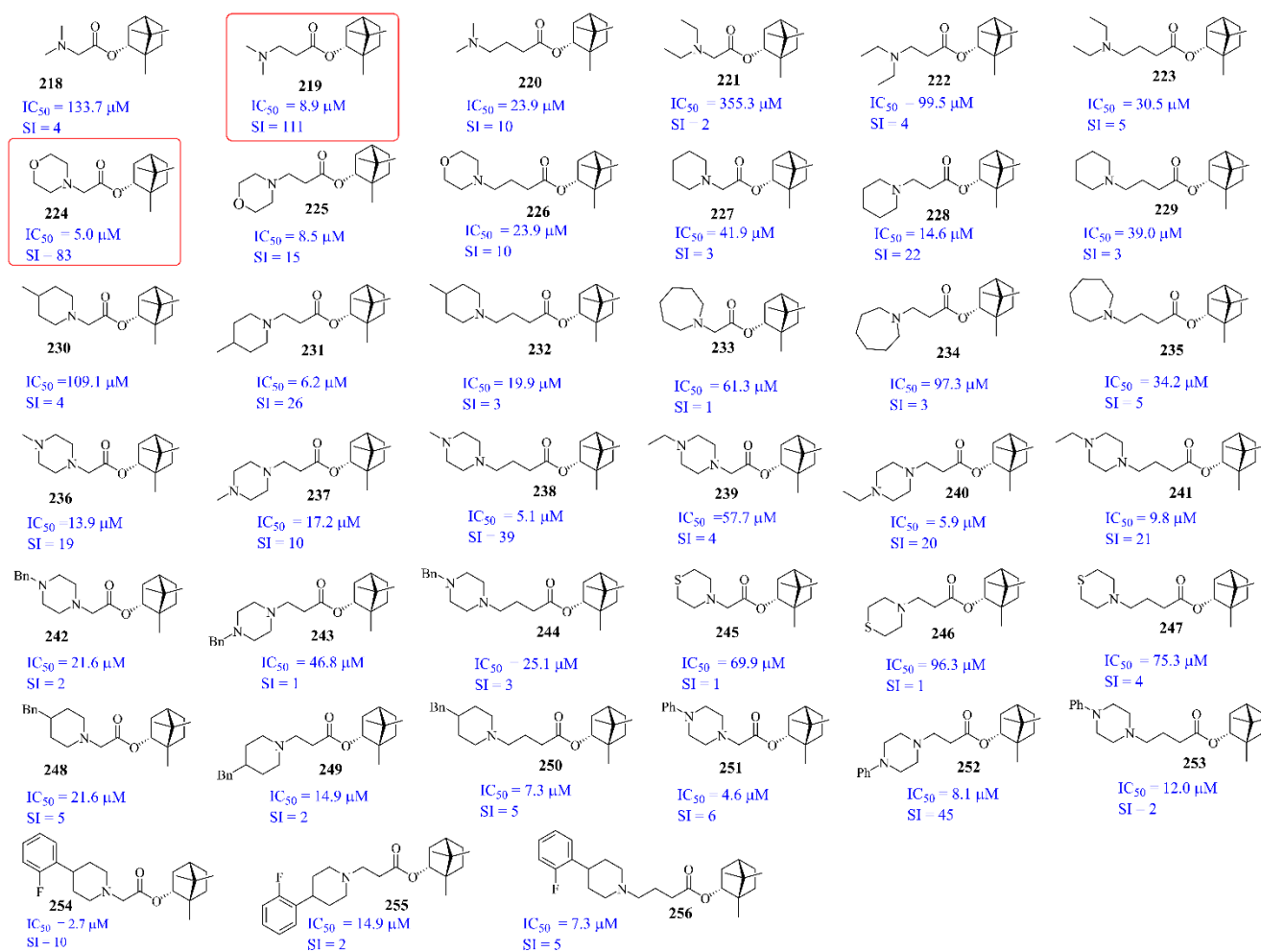
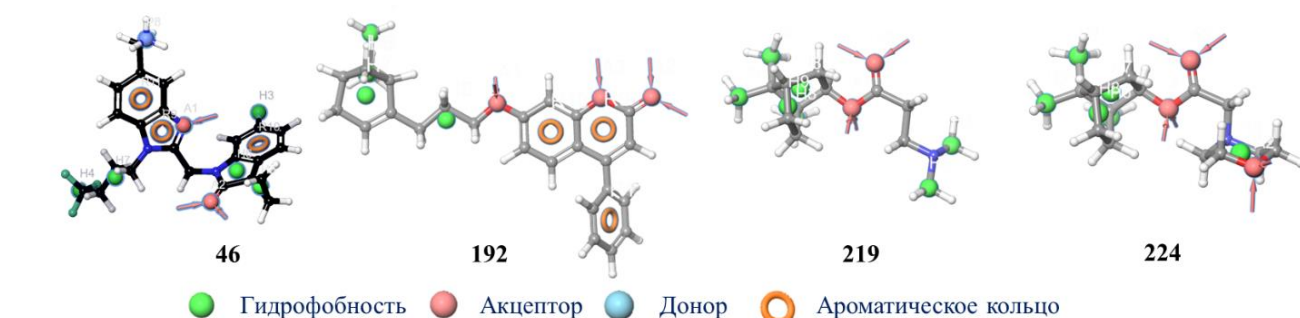


Рисунок 3-76 – *N*-содержащие эфиры (–)-борнеола активные в отношении РСВ типа А.

Индекс селективности двух соединений-лидеров **164** и **224** равен 111 и 83, соответственно. Результаты эксперимента по времени добавления показали, что оба соединения-лидера заметно снижают титр вируса через час после инфицирования, а в более поздние моменты времени теряют свою ингибирующую способность. Анализ температурного сдвига подтверждает, что соединения ингибируют события после связывания вируса с клеткой, а именно на стадии слияния

вирусной и клеточной мембран. Все эти результаты указывают на то, что вероятной биологической мишенью является поверхностный F-белок.

Дескрипторные и фармакофорные признаки соединений-лидеров **219**, **224** заметно отличаются от признаков агента-лидера среди фенилпроизводных кумаринов **192** и референс-соединения **46**. Рассматриваемые лиганды характеризуются меньшим объемом, меньшим количеством атомов и отсутствием ароматических колец (рисунк 3–77). Тем не менее, соединения **219** и **224** содержат гидрофобный камфорный фрагмент, который ожидаемо может образовывать межмолекулярные гидрофобные контакты с гидрофобными аминокислотами полости связывания DS-Cav1.



Кол-во атомов	55	61	46	47
Объем, Å	406	521	243	267
Акцепторы	2	3	2	3
Донор	1	0	0	0
Ароматические кольца	3	3	0	0
Гидрофобные	6	4	7	6

Рисунок 3-77 – Фармакофорные признаки ингибиторов F-белка.

Ряд соединений из линейки эфиров (–)-борнеола (**249–256**), содержащие ароматический фрагмент (бензильный, фенильный или фтор-фенильный), ингибируют репликацию вируса в концентрациях, не превышающих 15 μM (рисунк 3–76). Это еще раз подтверждает необходимость присутствия ароматического фрагмента для высокого сродства лигандов к полости связывания F-белка. К сожалению, соединения **249–256** характеризуются низкими значениями индекса селективности ввиду их высокой цитотоксичности.

Процедура молекулярного гибкого докинга была проведена для соединений **218–256** в описанную полость связывания DS-Cav1. Для ряда соединений была учтена возможность протонирования по атому азота в свободных аминогруппах или в *N*-гетероциклах. Положительно заряженная область в молекуле является дополнительным реакционным центром (донором водородной связи), способным к образованию водородных связей и/или солевых мостиков с подходящими боковыми цепями а.о. Для ряда лигандов были оценены константы кислотности

(таблица 3–30). Вклад протонированных и непротонированных форм молекул при анализе энергетических характеристик молекулярного докинга был учтен на основании уравнения Гендерсона-Хассельбаха [255] (формула 2–3).

Симметричная полость сайта связывания ингибиторов F-белка расположена внутри тримера (рисунок 3–78А), на границе N-конца F₁-субъединицы пептида слияния (а.о. F137, F140, L141) и начала гептадного повтора (а.о. M396, T400, D486, E487, F488). Ингибитор-референс **46** симметрично располагается в сайте связывания таким образом, что гидрофобная часть молекулы находится рядом с пептидом слияния в гидрофобной полости сайта (рисунок 3–78Б). Бензимидазольный фрагмент окружен тремя а.о. F488, а протонированная –NH₃⁺ группа расположена в донорно-акцепторной части сайта. Значение RMSD для процедуры ре-докинга равно 0.04 Å, что свидетельствует о корректности используемого протокола докинга.

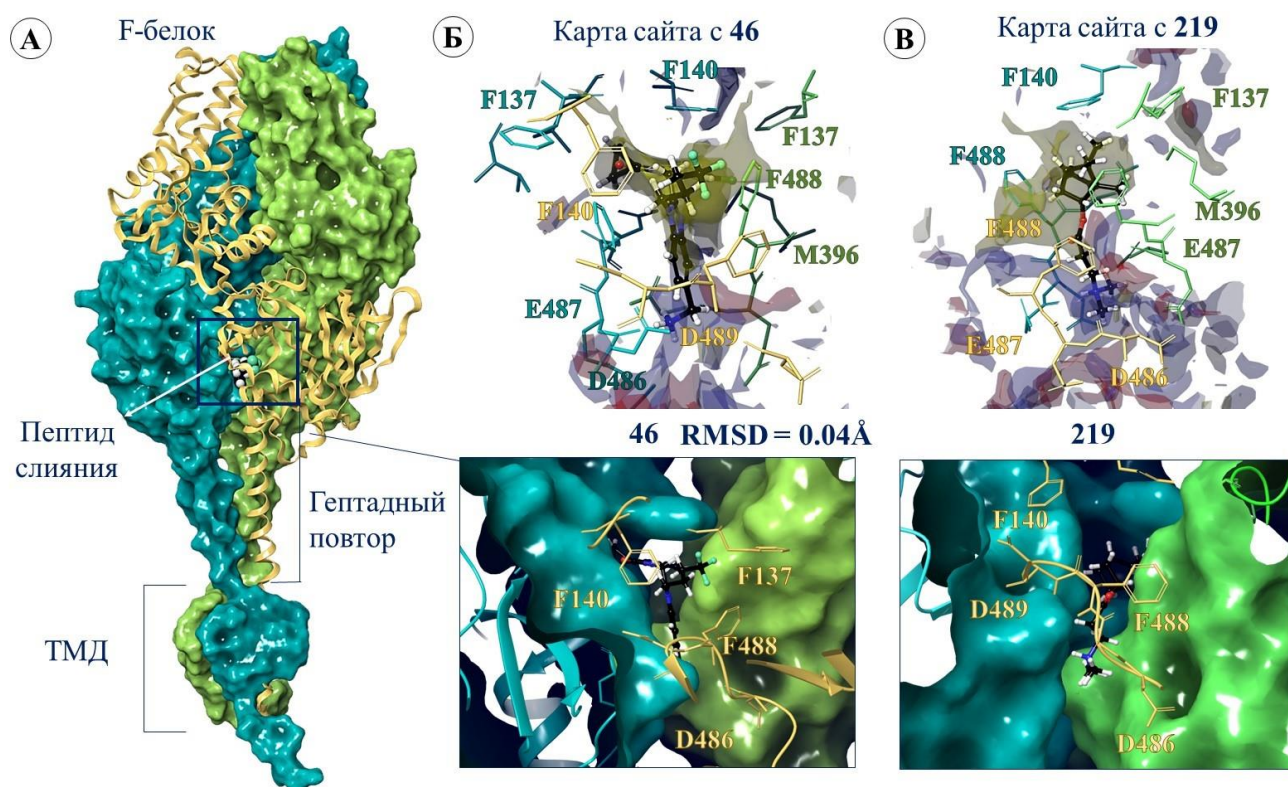


Рисунок 3-78 – Третичная структура F-белка РСВ: А – комплекс F-белка с ингибитором **46** внутри сайта связывания. Ингибитор расположен между петлей слияния (а.о. 137–155) и гептадным повтором (а.о. 476–524). Картирование сайта связывания **46** (Б) и соединения-лидера **219** (В): гидрофобные полости показаны желтым цветом, донорно-акцепторные голубым и красным соответственно.

В качестве максимально возможных позиций исследуемых лигандов в сайте связывания были заданы 10 докинг-решений. Для некоторых лигандов реализовывались менее 10 позиций (таблица 3–30). Для оценки зависимости результатов биологических экспериментов и

теоретических расчетов была выбрана позиция, которая соответствует минимальным значениям энергетических параметров связывания и отсутствием стерического затруднения при расположении лиганда. Аналогично референсу, соединение-лидер **219** располагается гидрофобной частью молекулы в гидрофобной полости сайта рядом с N-концом F₁-субъединицы (рисунок 3–78В). Положительно заряженный заместитель находится в донорно-акцепторной области сайта, рядом с отрицательно заряженными аминокислотами E487 и D486. Гидрофобный норборнанный фрагмент **219** окружен а.о. F488. В отличие от референса, молекула **219** располагается ближе к гептадным повторам. Лиганд **219** меньше по размеру, по этой причине он занимает не все пространство сайта связывания (рисунок 3–78В). Молекула **218** с меньшей длиной линкера и молекула **220** с большей длиной линкера характеризуются схожими взаимодействиями с окружающими а.о., но худшими энергетическими параметрами (таблица 3–30). Это может быть связано с возможностью протонирования аминогруппы соединений **218–220**. Например, расположение в сайте связывания депротонированной формы агента **218** ([B]) характеризуется лишь гидрофобными взаимодействиями с гидрофобными фенилаланинами (рисунок 3–79А), что, вероятнее всего, сказывается на их энергетических параметрах связывания (таблица 3–30). В то же время протонированный агент **218** ([BH⁺]) образует дополнительные симметричные солевые мостики с D486 А и В цепей тримера белка. Значения констант кислотности также находятся в зависимости от длины линкера. Так, значение рКа для **218** равно 7.05, при увеличении длины линкера это значение возрастает до 8.98 единиц (**219**), и при дальнейшем увеличении длины $-(\text{CH}_2)_3-$ уменьшается до 7.91 (**220**). Соотношение депротонированных и протонированных форм лигандов зависит от рН среды. В отличие от гемагглютинаина вируса гриппа, инициирование конформационных перестроек в F-белке не зависит от рН среды [129], а значит, соотношение [B]:[BH⁺] оценивается при рН равном 7.0.

Таблица 3-30 – Результаты процедуры молекулярного докинга

Соединение	pIC ₅₀	Позиции (10 макс)	Docking score, ккал/моль	Водородные связи	Другой тип взаимодействия	pKa
218	3.87	7*	-4.5	отсутствуют	A: F137, F140 – гидрофобные B: F140 – гидрофобные	7.05
		10	-6.5	A: D486	A: F137, 140 – гидрофобные B: F140 – гидрофобные B: D489 – солевой мостик	
219	4.95	10	-7.0	B: D486	A: F137 – гидрофобные B: F140, F488 – гидрофобные B: Glu487 – солевой мостик	8.98
220	4.62	3	-6.3	A: D486	A: Glu487 – солевой мостик B: F137, Met396, F140 – гидрофобные B: F137, F140 – гидрофобные	7.91
221	3.52	5	-6.5	отсутствуют	B: F140 – π-катион стекинг B: F488 – HP, D486 – солевой мостик D: F140 – гидрофобные	7.57
222	4.00	2	-6.2	B: D489	A: F488 – гидрофобные B: D486 – солевой мостик B: F137, F140 – гидрофобные D: F140, F488 – гидрофобные	н/р **
223	4.52	10	-5.8	B: D489	B: F140 – π-катион стекинг B: D489 – солевой мостик B: Met396, F488 – гидрофобные D: F137, F140, F488 – гидрофобные	н/р
224	4.38	4*	-7.0	B: F137, R339	A: F488 – гидрофобные B: F137, F140, F488 – гидрофобные D: F137, F140, F488 – гидрофобные	7.05
		5	-7.5	A: F488, D489	A: L141, F140 – гидрофобные B: D486 – солевой мостик D: F137 – HP, D: D486 – солевой мостик	
225	4.95	8	-7.2	B: D486	A: F137 – гидрофобные B: D486 – SB, F140 – π-катион стекинг D: F137, F140, F488 – гидрофобные	7.91
226	5.24	10*	-7.6	отсутствуют	A: F140 – гидрофобные B: F140, M396 – гидрофобные D: F137, F140, M396 – гидрофобные	6.21
227	4.38	4	-6.7	отсутствуют	A: F140 – π-катион стекинг A: F137 – гидрофобные B: F140 – π-катион стекинг B: F137 – гидрофобные D: F137, F140 – гидрофобные	н/р
228	4.84	5	-7.2	отсутствуют	A: L137 – гидрофобные B: F140 – π-катион стекинг B: L141 – гидрофобные	н/р
229	4.41	9	-6.7	отсутствуют	B: F140 – π-катион стекинг B: D489 – солевой мостик B: F137, Leu138, F488 – гидрофобные D: F137, F140, F488 – гидрофобные	н/р
230	4.01	5	-6.8	A: F488	A: F140 – гидрофобные B: D489 – солевой мостик B: Met396 – гидрофобные D: F140, F488 – гидрофобные	н/р
231	5.21	4	-7.9	отсутствуют	A: D486 – clash A: F137, F140 – гидрофобные B: F140 – π-катион стекинг D: L138, F137, F140, M396, F488 – гидрофобные	н/р
232	4.70	4	-7.4	B: D486	B: D489 – SB B: F137, F140, L141 – гидрофобные D: F137, F140, F488 – гидрофобные	н/р

* Энергетические параметры докинга приведены для протонированной формы

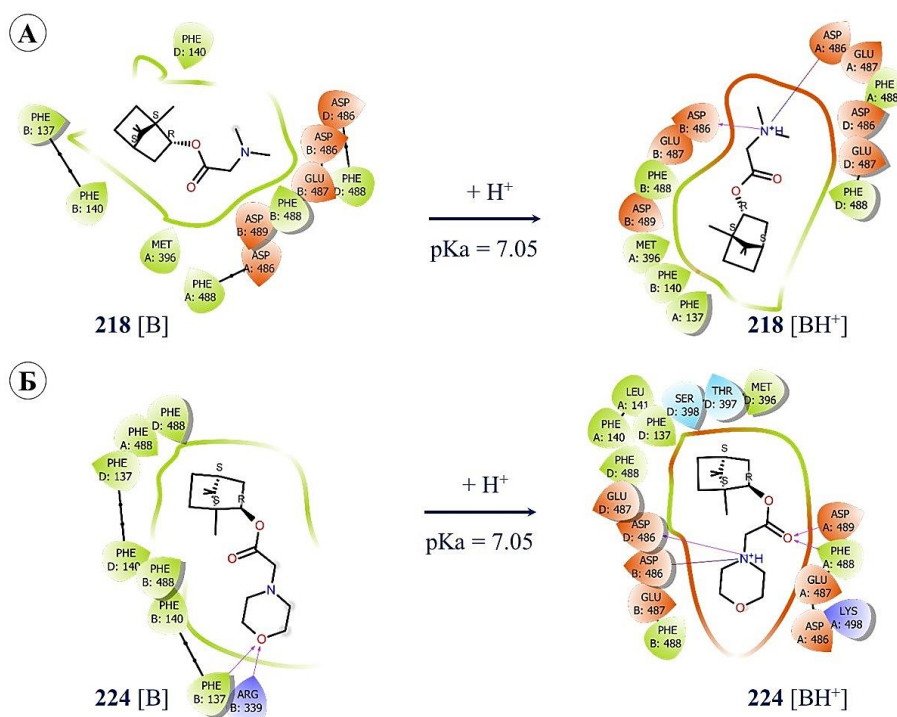
** Значения константы кислотности не рассчитывались.

Таблица 3–26 – Продолжение.

Соединение	pIC ₅₀	Позиции (10 макс)	Docking score, ккал/моль	Водородные связи	Другой тип взаимодействия	pKa
233	4.24	4	-7.8	отсутствуют	A: F488 – π -катион стекинг B: F140 – π -катион стекинг B: F137, F488 – гидрофобные D: F140, F488 – гидрофобные	н/р
234	4.01	10	-6.6	отсутствуют	A: F488 – π -катион стекинг A: F137, F140 – гидрофобные B: F140 – π -катион стекинг B: F137, L141 – гидрофобные D: F137, F140, M396, F488 – гидрофобные	н/р
235	4.48	5	-8.7	отсутствуют	D: L141 – π -катион стекинг D: F137, L138, F140, M396, F488 – гидрофобные	н/р
236	4.86	9	-7.2	B: D486	B: E487 – солевой мостик B: F140 – гидрофобные D: F488 – π -катион стекинг D: F137, F140, M396 – гидрофобные	н/р
237	4.76	10	-7.1	B: D486	B: E487 – солевой мостик D: F137, L138, F140, L141 – гидрофобные	н/р
238	5.23	8	-7.8	отсутствуют	A: F140 – гидрофобные B: D486 – солевой мостик, B: M396 – гидрофобные D: F137, L138, F140, M396 – гидрофобные	н/р
239	4.24	7	-7.1	отсутствуют	B: D486 – SB, F137 – гидрофобные B: F137, F140 – гидрофобные D: F140, F488 – гидрофобные	6.37 9.12
240	5.14	8	-8.1	отсутствуют	B: F140 – π -катион стекинг B: F137, L141 – гидрофобные D: F137, F140, F488 – гидрофобные	7.80 6.91
241	5.01	10	-7.8	B: D486	B: D486, E487 – солевой мостик B: F137, L138, F140, M396 – гидрофобные D: F140, F488 – гидрофобные	8.22 8.74
242	4.67	6	-7.8	A: F488	B: F488 – π-π , F137, F140 – гидрофобные D: F140, F488 – π-π	н/р
243	4.33	9	-7.6	A: F488, D489	B: F488 – π-π A: F140, L141 – гидрофобные B: L138, F140 – гидрофобные D: F137 – гидрофобные	н/п
244	4.67	9	-7.8	B: D486	A: D486 – солевой мостик A: F140 – гидрофобные B: Glu 487 – солевой мостик D: F488 – π-π , F137, F140 – гидрофобные	7.17 8.58
245	4.16	5	-7.1	отсутствуют	A: F488 – π -катион стекинг A: F137, M396 – гидрофобные B: F140 – π -cation, B: D489 – SB B: F137, Leu138, Met396, F488 – гидрофобные D: F140, F488 – гидрофобные	5.98 6.40 7.60
246	4.02	10	-6.6	отсутствуют	B: L138, F140, L141, F488 – гидрофобные D: F140, F488 – гидрофобные	н/р
247	4.12	9	-7.1	отсутствуют	B: D489 – солевой мостик B: L138, F140, L141, F488 – гидрофобные D: F140, F488 – гидрофобные	н/р
248	4.67	8	-7.4	отсутствуют	A: Pro320, Val402 – гидрофобные B: D486 – солевой мостик, F140 – π -катион стекинг D: F140, F488 – гидрофобные	н/р
249	4.83	8	-9.2	A: D489	A: F140, F488 – π-π стекинг , Leu141 – гидрофобные D: F488 – π-π стекинг , D: M396 – гидрофобные	н/р

Таблица 3–26 – Продолжение.

Соединение	pIC ₅₀	Позиции (10 макс)	Docking score, ккал/моль	Водородные связи	Другой тип взаимодействия	pKa
250	5.14	9	-8.4	отсутствуют	A: F488 – π - π стекинг, гидрофобные D: F488 – π - π стекинг, F140, F488 – гидрофобные	н/р
251	5.34	4	-9.7	отсутствуют	A: F488 – π -катион стекинг B: F488 – π -катион стекинг B: F140, L141 - HP D: F140 – π - π стекинг, π -катион стекинг D: F137, L138, F488 – гидрофобные	н/р
252	5.05	7	-9.5	A: F488, D489	A: F140, Leu141 – гидрофобные B: F137, Leu138 – гидрофобные B: F140, F488 – π - π стекинг D: F137, M396, F488 – гидрофобные	н/р
253	4.92	7	-8.7	отсутствуют	A: F140, F488 – гидрофобные B: F488 – π -катион стекинг D: F488 – π -катион стекинг D: F137, L138 – гидрофобные	н/р
254	5.57	4	-9.2	отсутствуют	A: F488 – π - π стекинг, гидрофобные B: F488 – гидрофобные D: F140 – π -катион стекинг D: F137, M396, F488 – гидрофобные	н/р
255	5.09	9	-8.7	A: F488 A: D489	A: F140 – π - π стекинг B: F140 – гидрофобные D: F488 – π - π стекинг, M396 – гидрофобные	н/р
256	4.83	9	-8.9	D: F140	A: F488 – π - π стекинг A: F137, M396, F488 – гидрофобные B: F140 – π - π стекинг B: F137, L138, F140, L141 – гидрофобные	н/р

Рисунок 3-79 – Взаимодействие депротонированных и протонированных форм эфиров **218** (А) и **224** (Б) с аминокислотами сайта связывания ингибиторов F-белка.

Согласно уравнению Гендерсона-Хассельбаха, соотношение депротонированных и протонированных форм соединения **218** составляет 89 к 1. Для агента **219** это соотношение равно 1 к 100, а для эфира **220** – 12 к 1. При выборе оптимального значения докинг-решения соотношение депротонированных и протонированных форм было учтено, и выбор был сделан либо в пользу той формы, содержание которой вероятнее, либо было рассчитано средневзвешенное значение энергетических параметров связывания. Похожая ситуация наблюдается и в группе соединений **224–226**, содержащих морфолиновый фрагмент. Наиболее склонен к протонированию агент **225**, наименее – **226**. Все три соединения характеризуются низкими ингибирующими значениями IC_{50} (рисунок 3–76). Однако, низкая токсичность эфира **224** позволяет рассматривать это соединение в качестве лидирующего среди этой подгруппы соединений. Протонированная форма лиганда **224** склонна к образованию солевых мостиков с аминокислотами D489 от двух протомеров белка (рисунок 3–79Б). Однако, соотношение депротонированных форм к протонированным позволяет сделать вывод, что вклад протонированных форм будет незначительным, тем более что энергетические параметры связывания обеих форм соизмеримы (таблица 3–30).

Ключевыми, или якорными, взаимодействиями расположения **219** в полости связывания DS-Cav1 является водородная связь с D486 и солевой мостик с E487 (рисунок 3–80А). Расположение в сайте связывания **224** характеризуется, прежде всего, образованием гидрофобных взаимодействий: норборнанный фрагмент лиганда окружен фенилаланинами F488 каждого протомера, протонированный атом азота морфолинового фрагмента образует солевые мостики с двумя D486 соседних протомеров (рисунок 3–80Б). Карбонильный кислород образует водородные связи с F488, D489.

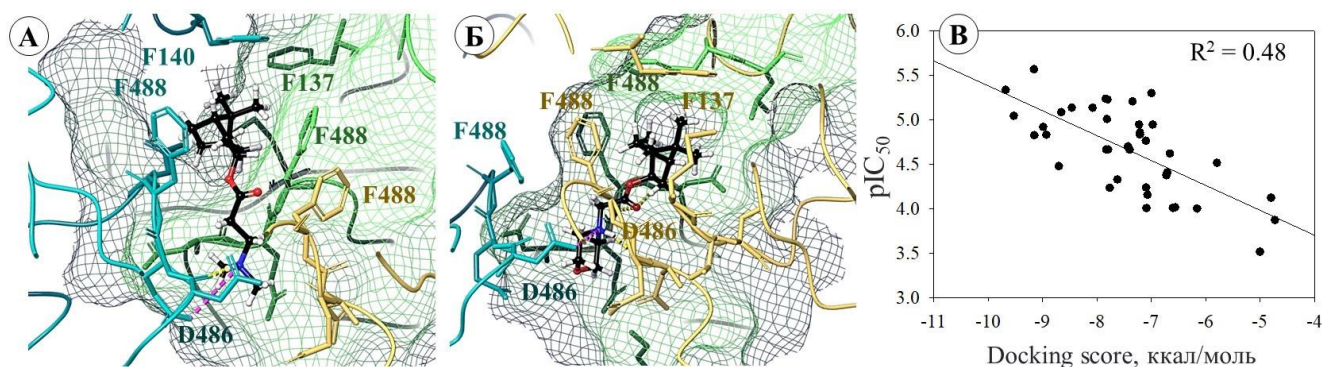


Рисунок 3-80 – Расположение в сайте связывания ингибиторов F-белка А – расположение агента **219**; Б – расположение агента **224**: водородные связи показаны желтыми прерывистыми линиями, солевые мостики – фиолетовыми. В – корреляция между данными биологического эксперимента и результатами расчетов

В целом, большинство исследуемых соединений имеют тенденцию к образованию либо водородных связей, либо солевых мостиков с атомами боковых цепей аминокислотных остатков гептадного повтора (HRB) белка ([таблица 3–30](#)). Солевые мостики образуются между протонированным атомом азота и отрицательно заряженными а.о., чаще всего с атомами аспарагиновой и/или глутаминовой кислот. Наличие в структурах лигандов ароматического фрагмента характеризуется образованием заметного количества π - π стекинг-взаимодействий с фенилаланинами пептида слияния и/или гептадного повтора. Аффинность таких соединений (**249–256**) к сайту связывания более выражена по сравнению с соединениями-лидерами **219** и **224**. Энергетические характеристики связывания (docking score) агентов **249–256** расположены в интервале от -9.7 до -8.4 ккал/моль, в то время как для соединений **219** и **224** этот параметр равен -6.5 и -7.0 ккал/моль, соответственно. Эти выводы коррелируют с результатами биологического эксперимента: **249–256** ингибируют вирус РСВ в концентрациях, не превышающих 15 μ М. Как было уже написано выше, с фармакологической точки зрения эти соединения не могут рассматриваться в качестве перспективных ввиду высокой токсичности, и, как следствие, низкого индекса селективности ([рисунок 3–76](#)). Между энергетическим параметром связывания (docking score) и значениями pIC_{50} присутствует взаимосвязь ([рисунок 3–80В](#)). Соединения, ингибирующие вирусную инфекцию в минимальных концентрациях, в целом характеризуются повышенной аффинностью к сайту связывания. И наоборот: неактивные соединения хуже связываются в сайте связывания.

С целью оценки поведения соединений-лидеров **219** и **224** в полости связывания DS-Cav1 F-белка были проведены молекулярно-динамические симуляции в течение 100 нс. Трансмембранный домен белка в комплексах **219-F** и **224-F** был погружен в мембрану для корректного поведения вторичной структуры белка в течение всего времени расчета. Согласно анализу графику возмущений RMSD, обе системы уравнились к 60 нс симуляции (см. приложение [рисунок 5–10](#)). Лиганды располагаются внутри симметричного сайта связывания. Результат анализа карт заселения свидетельствует о незначительных перемещениях лигандов внутри сайта ([рисунок 3–81А](#)). Наложение геометрических параметров комплексов **219-F** и **224-F**, соответствующих каждому 50-му фрейму симуляции, это также подтверждает ([рисунок 3–81Б](#)). На [рисунке 3–81В](#) изображен анализ положения лигандов в сайте связывания, начиная с 60 нс симуляции, т. е. с момента уравнивания атомно-молекулярной системы. В обоих случаях гидрофобная часть молекул располагается в непосредственной близости к пептиду слияния, рядом с аминокислотой F137 расположен эфир **219**, а рядом с F140 – эфир **224**. Положительно заряженные части молекул образуют водородные связи с отрицательно заряженными а.о. Более 10 нс (из 40 рассматриваемых нс) протонированный атом азота

соединения **219** образует водородную связь с D486 и солевой мостик с E487. Карбонильный кислород эфира **219** формирует опосредованную водой водородную связь с D489 и напрямую связан с F488.

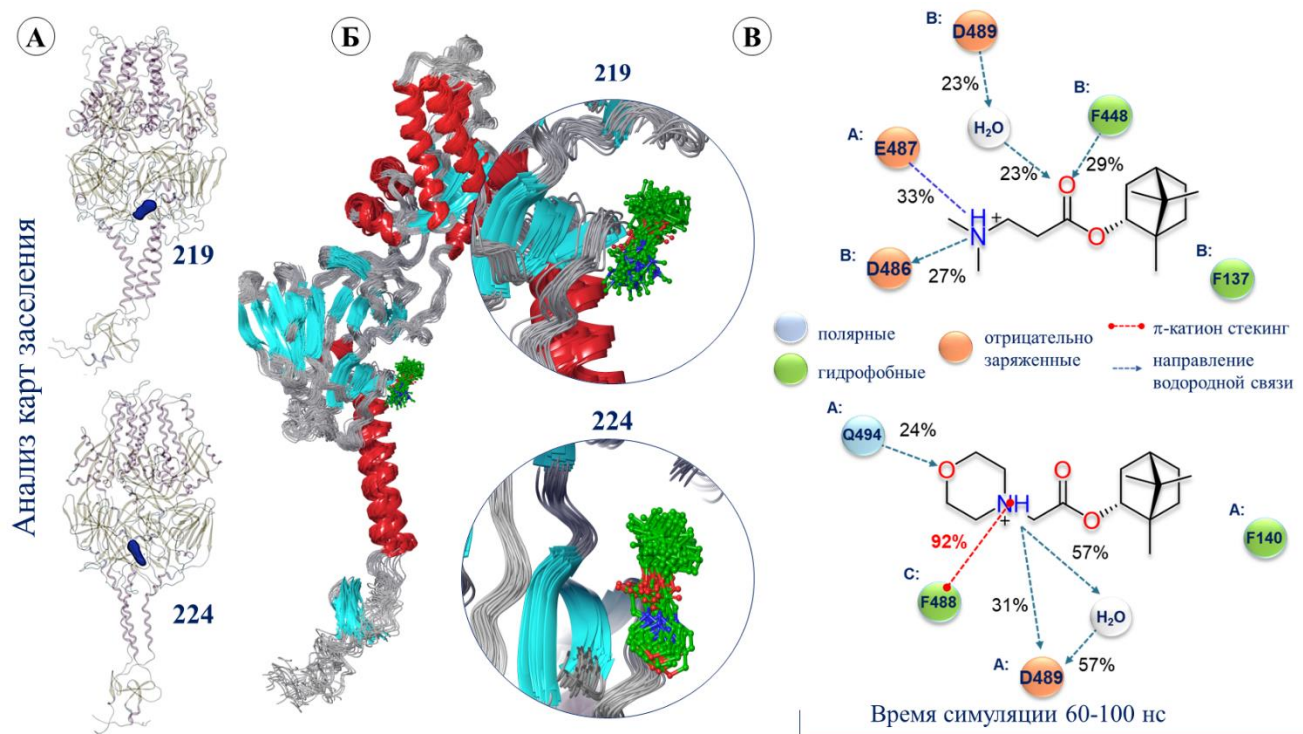


Рисунок 3-81 – Результаты молекулярно-динамических симуляций комплексов **219-F** и **224-F**: А – анализ карт заселения, основанный на средневзвешенной атомной плотности лигандов в сайтах связывания; Б – расположение лигандов в полости DS-Cav1 и продолжительность межмолекулярных контактов между атомами лигандов и боковыми цепями а.о. сайта связывания в течение последних 40 нс симуляции.

Подобные водородные связи с атомами боковых цепей аминокислот D486 и E487 наблюдаются при связывании ингибиторов JNJ-240868 (**41**) и TMC-353121 (**44**), содержащих протонированную аминогруппу и протонированный морфолиновый фрагмент, соответственно [127]. Кроме того в работе [127] упоминается, что механизм ингибирующего действия известных ингибиторов слияния F-белка может быть следствием влияния лигандов на конформацию боковых цепей аминокислот F488, D489 и T400. Как минимум с двумя из указанных а.о. лиганды **219** и **224** образуют межмолекулярные взаимодействия (рисунок 3–81Б).

Результаты молекулярного моделирования позволяют сделать следующие выводы: вероятным местом связывания *N*-содержащих производных эфиров (–)-борнеола является симметричная гидрофобная полость, расположенная внутри тримера F-белка между пептидом слияния и гептадным повтором В; соединения лидеры **219** и **224** образуют прочные межмолекулярные взаимодействия с функциональными аминокислотами, которые сохраняются в течение длительного времени симуляции. При этом, несмотря на существенные структурные

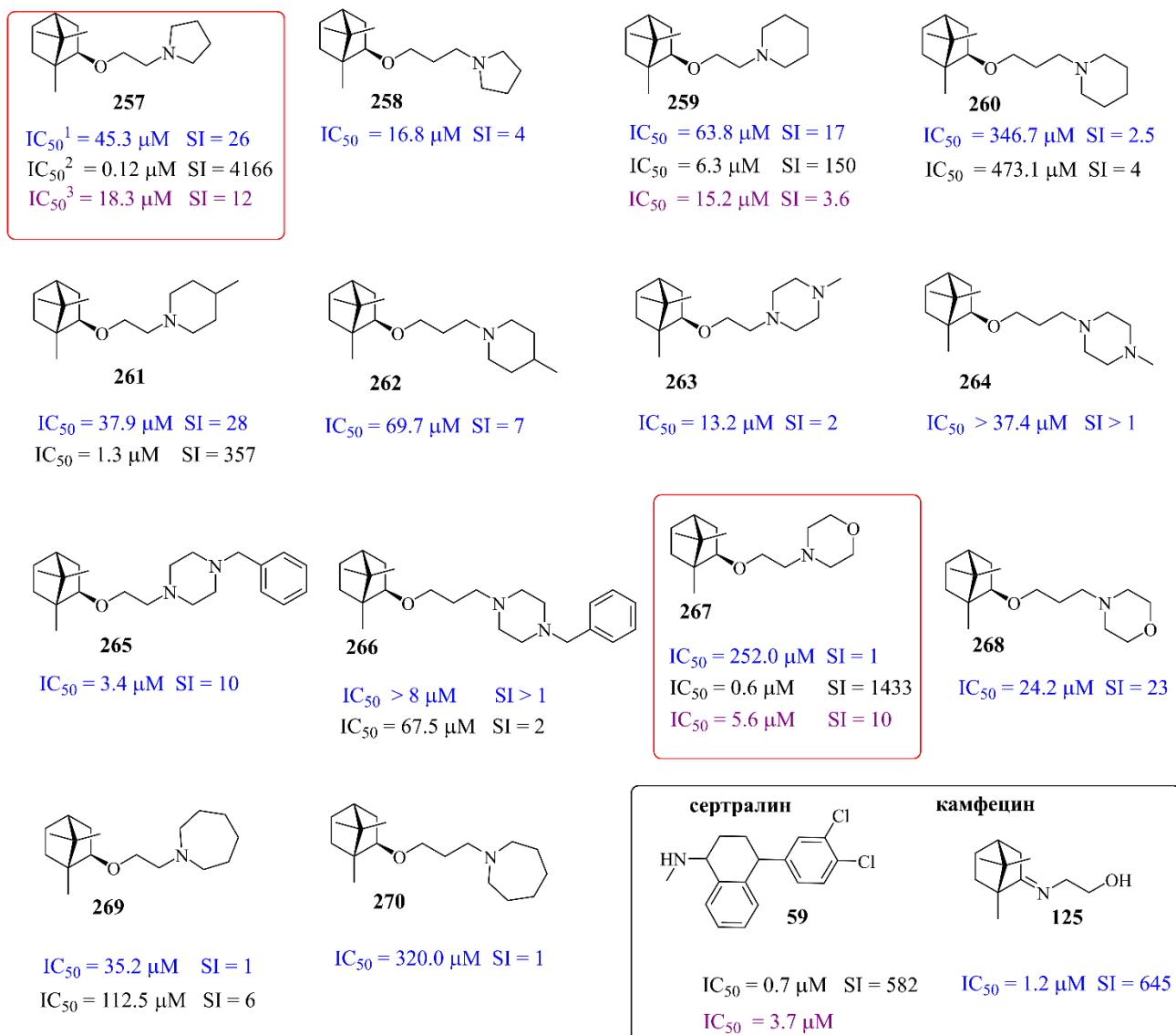
различия исследуемых соединений и известных ингибиторов, при связывании эфиров **219** и **224** регистрируются межмолекулярные взаимодействия (водородные и солевые мостики, π -катионный стекинг) с атомами боковых цепей ключевых а.о. аналогично связыванию известных ингибиторов слияния. Тем не менее, рекомендуется структурная модификация данных соединений, например, внедрение **ароматического** заместителя, способного к образованию π - π стекинг-взаимодействий с боковыми цепями ароматических а.о. Можно обратить внимание на соединение **252**. Среди структур, содержащих ароматический фрагмент, это соединение характеризуется самым высоким значением индекса селективности.

3.4. Ингибирующая активность малых молекул в отношении вируса Эбола [316]

Соединения, синтезированные из монотерпеноидов, таких как (+)-камфора и (–)-борнеол, проявляют противовирусную активность в отношении различных вирусных инфекций, таких как грипп, новая коронавирусная и респираторно-синцитиальная вирусная инфекции. Как было описано выше, ряд производных (+)-камфоры ингибируют гемагглютинин вируса гриппа различных штаммов, производные эфиров (–)-борнеола активны против поверхностного S-белка SARS-CoV-2 патогенных штаммов, и наконец, N-содержащие эфиры (–)-борнеола характеризуются выраженной аффинностью к сайтам связывания ингибиторов F-белка РСВ. В структурах всех этих соединений присутствует общий скаффолд – жесткий норборнанный фрагмент.

В данном разделе будет описана противовирусная активность таких соединений против еще одного патогенного вируса – вируса Эбола.

Производные камфена (**257–270**) проявляют активность против вируса гриппа A/H1N1 (рисунк 3–82). Значения IC_{50} для ряда соединений соизмеримы со значением, описывающим активность камфецина (**125**) против вируса гриппа того же штамма. Здесь камфецин будет рассмотрен в качестве референс-соединения- при сравнении энергетических и структурных параметров связывания исследуемых соединений с сайтами связывания ингибиторов гемагглютенина. Ряд соединений, а именно, **257**, **259–261**, **266**, **267** и **269**, ингибируют псевдовирс (EboV-GP) с гликопротеином вируса Эбола на своей поверхности. При этом значения IC_{50} (EboV-GP), соответствующие агентам **257** и **267**, соизмеримы со значением IC_{50} , характерным для референс-соединения- сертралина (**58**). Индекс селективности (SI) производных камфена выше в 7 раз для соединения **257** и в 2.5 раза для агента **267**, чем значение SI, соответствующее сертралину. Соединения **257**, **259** и **267** ингибируют репликацию инфекционного вируса Эбола штамма Zaire (рисунк 3–82).



¹ A/PR/8/34 (H1N1) ² EboV-glycoprotein (rVSV-ΔG-EboV-GP) ³ EBOV strain Zaire

Рисунок 3-82 – Противовирусная активность производных камфена против вируса гриппа, псевдовируса EboV-GP и инфекционного вируса Эбола.

Производные камфена имеют общий с камфесцином и другими ингибиторами гемагглютиниона вируса гриппа жесткий гидрофобный скаффолд. Это позволяет предположить, что противовирусная активность соединений **257–270** может быть связана с ингибированием поверхностного гликопротеина вируса гриппа. С другой стороны, ряд соединений активны против вируса Эбола, и их механизм противовирусного действия, вероятно, также связан с ингибированием гликопротеина, поверхностного белка вируса Эбола. Как было показано выше, поверхностные белки этих двух вирусов относятся к белкам I типа со схожим механизмом слияния вирусных и клеточных мембран. Учитывая это, можно предположить наличие в гемагглютанине вируса гриппа и в гликопротеине вируса Эбола схожих по фармакофорному профилю полостей, благоприятных для связывания одних и тех же лигандов.

Рассматриваемые производные камфена **257–270** могут протонироваться по атому азота, аналогично камфецину. Методами квантовой химии были оценены константы кислотности ряда соединений. Значения pK_a для всех рассматриваемых лигандов превышает 7.5 (рисунки 3–83).

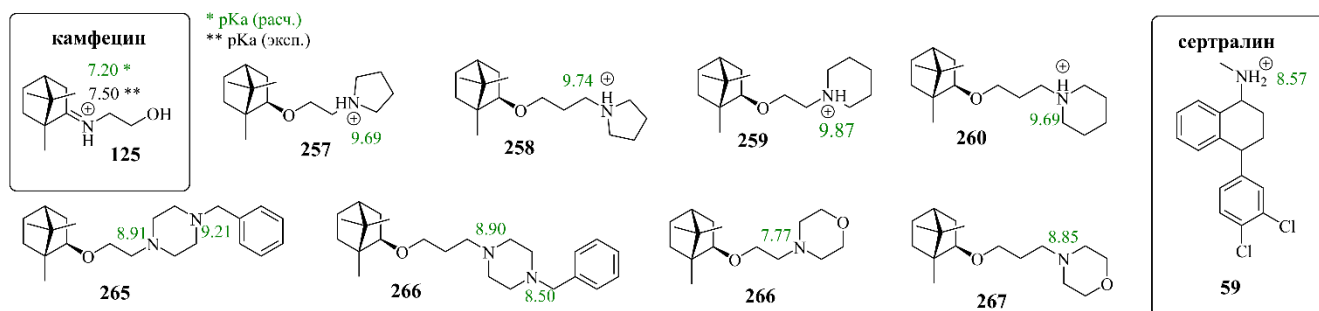


Рисунок 3-83 – Константы кислотности, оцененные методами квантовой химии.

Известно, что конформационные перестройки гликопротеинов вируса гриппа и вируса Эбола, предшествующие слиянию вирусных и клеточных мембран, происходят в кислой среде эндосомы. Учитывая этот факт, энергетические параметры связывания депротонированных форм лигандов рассмотрены не были.

3.4.1. Аффинность производных камфена к сайтам связывания НА вируса гриппа

Результаты оценки противовирусной активности **257–270** в отношении вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1) и наличие схожего с камфецином жесткого гидрофобного скаффолда позволяют предположить, что данные соединения могут подавлять фузогенную активность гемагглютинаина (НА), связываясь в стеблевой части протеина. Молекулярный гибкий докинг соединений **257–270** был проведен в ТБГХ- и К-сайты связывания относительно расположения референс-соединения – камфецина (**125**). Максимальное количество заданных докинг-позиций было 10. Оптимальные докинг-позиции среди 10 решений были выбраны на основании значения среднеквадратичного отклонения положений атомов относительно скаффолда референс-соединения. Энергетические параметры результатов молекулярного докинга представлены в таблице 3–31. Для ряда структур были оценены значения констант кислотности. Учитывая, что фузогенную активность НА проявляет при пониженных значениях pH среды (pH = 5), во внимание были приняты только результаты докинга для протонированных по атому азота молекул.

Согласно данным биологического эксперимента, все исследуемые соединения ингибируют репликацию вируса гриппа в более высоких, чем камфецин, концентрациях. В целом энергетические параметры (docking score, Emodel и IFD), характеризующие аффинность лигандов к ТБГХ- и К-сайтам связывания, коррелируют со значениями pIC_{50} . Соединения с невысокими значениями pIC_{50} характеризуются высокими значениями энергии кластеризации

(Emodel) и энергии лиганд-белкового комплекса (IFD score). При этом анализ расчетных параметров не позволяет сделать выбор в пользу какого-либо сайта связывания. Как было описано в разделе [3.1.3.1.2.](#), камфецин и его аналоги, как и рассмотренные производные камфена (257–270), могут связываться, как минимум, в двух из возможных гидрофобных карманов гемагглютиниона. Связывание лигандов преимущественно происходит за счет гидрофобных взаимодействий жесткого гидрофобного скаффолда с такими а.о., как валин, лейцин и фенилаланин, которыми насыщены оба сайта. Кроме того, для ряда соединений регистрируются водородные связи, солевые мостики и π -катион стекинг-взаимодействия между протонированным атомом азота и окружающими аминокислотами.

Возможно также образование π - π стекинг-взаимодействий между ароматическими кольцами лигандов, в частности **265** и **266**, и тирозина и/или фенилаланина ([таблица 3–31](#)).

Оптимальные докинг-решения, выбранные на основании визуального фильтрации и ранжирования энергетических параметров в совокупности с данными RMSD, были использованы для расчета энергии связывания (ΔG_{bind}) лиганда и белка. Результаты расчета были применены для оценки индекса корреляции ([рисунок 3–84](#)) между экспериментальными (pIC_{50}) и теоретическими данными (ΔG_{bind}).

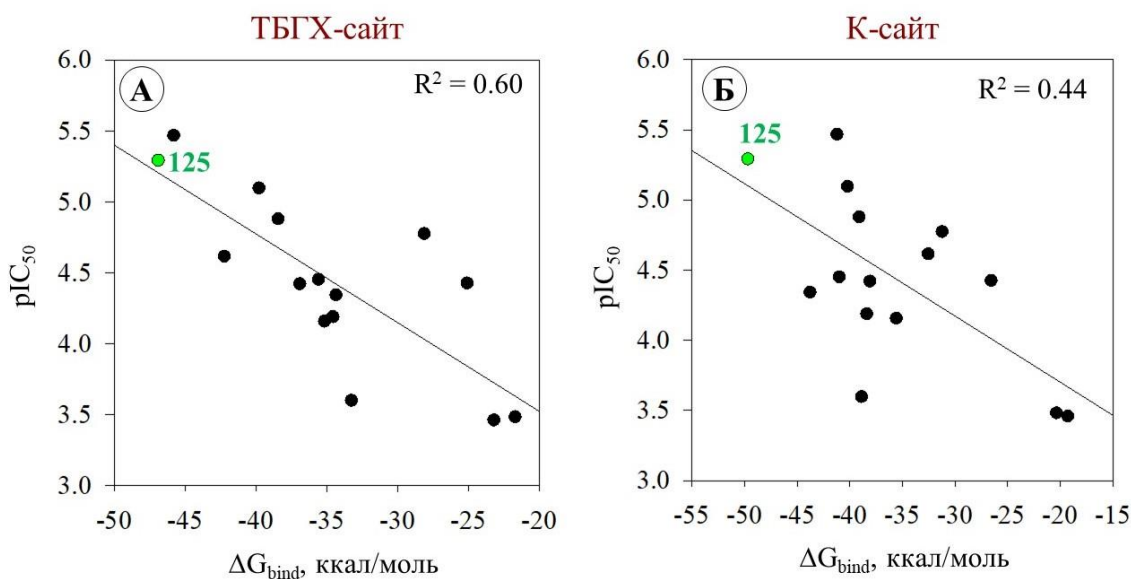


Рисунок 3-84 – Корреляция экспериментальных значений pIC_{50} и энергии связывания производных камфена (257–270) в ТБГХ (А) и К-сайты (Б) НА вируса гриппа.

Таблица 3-31 – Результаты процедуры молекулярного докинга лигандов **125–270** в сайты связывания ингибиторов НА

Соединение	pIC ₅₀ (A/PR/8/34 (H1N1))	pKa	RMSD	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD, ккал/моль	ΔG _{bind} , ккал/моль	Взаимодействия с а.о.	
								Водородные связи	Другие взаимодействия
ТБГХ-сайт									
125 (камфецин)	5.29	7.20	0.213	-7.00	-43.32	-1434.73	-46.8	E ₂₅₉₇	V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ – гидрофобные
257	4.34	9.69	0.386	-6.84	-41.48	-1428.42	-34.4	отсутствуют	V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ – гидрофобные
258	4.77	9.74	0.426	-7.04	-48.54	-1427.54	-28.1	отсутствуют	V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ – гидрофобные
259	4.19	9.87	0.409	-6.98	-52.22	-1427.96	-34.6	Y ₂₅₉₄	V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ , M ₂₅₅₉ – гидрофобные
260	3.46	9.69	0.451	-6.37	-38.14	-1426.73	-23.2	отсутствуют	V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ , L ₂₅₉₈ – гидрофобные
261	4.42	н/р	0.398	-7.30	-50.62	-1432.37	-36.9	отсутствуют	Y ₂₅₉₄ – π-катион, V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ , L ₂₅₉₈ – гидрофобные
262	4.16	н/р	0.353	-7.11	-49.64	-1431.63	-35.2	отсутствуют	V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ , M ₂₅₅₉ – гидрофобные
263	4.88	н/р	0.737	-6.86	-50.44	-1429.05	-38.4	отсутствуют	E ₂₅₉₇ – солевой мостик, V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ , M ₂₅₅₉ – гидрофобные L ₂₅₅₈ – clash
264	4.43	н/р	0.371	-6.27	-55.43	-1432.35	-25.1	E ₂₅₉₇	E ₂₅₉₇ – солевой мостик, V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ , M ₂₅₅₉ – гидрофобные
265	5.47	8.91 9.21	0.401	-7.85	-51.64	-1432.39	-45.8	отсутствуют	Y ₂₅₉₄ – π-π стекинг V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ , M ₂₅₅₉ – гидрофобные
266	5.10	8.90 8.50	0.403	-7.50	-54.19	-1431.39	-39.8	отсутствуют	Y ₂₅₉₄ – π-катион, V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ , L ₂₅₉₈ – гидрофобные
267	3.60	7.71	0.381	-5.98	-39.74	-1428.37	-33.3	Y ₂₅₉₄	Y ₂₅₉₄ – π-катион, V ₁₂₃ , L ₁₆₀₁ , L ₂₆₀₂ , V ₂₅₅₅ , L ₂₅₉₈ – гидрофобные

Таблица 3–31 – Продолжение

Соединение	pIC ₅₀ (A/PR/8/34 (H1N1))	pKa	RMSD	Docking score, ккал/моль	E _{model}	IFD, ккал/моль	ΔG_{bind} , ккал/моль	Взаимодействия с а.о.	
								Водородные связи	Другие взаимодействия
268	4.62	8.85	0.363	-7.76	-48.13	-1433.64	-42.2	отсутствуют	L ₂ 558 – солевой мостик V ₁ 23, L ₁ 601, L ₂ 602, V ₂ 555, L ₂ 598 – гидрофобные V ₂ 555 – clash
269	4.45	н/р	0.364	-8.12	-46.76	-1429.40	-35.6	отсутствуют	V ₁ 23, L ₁ 601, L ₂ 602, V ₂ 555, L ₂ 598 – гидрофобные
270	3.48	н/р	0.369	-6.93	-43.20	-1430.42	-21.7	L ₂ 558	V ₁ 23, L ₁ 601, L ₂ 602, V ₂ 555, L ₂ 598, M ₂ 559 – гидрофобные

К-сайт

125 (камфецин)	5.29	7.20	0.262	-6.99	-71.47	-1067.52	-49.7	G ₁ 10, V ₂ 615	Y ₂ 619 – π-катион I ₁ 9, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
257	4.34	9.69	0.386	-7.07	-52.99	-1063.59	-31.2	отсутствуют	Y ₂ 524 – π-катион E ₂ 632 – солевой мостик I ₁ 9, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
258	4.77	9.74	0.368	-7.50	-44.54	-1063.78	-38.4	отсутствуют	I ₁ 9, Y ₁ 11, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
259	4.19	9.87	0.363	-7.51	-53.66	-1063.81	-19.3	отсутствуют	Y ₂ 524 – π-катион F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
260	3.46	9.69	0.236	-7.09	-46.14	-1063.92	-38.1	отсутствуют	I ₁ 9, Y ₁ 11, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
261	4.42	н/р	0.412	-7.09	-56.43	-1064.03	-35.6	E ₂ 633	E ₂ 632 – солевой мостик I ₁ 9, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные

Таблица 3–31 – Продолжение

Соединение	pIC ₅₀ (A/PR/8/34 (H1N1))	pKa	RMSD	Docking score, ккал/моль	E _{model}	IFD, ккал/моль	ΔG _{bind} , ккал/моль	Взаимодействия с а.о.	
								Водородные связи	Другие взаимодействия
262	4.16	н/р	0.526	-6.07	-57.55	-1063.12	-39.1	E ₂ 633	E ₂ 632 – солевой мостик I ₁ 9, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
263	4.43	н/р	0.561	-6.03	-51.85	-1062.76	-26.6	E ₂ 632	I ₁ 9, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
264	4.88	н/р	0.507	-6.34	-57.21	-1062.94	-41.2	отсутствуют	V ₂ 619 – солевой мостик I ₁ 9, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
265	5.47	8.91 9.21	0.565	-8.00	-66.98	-1067.39	-40.2	E ₂ 632	F ₂ 509, Y ₂ 619 – π-катион F ₂ 509 – π-π стекинг I ₁ 9, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
266	5.10	8.90 8.50	0.665	-8.01	-63.25	-1065.50	-38.9	отсутствуют	F ₂ 509 – π-катион стекинг I ₁ 9, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
267	3.60	7.71	0.376	-7.30	-49.23	-1063.60	-33.5	отсутствуют	Y ₂ 524 – π-катион стекинг I ₁ 9, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
268	4.62	8.85	0.369	-7.55	-59.00	-1065.21	-32.6	E ₂ 632	I ₁ 9, F ₂ 509, I ₂ 510, Y ₂ 522, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
269	4.45	н/р	0.562	-7.79	-50.49	-1062.64	-41.0	I ₁ 9	I ₁ 9, F ₂ 509, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные
270	3.48	н/р	0.371	-5.88	-41.09	-1061.60	-20.4	E ₂ 632	E ₂ 632 – солевой мостик I ₁ 9, F ₂ 509, L ₂ 618, V ₂ 619 – гидрофобные

н/р – не рассчитывали

Индекс корреляции значений (pIC_{50}), характеризующих активность производных камфена в отношении вируса гриппа, и энергий связывания лигандов в ТБГХ-сайте выше, чем индекс корреляции, отражающий взаимосвязь pIC_{50} и значений энергий связывания в К-сайте. Анализ результатов молекулярного моделирования позволяет сделать вывод, что исследуемые соединения **257–270** могут связываться в обоих сайтах связывания, расположенных в стеблевой части гемагглютинаина. Характер связывания преимущественно гидрофобный. Предположительно, механизм противовирусной активности рассмотренных производных камфена связан с **подавлением** фузогенной активности гемагглютинаина.

3.4.2. Аффинность производных камфена к сайту связывания ингибиторов GP вируса Эбола

Сайт связывания ингибиторов гликопротеина вируса Эбола хорошо описан с точки зрения фармакофорных признаков в разделе [1.2.4.2](#). Полость связывания представляет собой гидрофобный карман, насыщенный гидрофобными а.о., такими как валин, лейцин, изолейцин и тирозин. Референс-соединение- сертралин (**59**) располагается в сайте связывания, образуя π -катионное стекинг-взаимодействие с Y₅₁₇ за счет протонированного атома азота ([рисунок 3–85А](#)).

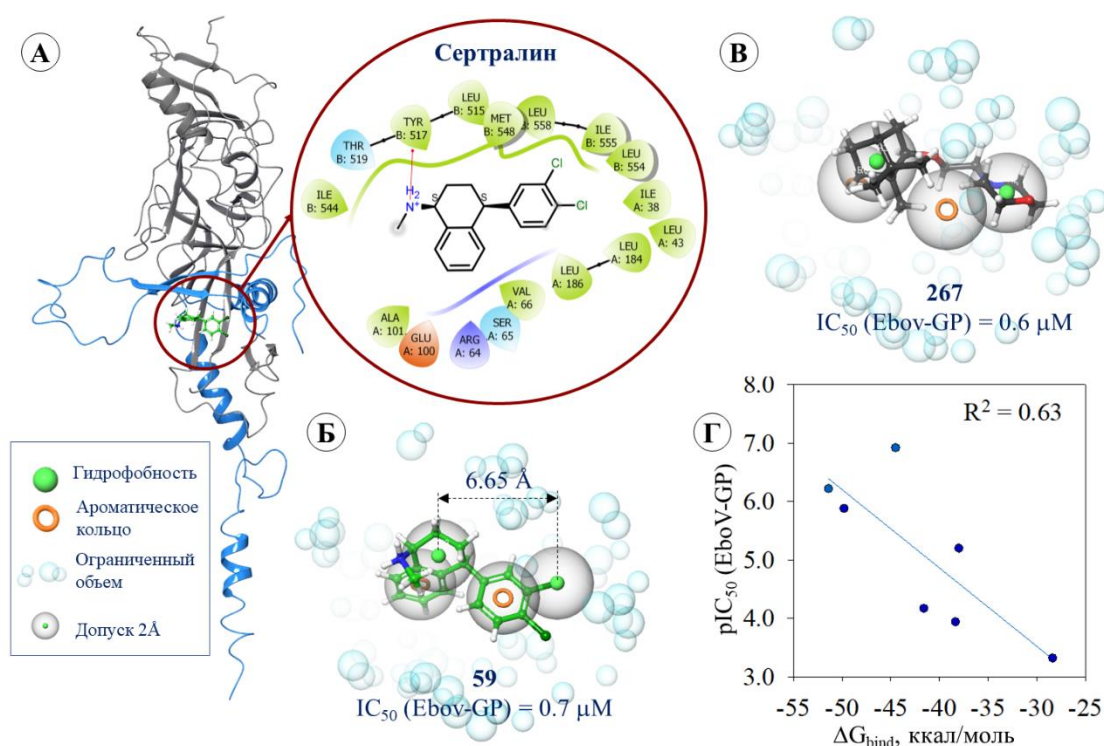


Рисунок 3-85 – Молекулярное моделирование гликопротеина вируса Эбола: А – расположение референс-соединения- сертралина (**59**) в гидрофобной полости связывания. Б – фармакофорный профиль расположения лиганда **59** в сайте связывания. В – соответствие фармакофорных признаков агента **267** фармакофорному профилю сайта. Г – взаимосвязь результатов

ингибирующей активности производных камфена (pIC_{50} (EboV-GP)) и энергии связывания (ΔG_{bind}).

Исследуемые лиганды также подвержены протонированию. Этот вопрос уже обсуждался в начале данной главы. Ароматическое кольцо, содержащее атомы хлора, окружено гидрофобными лейцином, метионином, изолейцином и валином. Фармакофорный профиль лиганд-белкового комплекса сертралин-гликопротеин (**59-GP**) содержит два гидрофобных признака, расположенных на расстоянии 6.65 Å ([рисунок 3–85Б](#)) и два ароматических кольца. Ряд производных камфена (**257**, **261**, **267** и **269**) с минимальной длиной линкера соответствуют фармакофорному профилю сайта связывания по расположению гидрофобных фрагментов лигандов. На [рисунке 3–85В](#) показано расположение соединения-лидера **267** в сайте связывания. Гидрофобные части молекулы **267** соответствуют гидрофобным признакам сайта и также расположены на расстоянии 6.65 Å.

Процедура молекулярного докинга была проведена в сайт связывания сертралина. На расположение лигандов были наложены позиционные ограничения относительно референс-соединения-. Оптимальные докинг-решения были выбраны на основании визуального фильтрации и совокупного анализа энергетических параметров аффинности производных камфена **257–269** и значений RMSD. Для соединений, ингибирующих псевдовирус с гликопротеином вируса Эбола, были рассчитаны энергии связывания с целью оценки взаимосвязи экспериментальных и теоретических данных ([рисунок 3–85Г](#)). Результаты представлены в [таблице 3–32](#). Анализ теоретических исследований позволяет сделать вывод, что рассматриваемые соединения могут связываться в сайте связывания ингибиторов GP вируса Эбола. Тем не менее, их аффинность к месту связывания сертралина менее выраженная. Энергетические параметры связывания (docking score, Emodel и IFD score) производных камфена **257–270** заметно выше значений, характеризующих аффинность сертралина. Энергия связывания (ΔG_{bind}) ингибитора **58** ниже значений (ΔG_{bind}), описывающих связывание агентов **257** и **267** на 17.5 и 10.6 ккал/моль, соответственно. Тем не менее, взаимосвязь результатов биологических экспериментов и теоретических расчетов присутствует. Аффинность соединений, которые проявляют выраженную активность в отношении псевдовирусной системы (EboV-GP), более выражена, чем у неактивных производных камфена ([таблица 3–32](#)). Индекс корреляции значений pIC_{50} (EboV-GP) и энергий связывания (ΔG_{bind}) равен 0.63 ([рисунок 3–85Г](#)).

Связывание соединений **257–270** носит преимущественно гидрофобный характер. Протонированные атомы азота могут образовывать водородные связи и/или солевые мостики с окружающими а.о. сайта связывания. Для ряда соединений также регистрируются π -катионные

стекинг-взаимодействия с тирозином в положении 517, аналогично расположению сертралина (таблица 3–32).

Совокупный анализ результатов молекулярного моделирования и биологических экспериментов позволяет предположить, что производные камфена проявляют противовирусную активность в отношении инфекционного вируса Эбола за счет ингибирования поверхностного гликопротеина. Активные соединения **257** и **267** связываются в гидрофобном кармане белка, так что жесткий норборнанный фрагмент взаимодействует с набором гидрофобных а.о. первой субъединицы гликопротеина GP₁ (V₁₆₆, L₁₆₈, A₁₁₀₁, L₁₁₈₄, L₁₁₈₆) и второй, GP₂ (L₂₅₁₅, M₂₅₄₈, L₂₅₅₈). Агент **257** дополнительно формирует π -катионное стекинг-взаимодействие между протонированным атомом азота и ароматическим кольцом Y₂₅₁₇. Можно предположить, что связывание лигандов приводит к **стабилизации** префузионной конформации белка, препятствуя тем самым слиянию вирусных и клеточных мембран.

3.4.3. Картирование сайтов связывания ингибиторов поверхностных гликопротеинов вируса гриппа и вируса Эбола

Поверхностные белки вируса гриппа и вируса Эбола имеют общий механизм проникновения в клетку-хозяина, связанный со слиянием вирусной и клеточной мембран. Наличие схожих гептадных повторов в стеблевой части гемагглютиниана (НА) и гликопротеина (GP) предполагает общий механизм ингибирования малыми молекулами конформационных перегруппировок из префузионной в постфузионную конфигурацию протеинов. Структурные особенности обоих поверхностных белков позволяют идентифицировать сайты связывания со схожим фармакоформным профилем. Связывание ингибиторов НА и GP характеризуется прежде всего гидрофобными взаимодействиями между атомами лигандов и аминокислотами сайта связывания. Все это позволяет предположить, что соединения, проявляющие аффинность к сайтам связывания НА, могут **связываться** и в сайте связывания GP.

Результаты молекулярного докинга производных камфена (**257–270**) в сайты связывания ТБГХ в гемагглютанине вируса гриппа и сертралина в гликопротеине вируса Эбола были использованы для процедуры выравнивания аминокислотных остатков в радиусе 5 Å от лигандов. С помощью программного алгоритма была выполнена попарная суперпозиция нескольких структур с последующим определением схожих полостей по фармакоформным параметрам а.о. В результате была определена полость в стеблевой части гемагглютиниана со схожим фармакоформным профилем сайта связывания ингибиторов GP. Полость расположена между двумя короткой и длинной α -спиралями гептадного повтора гемагглютиниана.

Таблица 3-32 – Результаты молекулярного докинга **257–270** в сайт связывания ингибиторов GP вируса Эбола.

Соединение	pIC ₅₀ (EboV-GP)	pIC ₅₀ (EBOV)	pKa	RMSD	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD, ккал/моль	ΔG_{bind} , ккал/моль	Взаимодействия с а.о.	
									Водородные связи	Другие взаимодействия
257	6.92	4.73	9.69	0.500	-7.30	-42.76	-796.15	-44.5	отсутствуют	Y ₂₅₁₇ – π -катион стекинг L ₁₅₈ , V ₁₆₆ , L ₁₈₄ , L ₁₈₆ , L ₂₅₁₅ , L ₂₅₅₄ , I ₂₅₅₅ , L ₂₅₅₈ – гидрофобные
258	н/а	н/а	9.74	0.412	-3.95	-35.11	-793.56	н/р	отсутствуют	V ₁₆₆ , L ₁₈₆ ; L ₂₅₁₅ , Y ₂₅₁₇ , M ₂₅₄₈ – гидрофобные
259	5.20	4.81	9.87	0.563	-6.37	-43.22	-794.96	-38.0	T ₂₅₁₉	V ₁₆₆ , L ₁₈₄ , L ₁₈₆ , L ₂₅₁₅ , Y ₂₅₁₇ , L ₂₅₅₈ , M ₂₅₄₈ – гидрофобные
260	3.32	н/т	9.69	0.615	-5.31	-29.03	-794.66	-28.4	отсутствуют	Y ₂₅₁₇ – π -катион стекинг V ₁₆₆ , L ₁₈₄ , L ₁₈₆ , L ₂₅₁₅ , L ₂₅₅₄ , I ₂₅₅₅ , L ₂₅₅₈ – гидрофобные
261	5.88	н/а	н/р	0.745	-6.19	-34.40	-795.43	-49.8	отсутствуют	V ₁₆₆ , L ₁₆₈ , A ₁₀₁ , L ₂₅₁₅ , Y ₂₅₁₇ , W ₂₅₁₈ , L ₂₅₅₈ – гидрофобные
262	н/а	н/т	н/р	0.501	-4.41	-31.49	-794.10	н/р	отсутствуют	Y ₂₅₁₇ – π -катион стекинг V ₁₆₆ , L ₁₈₄ , L ₂₅₁₅ , L ₂₅₅₄ , I ₂₅₅₅ , L ₂₅₅₈ – гидрофобные
263	н/а	н/т	н/р	0.543	-4.81	-29.81	-797.00	н/р	отсутствует	Y ₂₅₁₇ – π -катион стекинг L ₁₈₄ , L ₁₈₆ L ₂₅₁₅ , L ₂₅₅₄ , I ₂₅₅₅ , L ₂₅₅₈ – гидрофобные
264	н/а	н/т	н/р	0.522	-4.51	-36.06	-795.73	н/р	отсутствует	Y ₂₅₁₇ – π -катион стекинг V ₁₆₆ , A ₁₀₁ , L ₁₈₄ , L ₁₈₆ , L ₂₅₁₅ , L ₂₅₅₄ , I ₂₅₅₅ , L ₂₅₅₈ – гидрофобные
265	н/а	н/т	8.91 9.21	0.436	-2.01	-31.21	-792.95	н/р	Y ₂₅₁₇	Y ₂₅₁₇ – π -катион стекинг L ₁₈₄ , L ₁₈₆ , L ₂₅₁₅ , M ₂₅₄₈ , L ₂₅₅₄ , I ₂₅₅₅ , L ₂₅₅₈ – гидрофобные

Таблица 3–32 – Продолжение.

Соединение	pIC ₅₀ (EboV-GP)	pIC ₅₀ (EBOV)	pKa	RMSD	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD, ккал/моль	ΔG_{bind} , ккал/моль	Взаимодействия с а.о.	
									Водородные связи	Другие взаимодействия
266	4.17	н/т	8.90 8.50	0.434	-4.56	-28.97	-791.44	-41.6	L ₂ 547	V ₁ 66, L ₁ 184, L ₁ 186 – гидрофобные L ₂ 547 – clash Y ₂ 517, L ₂ 515, L ₂ 554, I ₂ 555, L ₂ 558 – гидрофобные
267	6.22	4.17	7.77	0.521	-5.24	-34.41	-794.62	-51.4	отсутствует	V ₁ 66, A ₁ 101, L ₁ 184, L ₁ 186, Y ₂ 517, L ₂ 515, L ₂ 554, I ₂ 555, L ₂ 558 – гидрофобные
268	н/а	н/т	8.85	0.774	-5.14	-30.89	-792.54	н/р	отсутствует	Y ₂ 517 – clash Y ₂ 517, L ₂ 515, L ₂ 554, I ₂ 555, L ₂ 558 – гидрофобные
269	3.94	н/т	н/р	0.619	-5.06	-27.39	-793.49	-38.4	отсутствует	Y ₂ 517 – clash Y ₂ 517, L ₂ 515, L ₂ 554, I ₂ 555, L ₂ 558 – гидрофобные
270	н/а	н/т	н/р	0.575	-4.36	-24.69	-794.28	н/р	отсутствует	Y ₂ 517 – π -катион стекинг L ₂ 515, L ₂ 554, I ₂ 555, L ₂ 558 – гидрофобные
58 (сертралин)	6.15	3.43	8.57	0.391	-8.80	-51.92	-802.67	-62.10	отсутствует	Y ₂ 517 – π -катион стекинг L ₁ 184, L ₁ 186, L ₂ 515, L ₂ 554, I ₂ 555, L ₂ 558 – гидрофобные

н/а – соединение не показало активности в тестах *in vitro*

н/т – соединение не тестировали

н/р – не рассчитывали

Фактически это описанные ранее места связывания производного пинанамина (25) и ТБГХ (7), или M090-сайт [74] и ТБГХ-сайт [28]. К-сайт, расположенный в области протеолиза НА, по своим размерам не соответствует сайту связывания ингибиторов гликопротеина вируса Эбола. Гидрофобные полости в НА и GP насыщены гидрофобными а.о., такими как валин, лейцин и изолейцин. В обеих полостях присутствуют схожие фармакофорные признаки, а именно, ароматические кольца, донор и акцептор водородных связей (рисунок 3–86).

Именно насыщенность гидрофобными аминокислотами в сайтах связывания обоих поверхностных белков увеличивает вероятность связывания соединений, содержащих объемный гидрофобный норборнанный фрагмент. Донорно-акцепторная составляющая сайтов благоприятствует образованию водородных связей и солевых мостиков, что наблюдается при связывании производных камфена 257–270 в ТБГХ-сайте гемагглютинаина (таблица 3–31) и в месте расположения сертралина (таблица 3–32) в гликопротеине GP.

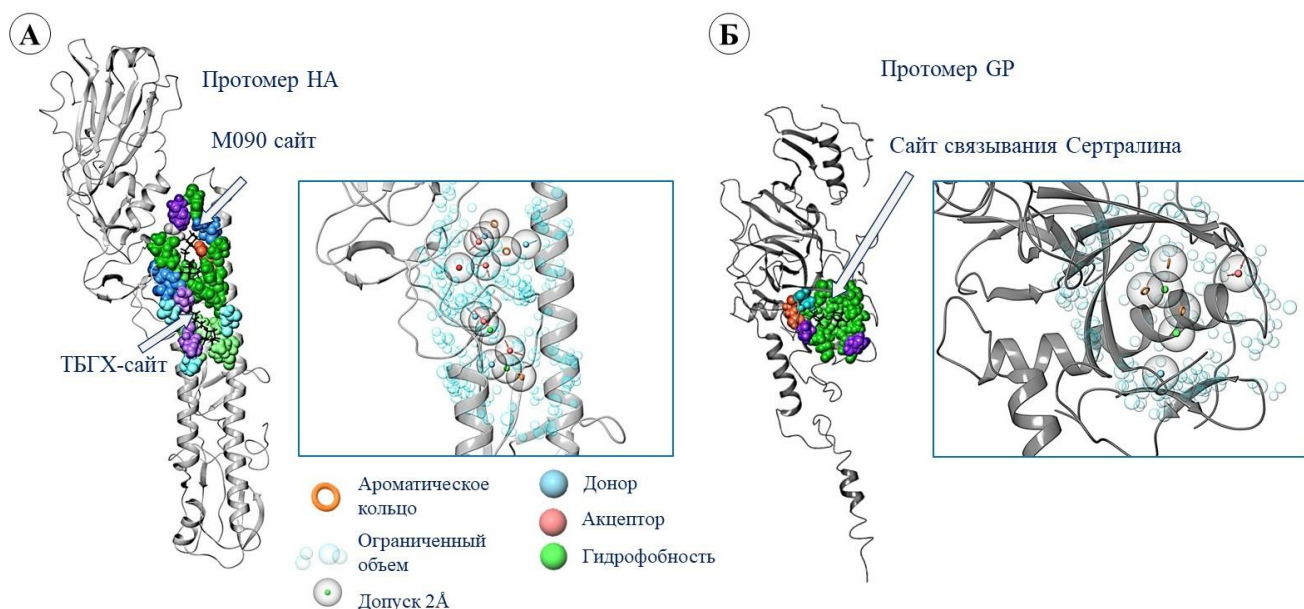


Рисунок 3-86 – Картирование сайтов связывания в поверхностных белках вируса гриппа и вируса Эбола: А – фармакофорный профиль сайта связывания в стеблевой части НА. Б – фармакофорный профиль сайта связывания в GP.

Соединения 257 и 267 комплементарны к сайтам связывания в обоих поверхностных белках преимущественно по гидрофобным признакам (рисунок 3–87). Соединение 257 ингибирует НА в меньших концентрациях, чем 267, и характеризуется более низкими энергиями связывания. С другой стороны, 267 проявляет активность в меньших концентрациях по отношению к псевдовirusу EboV-GP и характеризуется более низкой энергией связывания, чем 257.

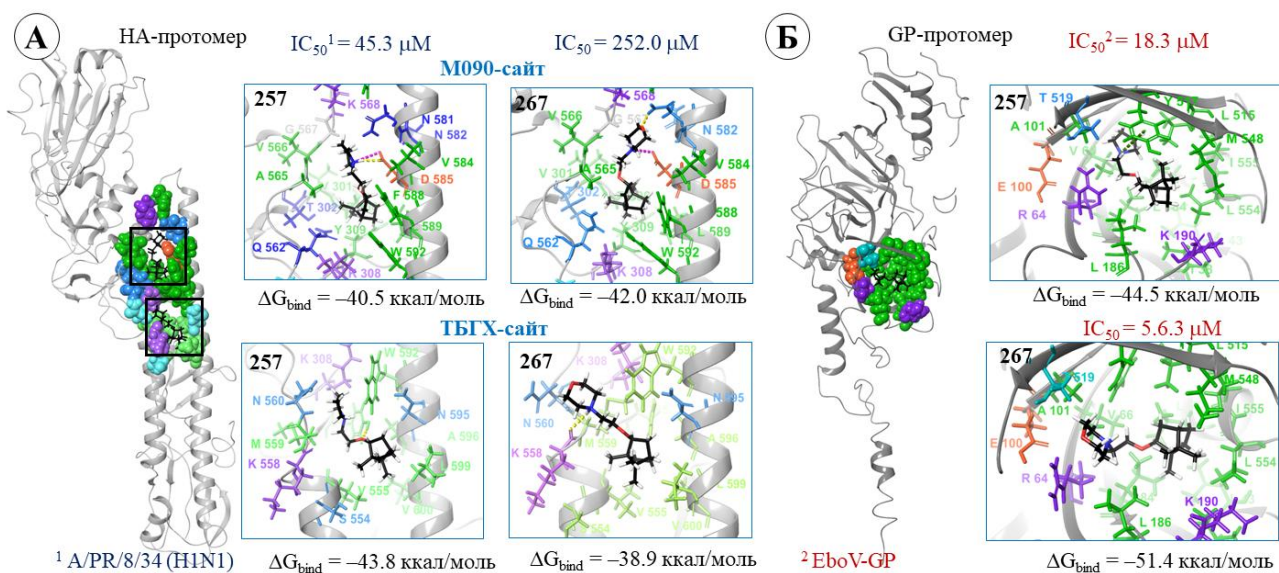


Рисунок 3-87 – Комплементарность 257 и 267 к сайтам связывания НА (А) вируса гриппа и GP (Б) вируса Эбола.

Согласно результатам молекулярного моделирования, бициклический каркас производных камфена обеспечивает эффективное **связывание** с гидрофобными полостями сайтов связывания в поверхностных белках вируса гриппа и вируса Эбола. Активация обоих гликопротеинов происходит при пониженных значениях pH среды. Протонирование соединений по атому азота приводит к образованию дополнительного реакционного центра, обеспечивающего образование электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными аминокислотами и/или ароматическими кольцами тирозина, который присутствует в сайтах связывания ингибиторов гемагглютинаина и гликопротеина. Дальнейший поиск новых аналогов может привести к **открытию** нового ингибитора, нацеленного на стадию слияния мембран и обладающего широким спектром противовирусной активности.

3.5. Фармакофорный профиль ингибиторов поверхностных вирусных белков

I типа

Совокупный анализ биологических экспериментов и результатов молекулярного моделирования позволил среди большого количества исследуемых соединений – ингибиторов входа найти структуры, проявляющие активность против как минимум двух типов вирусов: гриппа и коронавируса, гриппа и вируса Эбола, гриппа и респираторно-синцитиального вируса ([рисунок 3–88](#)). Перечисленные вирусы относятся к разным семействам. Объединяет их только тип поверхностных белков, подавляя фузогенную активность которых, можно препятствовать входу вируса в клетку-хозяина. Представленные на [рисунок 3–88](#) соединения имеют общий гидрофобный скаффолд, «клетку», которая хорошо укладывается в гидрофобные полости сайтов связывания. Как правило, эти полости во всех рассматриваемых белках устилаются лейцином, валином, метионином и фенилаланином. В активных лигандах присутствуют акцепторная группа, содержащая кислород, линкер длиной не более 2 $-(CH_2)_2-$ и азотсодержащая группа. В большинстве случаев атом азота может быть протонирован, особенно если функционирование белка начинается с понижения pH среды, как это происходит в случае НА, S-белка и GP. Наличие позитивно заряженной группы предполагает образование солевых мостиков с отрицательно заряженными аминокислотами, такими как E₂₆₇ в НА, D₂₈₂₇ и D₂₈₆₄ в S-белке, D₂₅₂₂ в GP и, наконец, с ключевыми а.о. сайта связывания ингибиторов F-белка: D₄₈₉ и E₄₈₇. Анализ фармакофорных профилей сайтов связывания в рассматриваемых поверхностных белках предполагает наличие хотя бы одной ароматической группы. В каждом белке присутствуют ароматические а.о.: Y₂₉₄ в НА, F₂₁₀₄₂ в S-белке, Y₂₅₁₇ в GP, и набор фенилаланинов в F-белке. Предполагается, что наличие ароматического фрагмента в активной молекуле должно привести к увеличению аффинности к сайту связывания и, как следствие, к снижению значения IC₅₀.

К сожалению, такая рекомендация не может учитывать общую токсичность соединений. Так, среди ингибиторов НА ([125–159](#), [рисунок 3–17](#)) встречаются соединения с ароматической группой, значение IC₅₀ которых соизмеримо с таковым для камфецина. Однако значение SI у них заметно ниже. Схожая ситуация наблюдается для N-производных эфиров (–)-борнеолов – ингибиторов F-белка РСВ ([218–256](#), [рисунок 3-76](#)): значения IC₅₀, соответствующие соединениям с ароматическими фрагментами ([249–256](#)), соизмеримы со значением, характерным для известного ингибитора F-белка – сисунатовира, с одной стороны, и невысокими значениями SI с другой. Среди рассматриваемых ингибиторов S-белка SARS-CoV-2 ([176](#), [177](#)) и GP-белка вируса Эбола ([257–270](#)) соединения, содержащие ароматические группы, не встречаются. Тем не менее, среди известных ингибиторов всех четырех поверхностных белков присутствуют ароматические группы: умифеновир – ингибитор НА и S-белка, сертралин – ингибитор GP вируса Эбола и, все известные ингибиторы F-белка, включая сисунатовир. Именно поэтому рекомендуется введение ароматического фрагмента в структуры активных молекул.

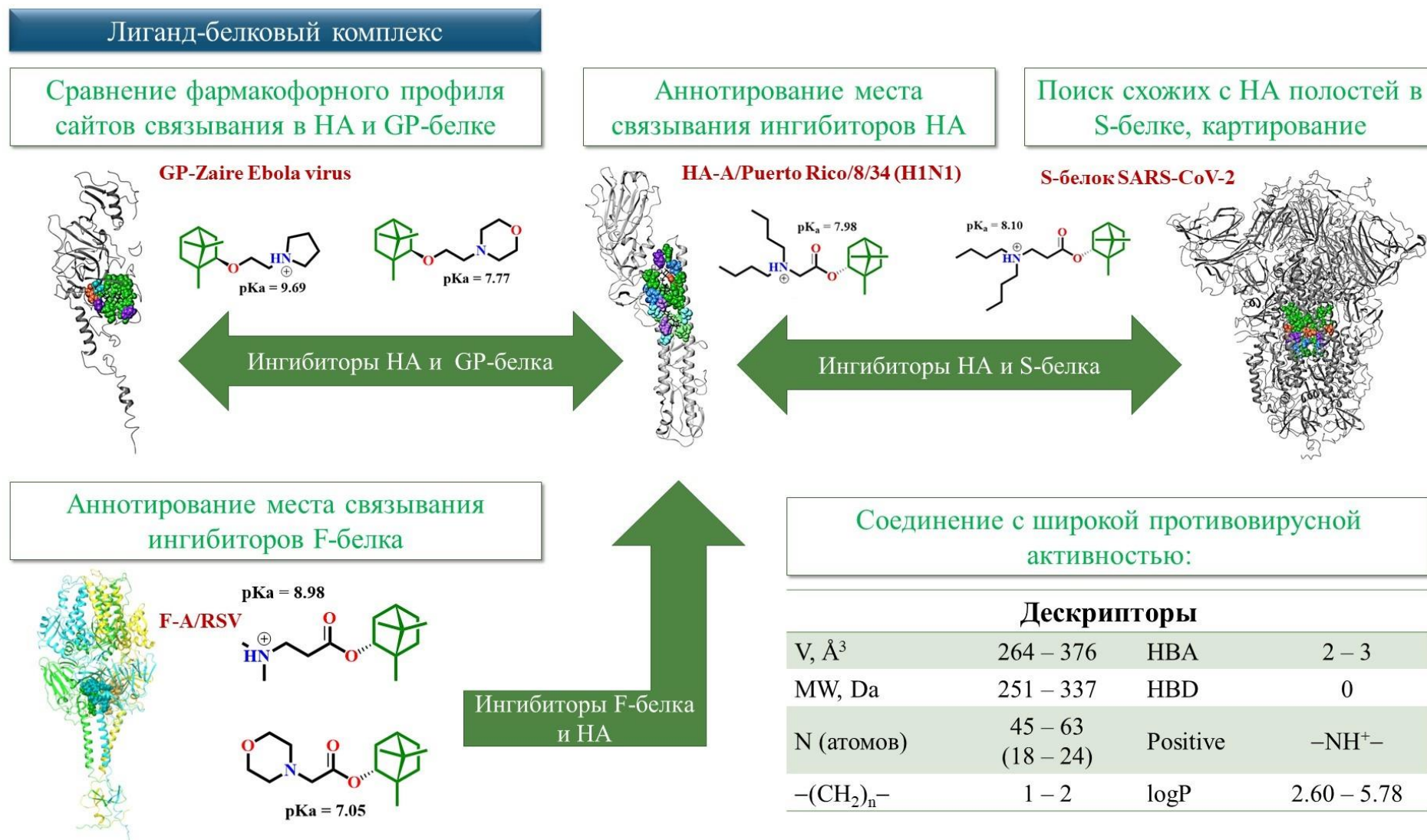


Рисунок 3-88 – Поиск соединения, обладающего активностью против ряда вирусов.

3.6. Ингибирующая активность малых молекул в отношении ортопоксвирусов

3.6.1. Предсказание вторичной структуры р37 и сайта связывания тековиримата [317,318]

Третичная структура высококонсервативного белка периферической мембраны белка р37 ортопоксвирусов была предсказана с помощью платформы ColabFold [223]. В качестве первичной оценки адекватности полученной модели белка был использован тест разности локальных расстояний (pLDDT), согласно которому доверительная вероятность для большинства предсказанных элементов вторичной структуры белка превышает 90%. Сомнительным в плане предсказания является сборка и расположение α -спирали, соответствующей а.о. 175–188 (на рисунке 3–89А показана оранжевым цветом).

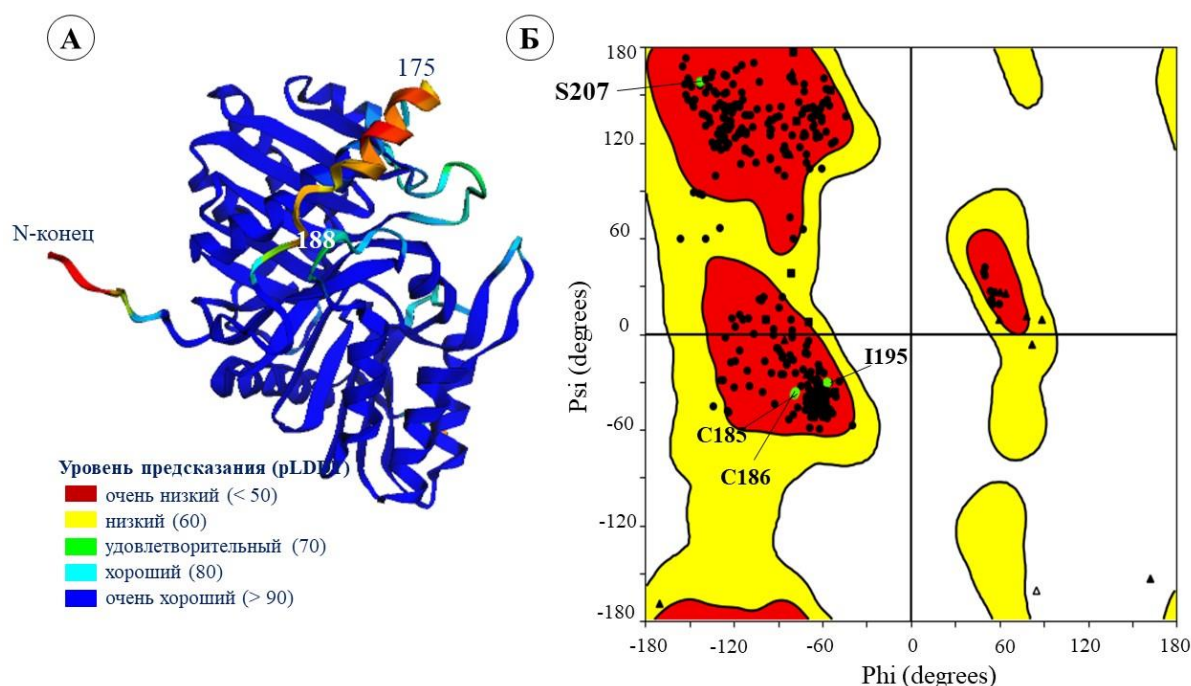


Рисунок 3-89 – Результат предсказания третичной структуры белка р37: А – третичная структура; Б – карта Рамачандрана, как способ визуализации двухгранных углов а.о. пептидной основы в белке.

В работе [207] основным критерием адекватности предсказанной третичной структуры р37 является значение RMSD, равное 1.97 Å, т.е. соотношение геометрических параметров белка с существующей экспериментальной моделью фосфолипазы, соответствующей PDB коду 1V0W [208]. Согласно графику Рамачандрана, представленному в работе [230], 84.9% аминокислот располагались в благоприятных областях, 10.7% в дополнительно разрешенной области и 3.6% в основной разрешенной области и только четыре а.о., C185, C186, S207 и I195 (около 0.9%), находились в запрещенной области. Значение RMSD сравнения параметров модели, предсказанной в рамках данной задачи, составляет 2.65 Å. При этом, согласно карте Рамачандрана (рисунке 3–89Б), аминокислоты, попадающие в запрещенные зоны, отсутствуют.

Аминокислоты C185, C186, S207 и I195, положение которых в работе [207] показано как сомнительное, на [рисунке 3–89Б](#) представлены зелеными точками и в данной модели белка располагаются в благоприятном регионе. Таким образом, адекватность предсказанной в рамках данной задачи, модели белка р37 не вызывает сомнения. Белок был помещен в мембрану (модели POPC) таким образом, чтобы два ключевых остатка цистеина были погружены в мембрану. Кубическая система с буфером в 20Å была заполнена молекулами воды (модель TIP3P) и 0.15 M раствором NaCl. Молекулярно-динамические симуляции были проведены в ансамбле NPAT при 310 K в течение 50 нс.

Вероятный сайт связывания малых молекул в предсказанной модели белка был определен с помощью методологии идентификации и характеристики полостей связывания [233]. Полость, подходящая для связывания малых молекул, содержит в себе а.о., которые были описаны в работе [207], в частности это F52, S135, C120, N329 и аминокислоты фрагмента фосфолипазного домена N312 и K314 ([рисунк 3–90А](#)).

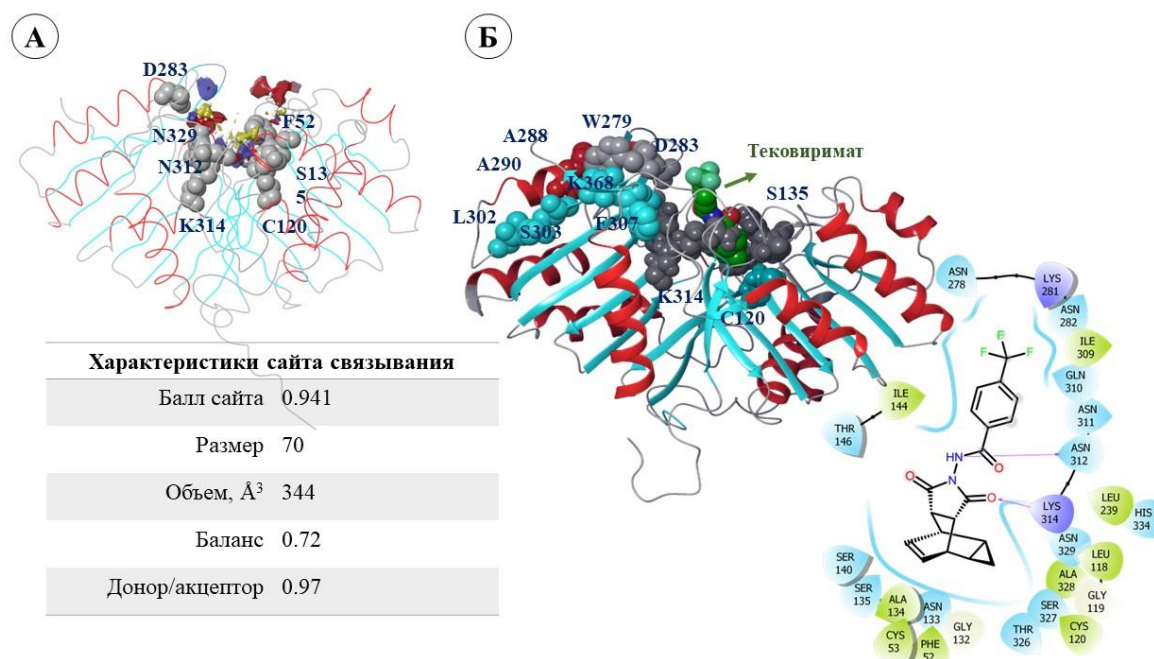


Рисунок 3-90 – Сайты связывания малых молекул в белке р37: А – найденный в рамках данной работы сайт связывания; Б – а.о. сайтов связывания, описанные в работах [206] и [207] и результат процедуры гибкого молекулярного докинга в сайт связывания, найденный с помощью методологии идентификации и характеристики полостей связывания [233].

Кроме того, в сайте связывания присутствует аспарагиновая кислота (D) в положении 283, которая мутирует в резистентном к **ST-246** (тековиримат) штамме VV (*vaccinia virus*) на глицин (G) (D283G). Согласно данным публикации [206], данная аминокислота влияет на эффективность связывания тековиримата. Сайт связывания небольшого размера и подходит для расположения

небольших молекул, таких как тековиримат, НИОХ-14 или соединений с жестким норборнанным или адамантановым фрагментами.

Ингибитор р37 тековиримат (**79**) состоит из 42 атомов. Соединение **79** связывается в данной области с образованием водородных связей между атомами азота и кислорода лиганда и аминокислотами (N312 и K314) фрагмента фосфолипазного домена ([рисунок 3–90Б](#)). На [рисунке 3–90Б](#) дополнительно показаны а.о., входящие в вероятные сайты связывания тековиримата и описанные в работах [206] и [207]. Аминокислоты достаточно близко расположены друг к другу на поверхности белка. Однако анализ белка р37 по методологии [233] позволяет определить лишь одну подходящую для связывания малых молекул полость. Эта же полость описана в работе [207]. Какие-либо карманы, подходящие для связывания лигандов, в области а.о. A288, A290, L302, F307, K368 и W279 обнаружены не были.

Геометрические параметры лиганд-белкового комплекса тековиримата, расположенного в вышеописанной полости связывания (далее **79-р37**), были использованы для подготовки стартовой модели с целью проведения молекулярно-динамической симуляции в течение 150 нс. Атомно-молекулярная система уравнилась к 60 нс симуляции, согласно графику RMSD (см. [приложение](#), [рисунок 5–11А](#)). Анализ результатов расчетов показывает, что тековиримат не покидает выбранную полость связывания, не диффундирует в растворитель. Статистическое облако на [рисунке 3–91А](#) свидетельствует о том, что молекула прочно закреплена в сайте связывания.

Водородная связь между аминокислотой лиганда и N312 сохраняется в течение 96% всего времени симуляции. Менее продолжительный контакт регистрируется между атомом карбонильного кислорода и K314. Обе упомянутые аминокислоты относятся к а.о. фосфолипазного домена. Кроме того, в течение 35% времени симуляции наблюдается опосредованный водой контакт лиганда с S135 ([рисунок 3–91Б](#)). В сайте связывания тековиримат контактирует с а.о., расположенными в непосредственной близости к аминокислотам, мутация которых описана в тековиримат-резистентном штамме *vaccinia virus* [207]. В этом случае регистрируются непродолжительные по времени контакты с а.о. N278 и K281, расположенными рядом с G277 (мутация G277C) и с D283 (мутация D283G), соответственно. Анализ результатов расчетов позволяет предположить, что связывание тековиримата в данном сайте связывания может оказать влияние на вторичную структуру вирусного белка р37.

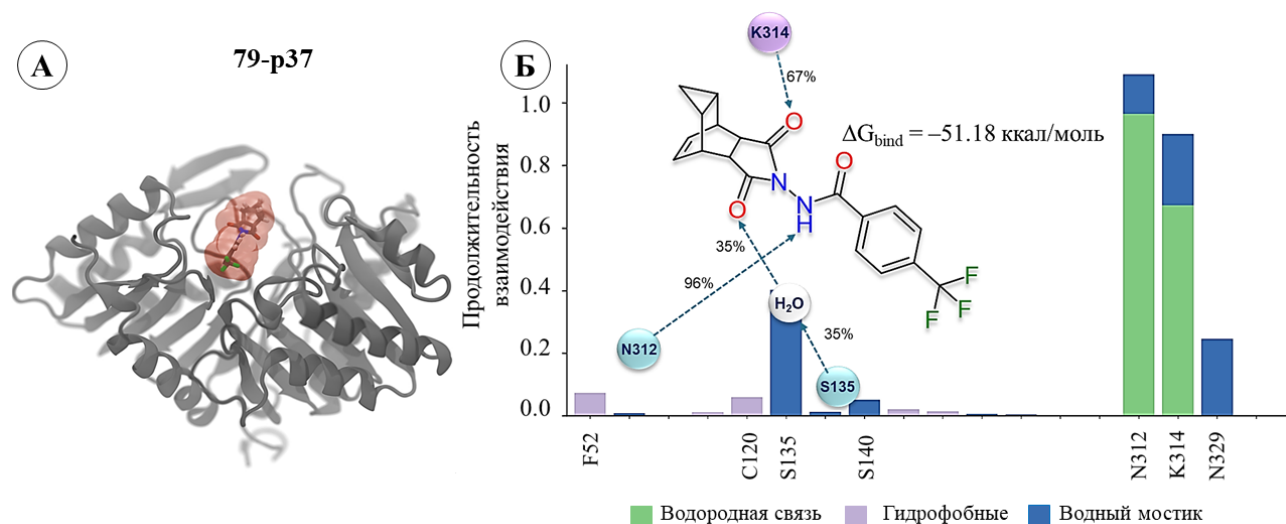


Рисунок 3-91 – Результаты молекулярно-динамической симуляции лиганд-белкового комплекса **79-p37**: А – расположение соединения **79** в сайте связывания; Б – гистограмма взаимодействия атомов лиганда с а.о. сайта связывания. Энергия связывания (ΔG_{bind}) рассчитана для статистически значимой позиции, полученной в результате процедуры кластеризации фреймов. Продолжительность взаимодействий соответствует доле времени молекулярно-динамических симуляций, где значение 1.0 соответствует 100% времени, в течение которого регистрируются межмолекулярные взаимодействия.

Для подтверждения данной теории дополнительно была создана модель измененного белка p37, в котором были замещены две аминокислоты: глицин в положении 277 был изменен на цистеин (G277C), а аспарагиновая кислота в положении 283 была изменена на глицин (D283C). Молекулярно-динамическая симуляция была проведена в тех же условиях, что и МД симуляция лиганд-белкового комплекса **79-p37**. Первоначальное расположение тековиримата в сайте связывания измененного белка p37 (**p37 (G227C, D283C)**) соответствует его расположению в нативном белке. Визуальный анализ траектории МД симуляции показывает, что положение лиганда в сайте связывания измененного белка p37 меняется к 110 нс, а уже к 140 нс лиганд покидает сайт связывания и диффундирует в растворитель ([рисунок 3-92А](#)). Анализ графика RMSD (см. [приложение рисунок 5-11Б](#)) также свидетельствует о нестабильном положении лиганда в сайте связывания.

В течение всего времени симуляции лиганд взаимодействует с бóльшим количеством аминокислот в сайте связывания ([рисунок 3-92Б](#)), чем в случае поведения тековиримата в нативном белке p37 ([рисунок 3-91Б](#)). Чаще всего регистрируются образование водородной связи с N312, и взаимодействия, опосредованные водой с K314 и N329. С а.о. K281 и N278, расположенными рядом с мутантными аминокислотами C277 и G283, контакты непродолжительны и не превышают 15% времени симуляции.

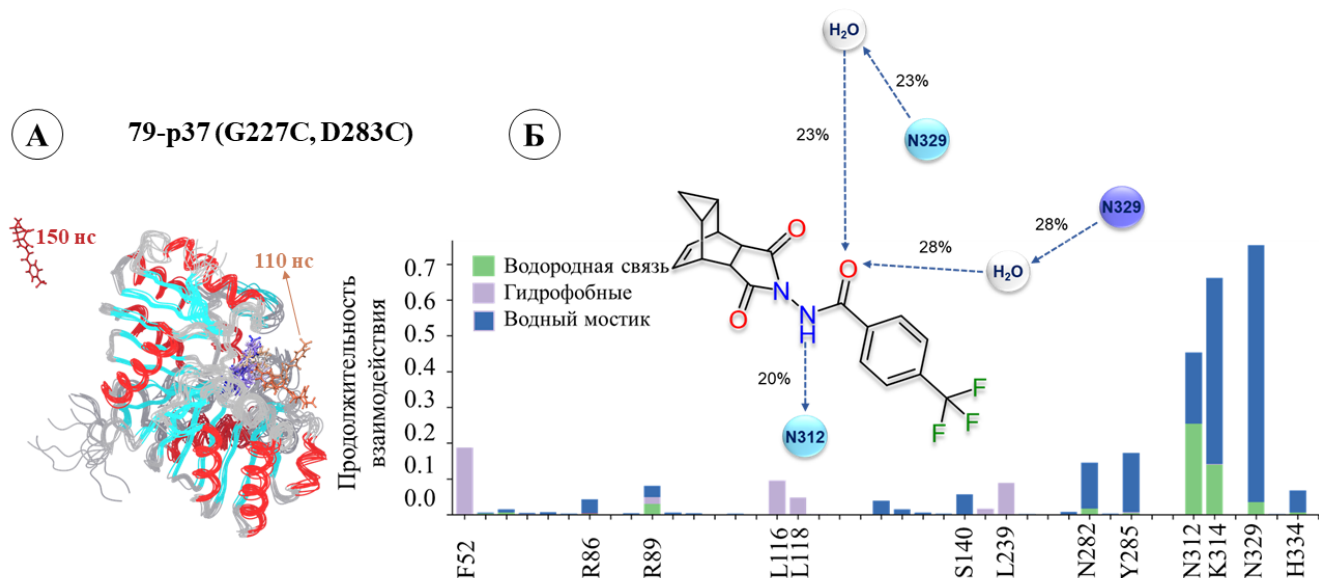


Рисунок 3-92 – Результаты молекулярно-динамической симуляции **p37-M-78**: А – расположение **79** в сайте связывания; Б – гистограмма взаимодействия атомов лиганда с а.о. сайта связывания. Продолжительность взаимодействий соответствует доле времени молекулярно-динамических симуляций, где значение 0.7 соответствует 70% времени, в течение которого регистрируются межмолекулярные взаимодействия.

Рисунок 3–93 иллюстрирует общее количество контактов между тековириматом и а.о. сайта связывания, возникающих и продолжающихся в течение всего времени симуляции. Соединение **79** связывается в сайте нативного белка p37 с образованием контактов с а.о. фосфолипидного домена (N312 и K314), которые сохраняются в течение всего времени молекулярно-динамической симуляции (**рисунок 3–93А**). При связывании тековиримата в измененном белке p37, содержащем мутации G277C и D283G, на 120 нс симуляции происходит перемещение лиганда в полости связывания, которое сопровождается образованием выраженных межмолекулярных контактов с R86 и R89. Начиная с 140 нс, лиганд покидает область связывания, и контакты лиганда с а.о. белка не регистрируются (**рисунок 3–93Б**). Анализ результатов молекулярно-динамической симуляции комплексов тековиримата с нативным и измененным белком p37 показывает, что аминокислоты в положении 277 и 283 оказывают влияние на прочность связывания лиганда **79** в сайте связывания. Тогда, на основании полученного результата, можно предположить, что тековиримат, вероятно, связывается в полости, близкой к фосфолипазному мотиву H(N)KD, содержащей две ключевых а.о., N312 и K314. Данный сайт связывания может быть рассмотрен в качестве вероятного места связывания других малых молекул, проявляющих активность против VV и ряда других штаммов ортопоксвирусов и характеризующихся схожим с тековириматом фармакофорным профилем. В качестве ключевых аминокислотных остатков в дальнейшем будут рассмотрены а.о. N312, K314 и S135.

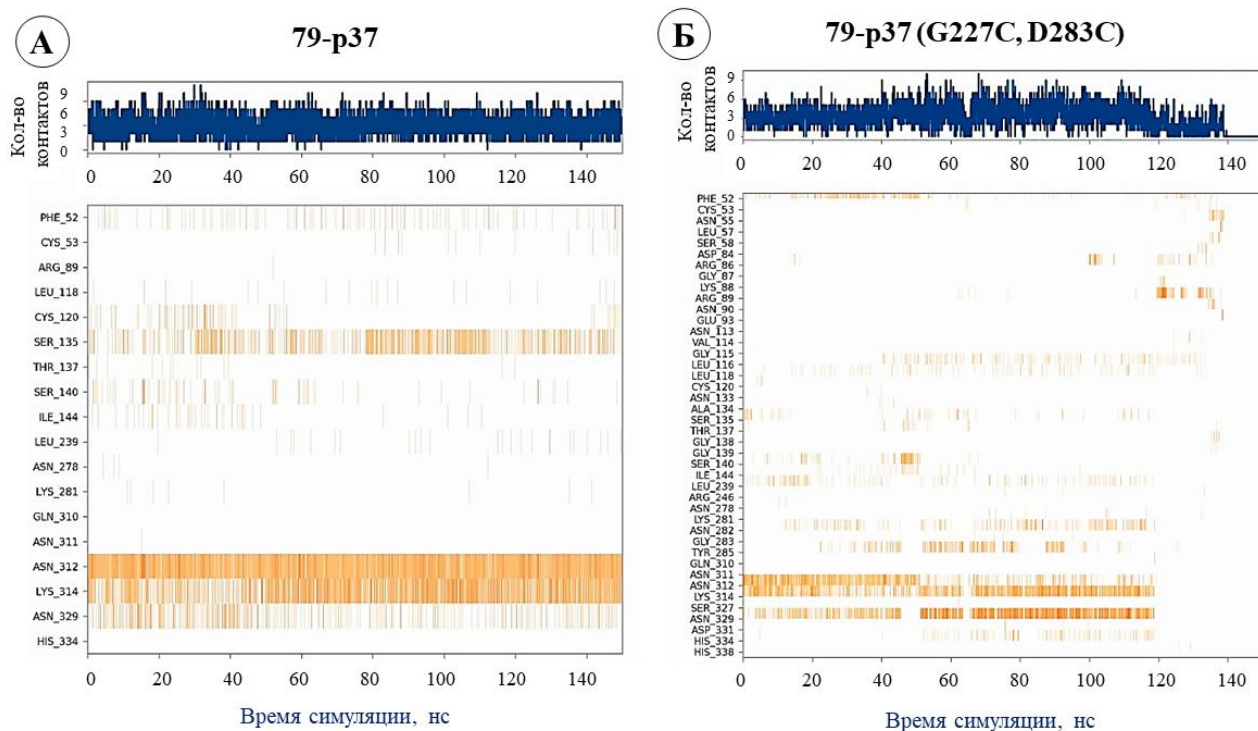


Рисунок 3-93 – Частота межмолекулярных контактов между атомами лиганда **79** и а.о. сайта связывания тековиримата в нативном белке p37 (А) и в белке, содержащем мутации G277C и D283G

Противовирусный агент НИОХ-14 является [319] пролекарством тековиримата и используется в биологических экспериментах в качестве референс-соединения. Соединение активно в отношении ортопоксвирусов штаммов VV и CPXV в субмикромольных концентрациях (рисунок 3–94).

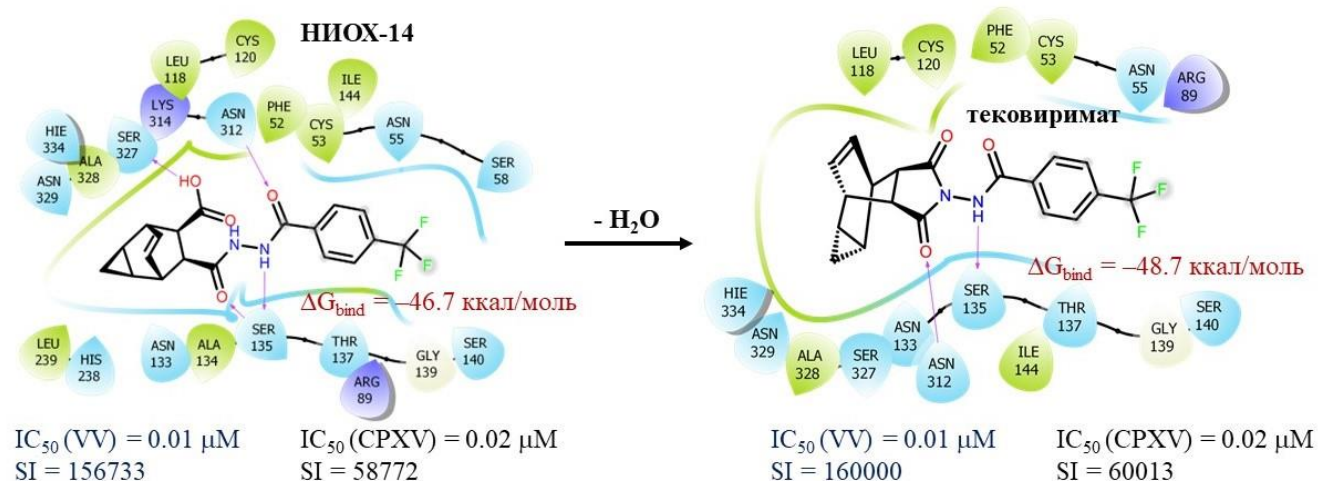


Рисунок 3-94 – Результаты молекулярного докинга НИОХ-14 и тековиримата в сайт связывания фосфолипазного домена белка p37. Энергии связывания приведены для оптимальной докинг-позиции, выбранной на основании визуального фильтрации результатов расчетов.

Учитывая структурные особенности молекулы, можно с уверенностью утверждать, что механизм противовирусного действия НИОХ-14 связан с ингибированием функции мембранного белка р37. Результаты молекулярного докинга тековиримата и НИОХ-14, проведенного в одинаковых условиях, с последующей оценкой энергии связывания также позволяют сделать подобный вывод.

Оба соединения связываются в сайте связывания белка р37 в области фосфолипазного домена. Расположение лигандов сопровождается образованием водородных связей между атомами азота аминогруппы ($-\text{NH}-$) обоих лигандов и а.о. S135, а также между карбонильными кислородами ($-\text{C}=\text{O}$) и а.о. N312 (рисунк 3–94). Дополнительно гидроксильная группа НИОХ-14 образует водородную связь с S327. Энергия связывания обоих противовирусных агентов, как и значения противовирусной активности (IC_{50} и SI), соизмеримы. Здесь необходимо отметить, что в данном случае энергия связывания тековиримата в белке р37 рассчитывалась для позиции, полученной в результате процедуры молекулярного докинга, и может отличаться от значения, полученного в результате анализа молекулярно-динамических симуляций и представленного на рисунке 3–91Б. Соединение НИОХ-14 преобразуется в человеческом организме в тековиримат путем образования цикла с отщеплением воды. Весьма вероятно, что данное превращение происходит до того момента, как НИОХ-14 попадает в инфицированную клетку [320,321].

3.6.2. Производные (+)-камфоры и (–)-фенхона – ингибиторы р37 [317]

На рисунке 3–95 представлены производные (+)-камфоры и (–)-фенхона (271–305), проявляющие активность в отношении ортопоксвирусов штаммов VV и CPXV. Для двух агентов 281 ($\text{SI} = 685$) и 291 ($\text{SI} = 696$) были проведены эксперименты по времени добавления, где в качестве референс-соединения был использован НИОХ-14 [319]. Согласно результатам эксперимента, производное (–)-фенхона 281 и производное (+)-камфоры 291 наиболее активны на последних стадиях жизненного цикла вируса осповакцины. Этот факт позволяет рассматривать мембранный вирусный белок р37 в качестве потенциальной биологической мишени. Тековиримат (79) имеет ряд выраженных фармакофорных признаков: жесткий гидрофобный фрагмент, области донорно-акцепторных взаимодействий, ароматическое кольцо и гидрофобную $-\text{CF}_3$ группу. Расстояние между гидрофобными признаками составляет около 13Å (рисунк 3–96). При связывании агента 79 в фосфолипажном домене белка р37 жесткий гидрофобный каркас молекулы преимущественно окружен гидрофобными аминокислотами, такими как L118, C120, F52, C53, L239, а фторсодержащий фрагмент контактирует с I144 и I141 (рисунк 3–96Б). Гидрофобные контакты с перечисленными а.о. регистрируются в течение молекулярно-динамических симуляций, пусть и непродолжительное время (рисунк 3–91Б).

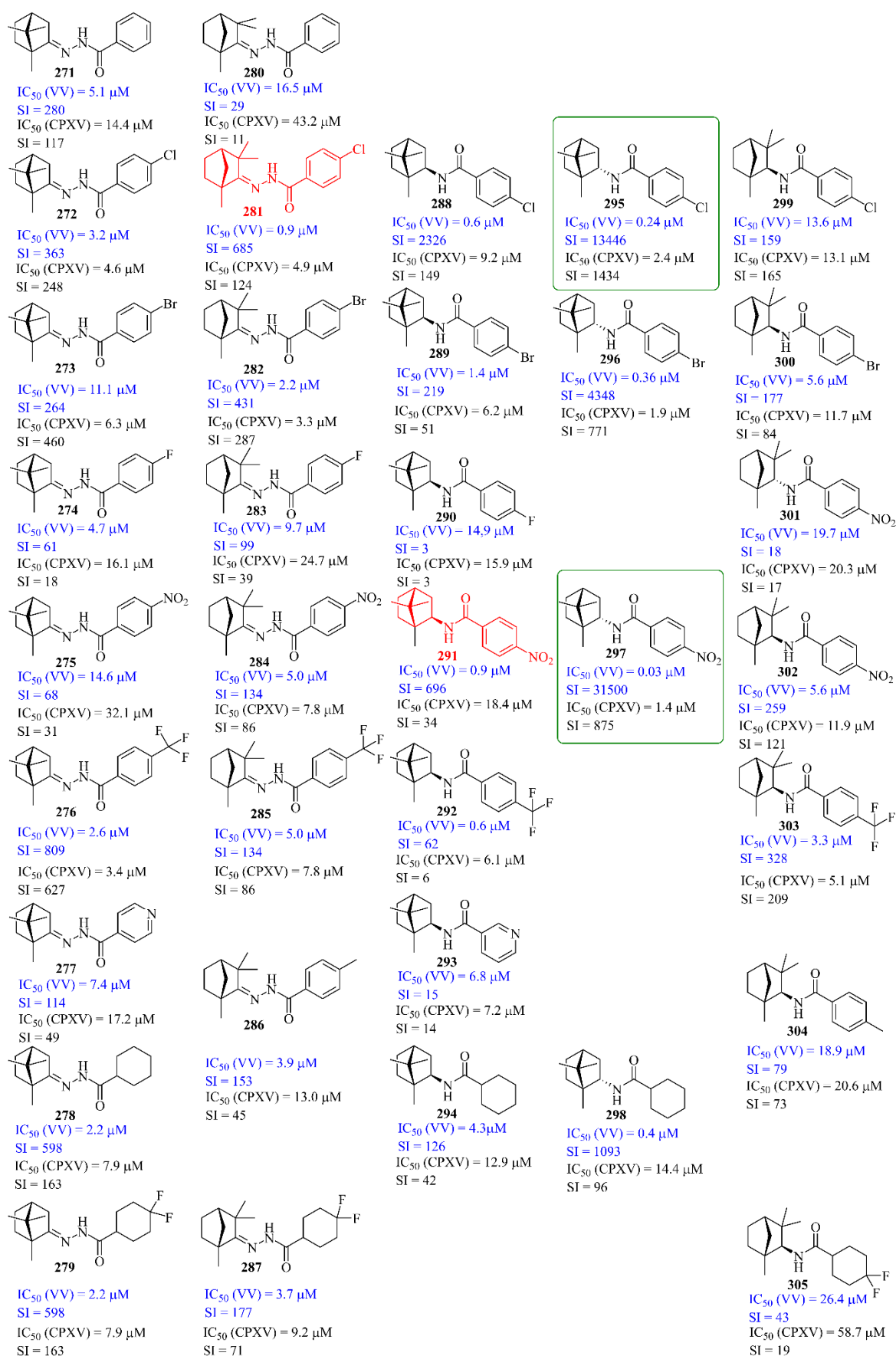


Рисунок 3-95 – Производные (+)-камфоры и (-)-фенхона, активные в отношении ортопоксирисов штаммов VV и CPXV.

Расстояние между аминогруппой и атомом карбонильного кислорода пирролидинового кольца составляет 3.3Å. Донорно-акцепторная часть молекулы активно образует водородные связи с атомами S135, N312, K314.

Малые молекулы, производные (+)-камфоры и (-)-фенхона, содержат схожий набор фармакофорных признаков и последовательность их расположения: жесткий гидрофобный каркас (-)-фенхона (на примере **281**) или (+)-камфоры (на примере **291**), донорно-акцепторная область и ароматическое кольцо. Молекула **281** содержит атом хлора – гидрофобный признак, а агент **291** нитрогруппу – акцептор водородной связи. Дистанция между гидрофобными признаками в соединении **281** составляет около 10Å.

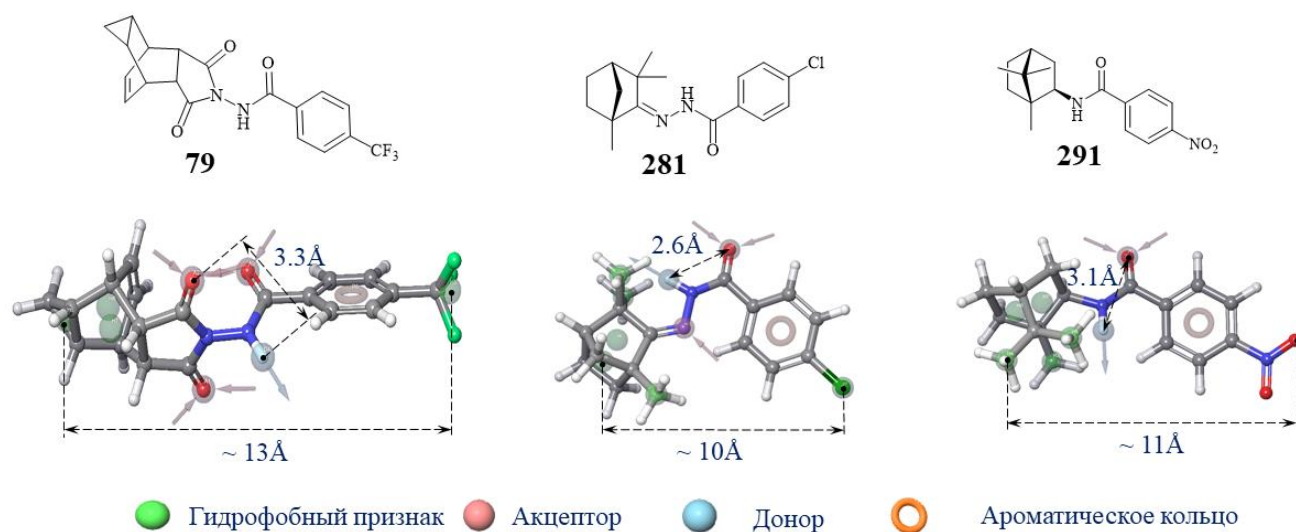


Рисунок 3-96 – Фармакофорные признаки противовирусных агентов **78**, **281** и **291**.

В молекуле **291** второй гидрофобный фрагмент отсутствует, однако учитывая аминокислотный состав сайта связывания, присутствие полярной нитрогруппы в лиганде может привести к образованию дополнительных межмолекулярных взаимодействий, например образованию солевого мостика с R89 (рисунок 3–96). Расстояние между донором и акцептором в соединении составляет 2.6 Å (рисунок 3–96), если торсионный угол φ_{HNCO} в конформации лиганда близок к 0° (как в случае производного (-)-фенхона **281**), и 3.1 Å, если $\varphi_{\text{HNCO}} \rightarrow 180^\circ$ (как в случае производного (+)-камфоры **291**). Схожесть и последовательность расположения фармакофорных признаков рассматриваемых соединений с фармакофорным профилем тековиримата в совокупности с результатами эксперимента по времени добавления позволяют рассматривать мембранный белок p37 в качестве потенциальной биологической мишени.

Молекулярный докинг соединений **271–305** (рисунок 3–95) был проведен в условиях гибкого докинга, где 10 докинг-решений были заданы в качестве максимально возможных. Оптимальные докинг-позиции были выбраны на основании визуального фильтрования и анализа

энергетических параметров связывания. Также была учтена близость ключевых функциональных а.о. (S135, N312 и K314) к позициям лигандов, а также отсутствие стерических затруднений при их связывании. Для выбранных докинг-решений были рассчитаны энергии связывания лиганда и белка (ΔG_{bind}) с целью определения взаимосвязи теоретических расчетов с экспериментальными (pIC_{50}) данными. Значения ΔG_{bind} коррелируют со значениями pIC_{50} (VV) с индексом корреляции равным 0.69 (рисунок 3–97А), а со значениями pIC_{50} (CPXV) – равным 0.46 (рисунок 3–97Б). Аналогично тековиримату (79) и противовирусному агенту НИОХ-14, производные (+)-камфоры и (–)-фенхона ингибируют штамм VV в меньших концентрациях, чем штамм CPXV.

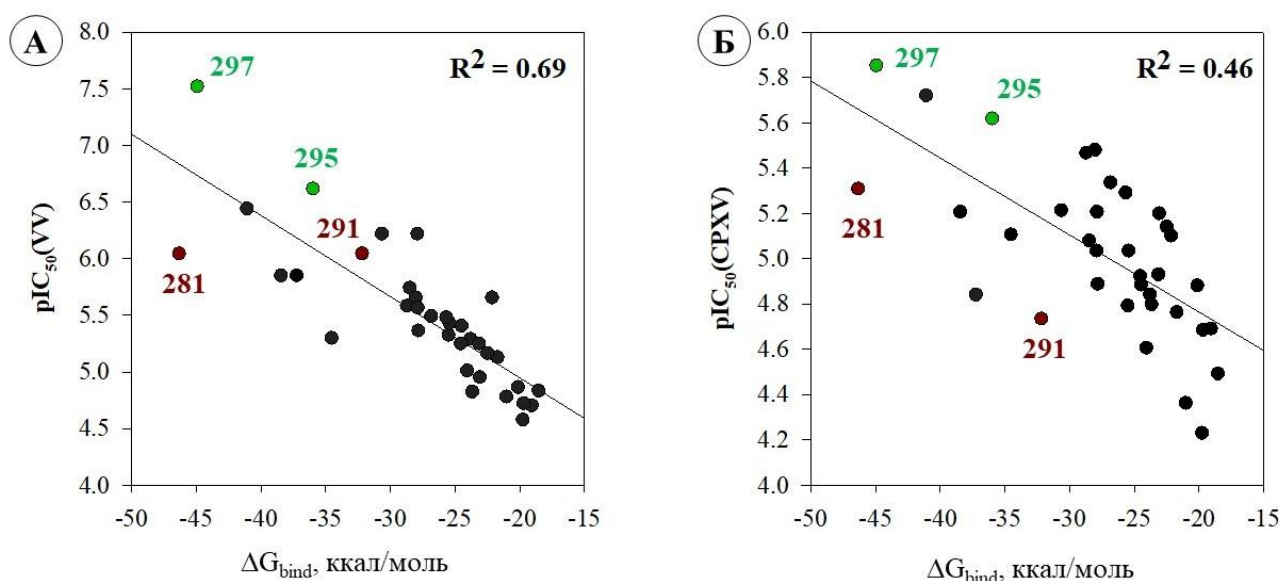


Рисунок 3-97 – Взаимосвязь результатов теоретических расчетов и биологических экспериментов оценки противовирусной активности соединений 271–305 в отношении штаммов ортопоксвирусов VV (А) и CPXV (Б)

Между тем, мембранный белок p37 характеризуется консервативностью. Гомологичность аминокислотных последовательностей в белке p37, соответствующих штаммам VV и SPV, идентичны на 54.3%, а штаммам VV и MPXV – на 54.8%. А.о. фосфолипазного домена не различаются. Кроме того, во всех случаях в положении 135 находится серин [201]. Аминокислотные последовательности белка p37 штаммов VV (UniProt ID P04021 [322]) и CPXV (UniProt ID G0XSE7) [323] абсолютно идентичные. Тем не менее, все описанные соединения, включая референсные, характеризуются меньшими значениями индекса селективности против CPXV по сравнению с VV. Однако этот факт не подвергает сомнению правильность выбранной мишени, а лишь еще раз обращает внимание на то, что корреляция найдена между значениями общей противовирусной активности и энергией связывания каждого соединения с белком p37. Ожидать здесь корреляцию близкую к 1 не имеет смысла. Наличие взаимосвязи на уровне $R^2 \geq 0.5$ уже может рассматриваться как косвенное доказательство в пользу выбора мишени.

Объяснить же разную противовирусную активность исследуемых соединений против столь близких штаммов вируса на данном этапе молекулярного моделирования просто невозможно.

Геометрические позиции лиганд-белковых комплексов агентов **281** и **291**, связанных в фосфолипазном домене белка p37 (далее комплексы **281-p37** и **291-p37**), были использованы для построения стартовых моделей молекулярно-динамических симуляций. Условия симуляций были такими же, как при моделировании комплекса **79-p37**: пара цистеинов (C185 и C186) были погружены в мембрану POPC, размер буфера составил 20Å, кубическая система была заполнена молекулами воды модели TIP3P и раствором соли NaCl в концентрации 0.15 M. Общее время симуляции составило 150 нс. В течение всего времени расчета оба лиганда оставались в сайте связывания. На [рисунке 3–98А](#) представлены «облака» средневзвешенной атомной заселенности лиганда: меньший размер облака соответствует меньшим перемещениям молекулы в сайте связывания.

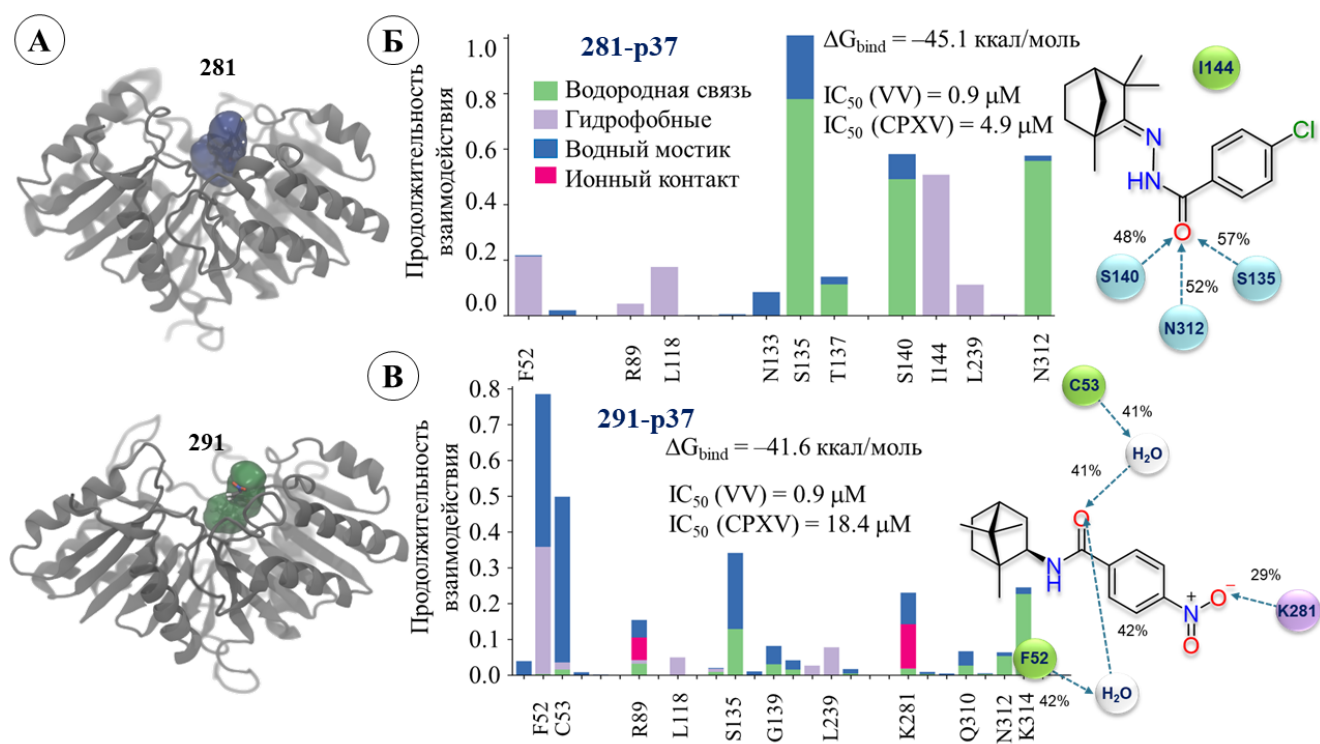


Рисунок 3-98 – Результаты молекулярной динамики: А – анализ средневзвешенной атомной плотности расположения лигандов **281** и **291** в течение всего времени симуляции. Б, В – гистограммы межмолекулярных взаимодействий между атомами лигандов (**281** и **291**, соответственно) и а.о. сайта связывания мембранного белка p37. Энергия связывания (ΔG_{bind}) рассчитана для статистически значимой позиции, полученной в результате процедуры кластеризации фреймов. Продолжительность взаимодействий соответствует доле времени молекулярно-динамических симуляций, где значение 1.0 соответствует 100% времени, в течение которого регистрируются межмолекулярные взаимодействия.

Здесь можно предположить, что оба лиганда достаточно локально расположены в фосфолипазном домене белка p37. Согласно графику RMSD, можно сделать вывод об успешном

завершении расчета (см. [приложение рисунок 5–12А](#)). Колебания положений атомов протеина не превышают 1 Å уже к началу симуляции, а положение лиганда смещается в диапазоне 3–4 Å. Анализ динамического поведения агента **281** позволяет зарегистрировать продолжительные по времени водородные связи лиганда с S135, S140 и N312. Анализ графика RMSD показывает, что на 60 нс симуляции происходит заметное изменение позиции лиганда **291** в сайте связывания. К концу симуляции диапазон колебаний атомов лиганда составляет 1.5–2 Å (см. [приложение рисунок 5–12Б](#)). Производное (+)-камфоры **291** контактирует с бóльшим количеством аминокислотных остатков, что может свидетельствовать о более свободном расположении лиганда в полости фосфолипидного домена ([рисунок 3–98Б](#)). Самые продолжительные контакты регистрируются между карбонильным кислородом соединения **291** и аминокислотами F52 и C53 (водородные связи, опосредованные водой), и между кислородом нитрогруппы и положительно заряженным лизином в положении 281 (K281) ([рисунок 3–98В](#)). Кроме того, расположение лиганда **291** в сайте связывания характеризуется образованием межмолекулярных взаимодействий ионной природы между атомами нитрогруппы лиганда и R89, K281. Согласно значениям энергии связывания, комплекс **281-p37** почти на 10 ккал/моль стабильнее, комплекса **291-p37**.

Анализ результатов молекулярно-динамической симуляции комплексов **281-p37** и **291-p37** свидетельствует о том, что производное (–)-фенхона **281** более прочно «сидит» в сайте связывания, в отличие от производного (+)-камфоры **246**. Это хорошо иллюстрируется на [рисунке 3–99А](#), где показано, что соединение **281** контактирует с аминокислотами F52, S135, S140, I144, N312 на протяжении всего времени симуляции. В комплексе **291-p37** в процессе симуляции лиганд меняет свое положение. До 70 нс симуляции регистрируются контакты между атомами лиганда и а.о. L239, K281, K314, а начиная с 70 нс, положение лиганда смещается, и до конца МД симуляции фиксируются частые взаимодействия с S135, F52 и C53 ([рисунок 3–99Б](#)). При этом общее количество межмолекулярных контактов возрастает. Принимая во внимание несколько фактов, во-первых, схожую закономерность изменения титра вируса в экспериментах по времени добавления исследуемых веществ **281** и **291**; во-вторых, аналогичный тековиримату фармакофорный профиль производных (–)-фенхона **281** и (+)-камфоры **291** (особенно производного **281**); и, наконец, наличие взаимосвязи между значениями pIC_{50} и энергий связывания лигандов **271-305**, можно предположить, что вероятной биологической мишенью исследуемых соединений является мембранный белок ортопоксвирусов p37. Результаты молекулярно-динамических симуляций также свидетельствуют в пользу этой гипотезы. Лиганды **281** и **291**, аналогично тековиримату, удерживаются в активном сайте в течение 150 нс симуляции

и не диффундируют в растворитель. При анализе ключевых взаимодействий можно отметить, что упомянутые лиганды контактируют с N312, K314 и S135.

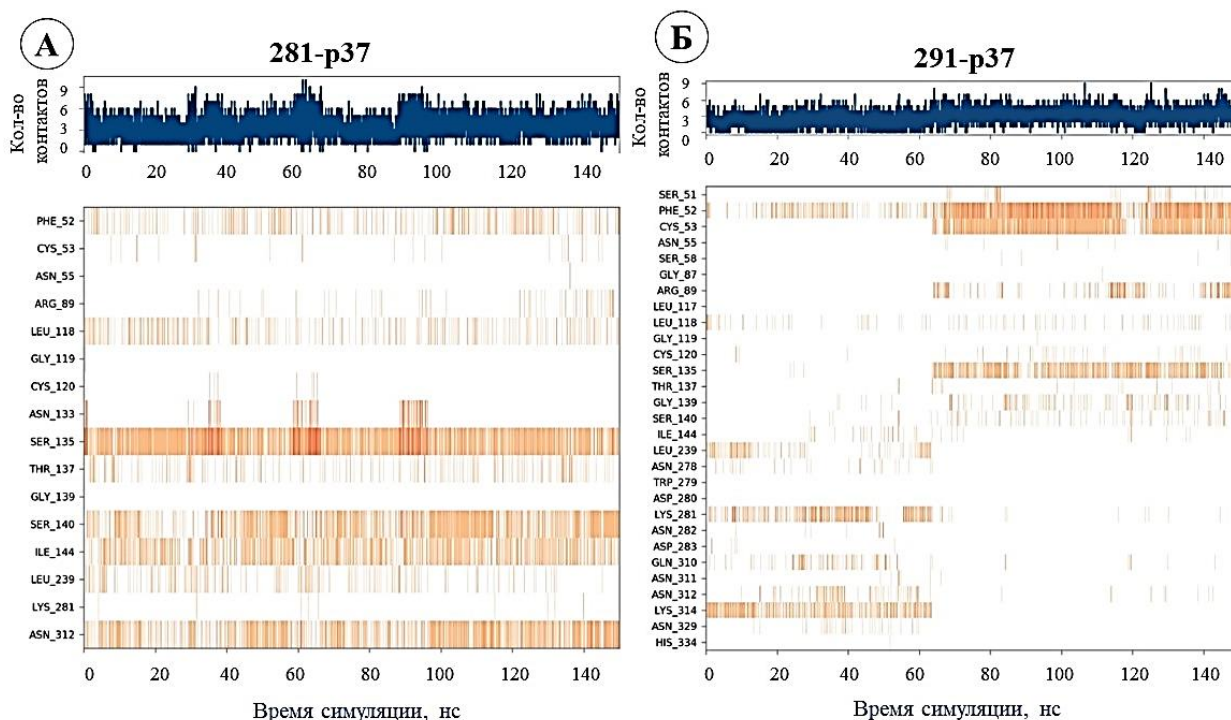


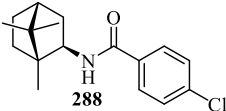
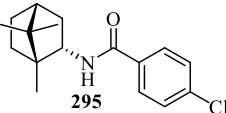
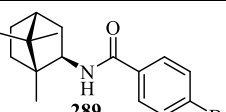
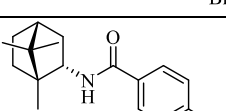
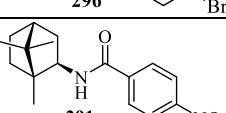
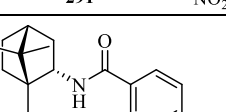
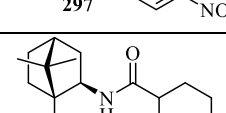
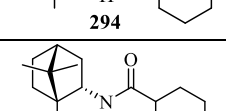
Рисунок 3-99 – Регистрация межмолекулярных контактов между атомами лиганда и а.о. сайта связывания в системах **236-p37** (А) и **246-p37** (Б).

Однако продолжительность и характер межмолекулярных взаимодействий различаются: для референс-соединения **79** продолжительными контактами являются водородные связи с а.о. фосфолипазного домена N312 и K314, возникающие в 96% и 67% случаях, соответственно (рисунок 3-91Б). Также регистрируется опосредованный водой контакт между карбонильным кислородом тековиримата и серином в положении 135. Связывание соединения **281** сопровождается формированием водородной связи в 57% случаев с S135 и в 52% с N312 (рисунок 3-98Б). Природа контактов лиганда **291** с а.о. сайта связывания в белке p37 заметно различается. Учитывая подвижность молекулы в фосфолипажном домене белка, можно предположить, что при более продолжительном времени симуляции лиганд может покинуть сайт связывания. Возможно, что лиганд **291**, который содержит $-\text{NO}_2$ группу, а не гидрофобный заместитель, как в случае соединений **281** или **79**, имеет иной механизм влияния на мембранный белок p37. Согласно результатам биологического эксперимента, значения полумаксимальной ингибирующей концентрации производных (+)-камфоры двух стереоизомеров **291** и **297** заметно различаются. Противовирусный агент **297** ингибирует репликацию штаммов VV и CPXV в меньших концентрациях, чем агент **291**, с индексами селективности 31500 и 875 единиц, соответственно (рисунок 3-95). В общем, R-изомеры производных (+)-камфоры **288–294** и S-изомеры **295–298**

демонстрируют разную противовирусную активность. В [таблице 3–33](#) приведены результаты молекулярного моделирования для пар стереоизомеров производных (+)-фенхона с целью объяснения наблюдаемых различий в их противовирусной активности. В целом можно отметить, что результаты расчетов находятся в согласии с данными биологических экспериментов оценки IC_{50} (VV). Практически во всех парах стереоизомеров более активные противовирусные агенты характеризуются большей аффинностью к сайту связывания в p37. Исключением являются соединения **288** и **295**: оба противовирусных агента ингибируют репликацию VV в одинаковых концентрациях, однако энергия связывания лиганда **288** в фосфолипазном домене p37 на 11.1 ккал/моль ниже, чем значение ΔG_{bind} , характерное для агента **295**. В парах стереоизомеров **289**, **296** и **291**, **297** (где соединения **289**, **291** – это R-изомеры, а соединения **296** и **297** – это S-изомеры) аффинность к сайту связывания S-изомеров характеризуется более низкими энергетическими параметрами, чем R. Разница в энергиях связывания ($\Delta\Delta G_{bind}$) для пары соединений **289** и **296** составляет 2.6 ккал/моль, а для пары соединений **291** и **297** $\Delta\Delta G_{bind}$ равно 13.3 ккал/моль. Эти результаты находятся в полном согласии с экспериментальными данными. Противовирусные агенты **289** и **296** ингибируют VV практически в одинаковых концентрациях, а активность агентов **291** и **297** заметно различается. В паре стереоизомеров **294** и **298** энергетические параметры аффинности лигандов к сайту связывания соизмеримы. Энергии связывания различаются на 9.5 ккал/моль в пользу производного (+)-фенхона **298**, что также коррелирует со значениями IC_{50} (VV).

Расположение лигандов **289**, **296**, **291** и **297** в сайте связывания, как правило, сопровождается образованием водородных мостиков между атомами группы C=O, –NH– и а.о. S135, N312. Гидрофобные а.о. F52, C53, L118, C120 окружают углеводородную «клетку» ([таблица 3–33](#)). Расположение заместителей ароматической группы в стереоизомерах различается: атом брома или нитрогруппа для R-стереоизомеров экспонирована наружу из сайта связывания, в то время как в S-стереоизомере они полностью погружены в фосфолипазный домен. Небольшие молекулы **294** и **298** полностью погружены в полость сайта связывания. Однако расположение стереоизомеров различается. Жесткий гидрофобный фрагмент лиганда **294** окружен аминокислотами F52, L118, C120 и A328, а заместитель циклогексил контактирует с W279, I144. Лиганд **298** расположен таким образом, что его гидрофобный фрагмент находится в непосредственной близости к W279, I144, а циклогексил – к A328, A134. При этом оба лиганда образуют водородные связи между карбонильным кислородом и N312 ([таблица 3–33](#)).

Таблица 3-33 – Результаты процедуры молекулярного докинга ряда производных (+)-камфоры и (-)-фенхона в сайт связывания p37

Соединение	pIC ₅₀ (VV)	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD, ккал/моль	ΔG_{bind} , ккал/моль	Взаимодействие с а.о.
	6.22	-6.90	-56.4	-793.29	-27.9	S135 со стороны O=C L118, C120 – гидрофобные взаимодействия с «клеткой», атом хлора экспонирован
	6.62	-6.24	-50.0	-791.35	-36.0	N312 водородный мостик с -NH- F52, C53, L118, C120 – гидрофобные взаимодействия с «клеткой»
	5.85	-6.61	-52.6	-792.08	-38.5	N312 водородный мостик с O=C T329 водородный мостик с -NH- F52, L118, C120 – гидрофобные взаимодействия с «клеткой», атом Br экспонирован
	6.44	-7.49	-65.4	-793.66	-41.1	S135 со стороны O=C F52, C53, L118, C120 – гидрофобные взаимодействия с «клеткой», галогенная связь между Br и N55
	6.05	-7.08	-61.7	-793.40	-30.2	S135 со стороны O=C L118, C120 – гидрофобные взаимодействия с «клеткой», -NO ₂ экспонирована
	7.52	-8.07	-72.3	-794.22	-44.9	S135 со стороны O=C L118, C120 – гидрофобные взаимодействия с «клеткой», водородный мостик между R89 и -NO ₂ , солевой мостик между K281 и -NO ₂
	5.37	-6.65	-52.9	-791.48	-27.8	N312 водородный мостик с O=C, гидрофобные взаимодействия с F52, L118, C120, A328 со стороны клетки, L239, W279, I144 – со стороны циклогексила
	6.40	-6.66	-50.3	-792.83	-37.2	Водородные мостики между N312 и O=C; S135 и -NH- , W279, I144 – гидрофобные взаимодействия с «клеткой», A328, A134 с циклогексилом.

Анализ данных, представленных в [таблице 3–33](#), позволяет сделать вывод, что результаты расчетов находятся в согласии с экспериментальными данными. Другими словами, грамотный подбор условий расчета и тщательный анализ результатов молекулярного моделирования позволяет объяснить наблюдаемые в биологическом эксперименте различия в противовирусной активности R и S-изомеров.

С целью оценки поведения двух стереоизомеров **291** и **297** в фосфолипазном домене белка p37 были проведены молекулярно-динамические симуляции лиганд-белкового комплекса **297-p37**. Для построения стартовой системы была использована оптимальная докинг-позиция, отобранная на основании вышеописанной методологии. Построение модельной системы и протокол молекулярно-динамической симуляции полностью соответствовали моделированию лиганд-белкового комплекса **291-p37**.

Анализ графиков RMSD для комплексов **291-p37** и **297-p37** позволяет отметить следующий факт: в обоих случаях около 60 нс симуляции в исследуемых системах происходит событие, связанное с изменением положения лиганда в сайте связывания (см. [приложение рисунок 5–12Б и В](#)). Если диапазон колебаний атомов белка не превышает 2 Å в обоих комплексах в течение всего времени расчета, то около 60 нс симуляции лиганды резко изменяют свое расположение. В это время диапазон колебаний атомов агента **291** составляет от 1.6 до 6.4 Å, а агента **297** – от 3 до 8 Å. К концу симуляции положение лигандов уравнивается, флуктуации не превышают 1–1.5 Å в обоих комплексах.

В течение всего времени симуляции производное (+)-фенхона **297** остается в области фосфолипазного домена и не переходит в растворитель. Так же, как и R-стереоизомер **291**, S-стереоизомер **297** контактирует с большим количеством а.о. сайта связывания ([рисунок 3–100](#)). В большинстве случаев это непродолжительные по времени взаимодействия. Наиболее продолжительными контактами являются водородные связи с N329, N312 и D283. Энергия связывания ΔG_{bind} соответствующая статистически значимому комплексу **297-p37**, оцененная после процедуры кластеризации, на 24.8 ккал/моль ниже значения, соответствующего связыванию агента **291** в мембранном белке p37 ([рисунок 3–98](#)). Противовирусный агент **297** ингибирует репликацию VV в меньших концентрациях, чем агент **291**, что еще раз подтверждает тот факт, что результаты расчетов и экспериментов находятся в согласии.

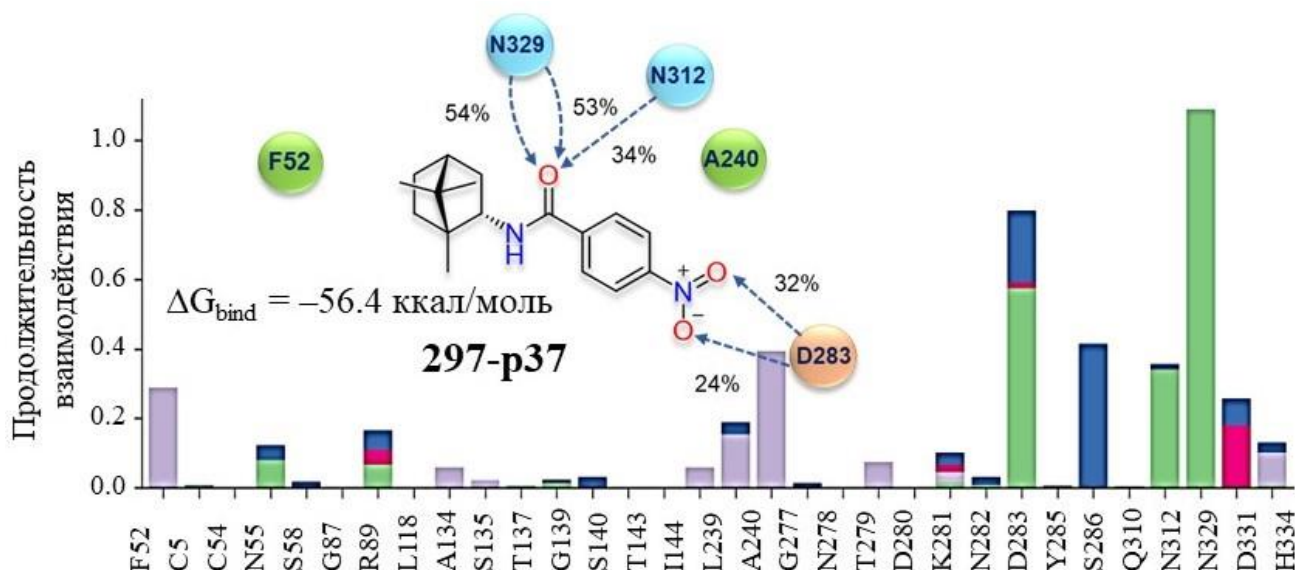


Рисунок 3-100 – Результаты молекулярно-динамической симуляции комплекса **297-p37**: гистограммы межмолекулярных взаимодействий между атомами лиганда (и а.о. сайта связывания мембранного белка p37). Продолжительность взаимодействий соответствует доле времени молекулярно-динамических симуляций, где значение 1.0 соответствует 100% времени, в течение которого регистрируются межмолекулярные взаимодействия. Энергия связывания (ΔG_{bind}) рассчитана для статистически значимой позиции, полученной в результате процедуры кластеризации фреймов.

Визуальный анализ фреймов МД симуляции комплексов **291-p37** и **297-p37** демонстрирует различное поведение стереоизомеров в сайте связывания (рисунок 3–101). Так, нитрогруппа R-стереоизомера **291** в течение всего времени симуляции экспонирована наружу (рисунок 3–101А), в то время как $-\text{NO}_2$ группа S-стереоизомера **297** погружена в полость сайта (рисунок 3–101Б).

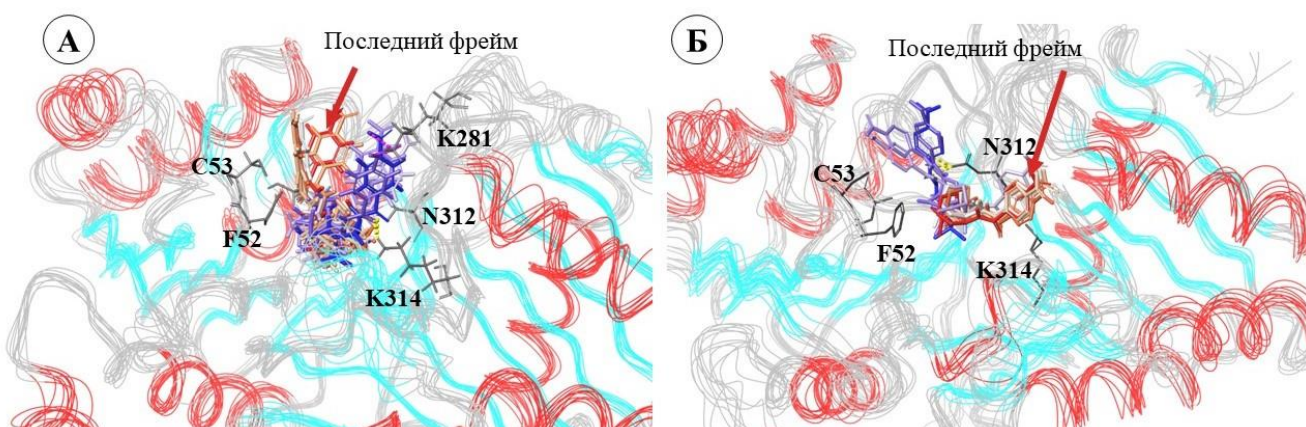


Рисунок 3-101 – Результаты молекулярно-динамических симуляций: наложение геометрических параметров комплексов **291-p37** (А) и **297-p37** (Б) соответствующим 5000 фреймов симуляции с шагом 500.

Анализ результатов молекулярного моделирования в совокупности с данными биологического эксперимента позволяет предположить, что производные (+)-фенхона и (–)-камфоры проявляют противовирусную активность против ортопоквирусов за счет ингибирования высококонсервативного мембранного белка p37 по аналогии с тековириматом (78). Место связывания соединений, как и тековиримата, было выбрано на основании теоретических экспериментов, описанных в данной главе и опубликованных ранее в научных статьях [206,207]. В отсутствии кристаллографических или любых других экспериментальных данных аннотирования комплекса **78-p37**, вопрос связывания тековиримата остается открытым. Тем не менее, наличие корреляции между данными биологического эксперимента и энергии связывания исследуемых соединений **271-305**, анализ поведения молекул **281**, **291** и **297** в полости белка в течение МД симуляций, а также регистрируемые различия в связывании и поведении разных стереоизомеров в сайте связывания позволяют предположить, что биологическая мишень выбрана корректно. Обращает на себя внимание наличие и последовательность расположения фармакофорных признаков соединений лидеров с фармакофорным профилем тековиримата: углеводородная «клетка», донорно-акцепторная часть, ароматическое кольцо и гидрофобный заместитель в *para*-положении для соединений **281**, **288**, **289**, **292**, **295** и **296**, значение IC₅₀ для которых не превышает 2 мМ. В работе [213] обращают внимание на электронные свойства арильного заместителя в *para*-положении в тековиримате: заместитель должен не просто обладать гидрофобными свойствами, но и характеризоваться как акцептор электронной плотности, к которым относят –CF₃, но не галоген-заместители. С этой точки зрения замена арильного заместителя на нитрогруппу вполне себя оправдывает. Кроме того, в работе [213] замена в ароматическом кольце тековиримата –CF₃ группы на –NO₂ снижает значение EC₅₀ (VV) с 0.04 до 0.02 мМ и EC₅₀ (CPXV) с 0.6 до 0.15 мМ. Справедливости ради, следует отметить, что цитотоксичность нитропроизводного в данном случае несколько возрастает. Но оценка параметра цитотоксичности лежит вне границ применимости методов молекулярного докинга и молекулярной динамики.

С учетом сказанного, в качестве соединений-лидеров среди рассмотренных производных (+)-камфоры и (–)-фенхона следует рассматривать структуры, содержащие следующий набор фармакофорных признаков: жесткий гидрофобный каркас, донорно-акцепторную часть, ароматическое кольцо с электроноакцепторным заместителем в *para*-положении. Причем, как показывают результаты молекулярного моделирования, гидрофобная группа –CF₃ может быть успешно заменена на –NO₂, которая при связывании молекул вовлекается в образование водородных связей и/или солевых мостиков с заряженными а.о.

3.6.3. Производные адамантана – ингибиторы p37 [324]

Ряд производных адамантана проявляют активность в отношении ортопоксвирусов штаммов VV и CPXV (рисунок 3–102).

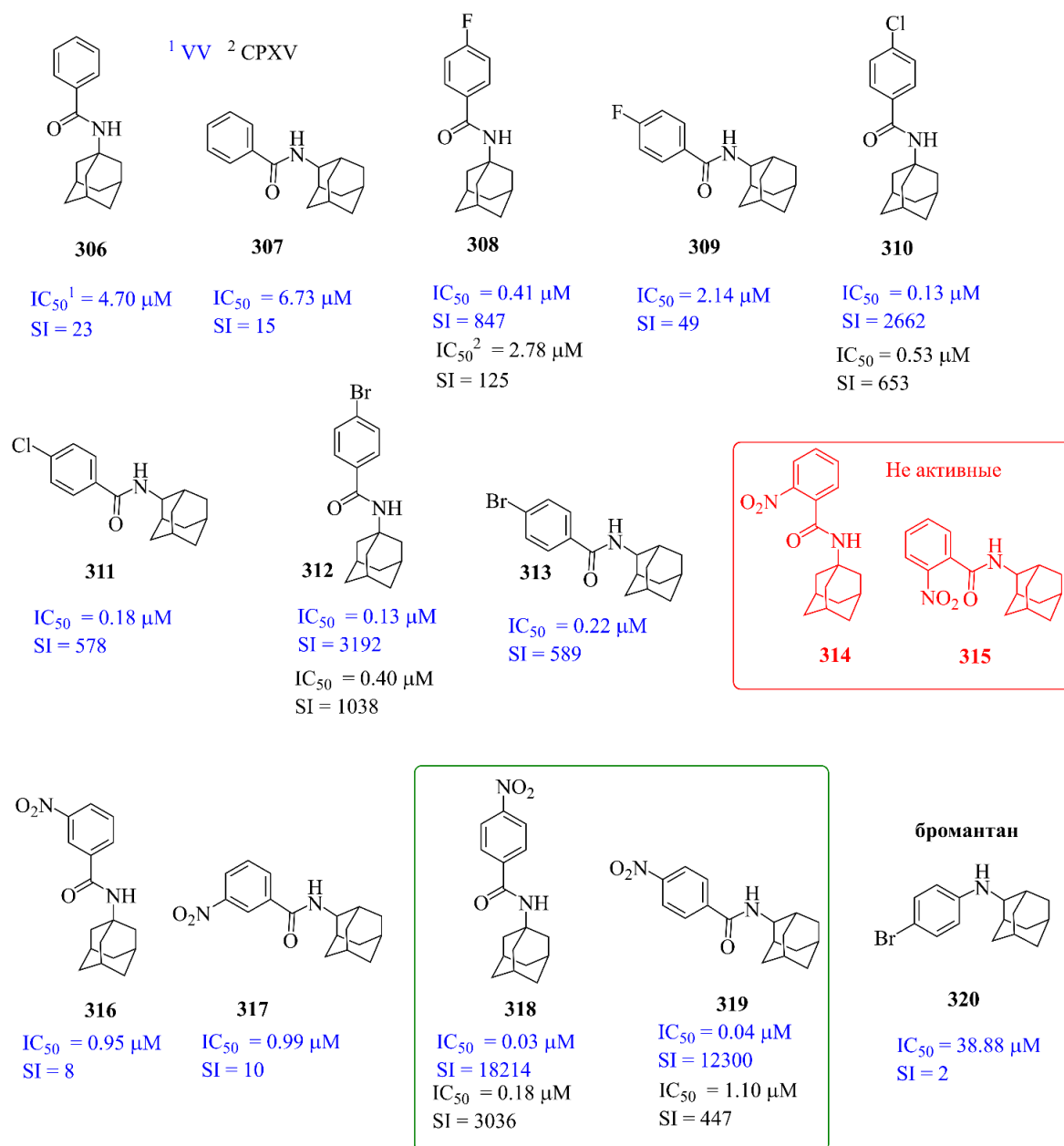


Рисунок 3-102 – Производные адамантана проявляющие активность в отношении ортопоксвирусов штаммов VV и CPXV.

Совокупный анализ результатов исследований, представленных в работах [207,212,213,317], описанный в предыдущем разделе, позволяет предположить, что производные адамантана, соответствующие фармакофорному профилю тековиримата, т.е. содержащие в следующей последовательности признаки: гидрофобная «клетка», донорно-акцепторный фрагмент, ароматическое кольцо и заместитель (рисунок 1–48), могут связываться в фосфолипазном домене мембранного белка p37.

Таблица 3-34 – Результаты процедуры молекулярного докинга производных адамантана **285–299**.

Соединение	pIC50	Кол-во реализованных докинг решений	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD, ккал/моль	Взаимодействие с а.о.			ΔG_{bind} , ккал/моль
						Водородные связи	Другого типа	Стерические затруднения	
306	5.33	16	-6.4	-52.55	-586.52	K314	F52, L118, C120, A134 - гидрофобные	отсутствуют	-35.0
307	5.17	16	-6.4	-55.62	-583.54	K314, N329	F52, L118, C120, A134 - гидрофобные	отсутствуют	-33.1
308	6.39	19	-7.1	-55.50	-590.83	S140, N312	отсутствуют	S135	-41.8
309	5.67	17	-7.5	-60.71	-585.19	S140, N312	A134, A328, L118, C120, F52, C53 – гидрофобные	отсутствуют	-41.5
310	6.87	13	-6.8	-57.95	-586.80	K314	A134, F52, L118, C120 – гидрофобные	отсутствуют	-40.3
311	6.74	18	-7.5	-60.93	-585.75	S140, N312	отсутствуют	отсутствуют	-42.7
312	6.89	18	-6.8	-60.75	-588.59	K314	L118, A328, C120, F55 - гидрофобные	отсутствуют	-41.6
313	6.66	17	-6.4	-59.04	-585.55	K314	A134, F52, L118, C120 - гидрофобные	отсутствуют	-37.1
314	н/а	Докинг-позиции не найдены							
315	н/а	5	-6.4	-56.45	-582.32	K314, N329	A134, F52, L118, C120 - гидрофобные	N321	-20.5

Таблица 3–34 – продолжение

Соединение	pIC50	Кол-во реализованных докинг решений	Docking score	Emodel	IFD, ккал/моль	Взаимодействие с а.о.			ΔG_{bind} , ккал/моль
						Водородные связи	Другого типа	Clash	
316	6.02	18	-6.9	-63.58	-589.40	K314, K281	K281 – солевой мостик A134, F52, L118, C120 - гидрофобные	отсутствуют	-40.0
317	6.00	18	-7.8	-63.12	-589.06	S140, N312	отсутствуют	отсутствуют	-44.4
318	7.52	18	-7.0	-63.66	-588.78	K314	A134, C120, L118, A328 – гидрофобные	отсутствуют	-46.8
319	7.40	18	-7.6	-61.88	-586.72	N312, S140	A134, C120, L118, A328 - гидрофобные	S327	-49.6
320 (бромантан)	4.06	18	-6.6	-50.70	-586.72	отсутствуют	F52, C53, A328 – гидрофобные	T137	-34.7

Для соединений **306–319**, включая иммуноотропный препарат бромантан (**320**), была проведена процедура молекулярного докинга. В качестве максимального количества докинг-решений было указано 20 позиций. Оптимальная докинг-позиция была выбрана на основании ранжирования значений энергетических параметров и визуального фильтрования. Обращали внимание на расположение лигандов относительно ключевых а.о. N312, K314 и S135, а также отсутствие стерических затруднений при расположении лигандов в сайте связывания. Результаты расчетов представлены в [таблице 3–34](#). Все исследуемые соединения, кроме производного **314**, связываются в сайте связывания мембранного белка р37. Соединения-лидеры **318** и **319** характеризуются высокой аффинностью к фосфолипазному домену, в отличие от неактивных ([таблица 3–34](#)). При расположении в сайте связывания большинство лигандов образуют водородную связь с а.о. фосфолипазного домена N312 и/или K314. Адамантановый фрагмент агентов **306–320** расположен рядом с гидрофобными а.о., а именно с F52, C120, L118, A134. Другими словами, расположение исследуемых соединений соответствует расположению тековиримата в р37.

На [рисунке 3–103А](#) представлено расположение в сайте связывания соединения-лидера **318**, характеризующегося самым высоким среди исследуемых адамантанов индексом селективности. Жесткий адамантановый каркас молекулы расположен в полости сайта, содержащей гидрофобные аминокислоты, такие как A134, F52, L118. Донорно-акцепторный фрагмент $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ расположен в непосредственной близости к а.о. фосфолипазного домена. Между карбонильным атомом кислорода и K314 наблюдается образование водородной связи. Нитрогруппа погружена в сайт связывания и расположена рядом с заряженными а.о. K281 и D283, с которыми лиганд может образовать водородные связи и солевые мостики.

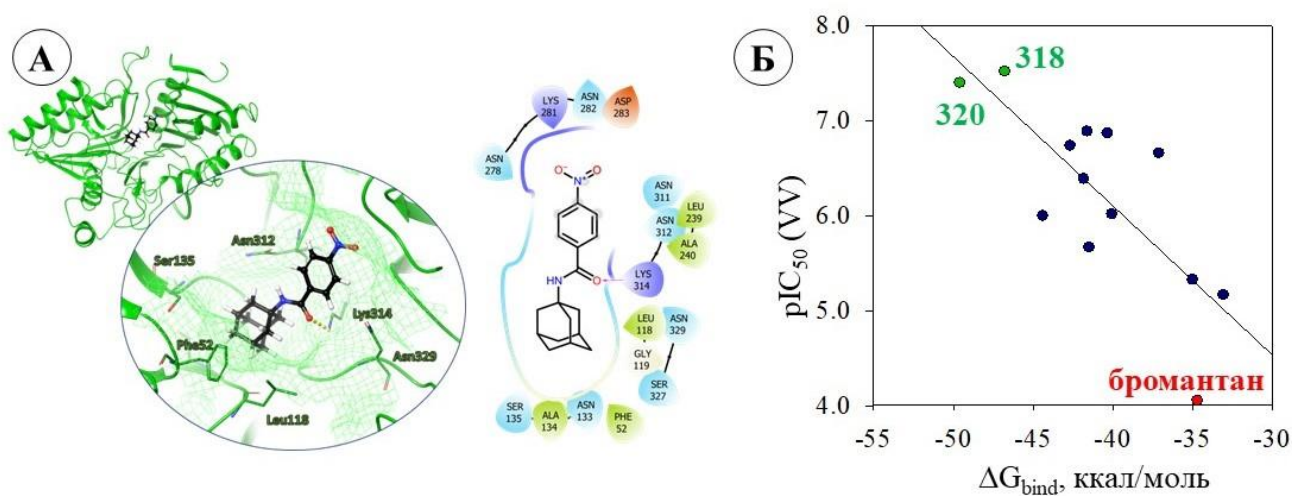


Рисунок 3-103 – Результаты молекулярного докинга производных адамантанов **306–320** в сайт связывания белка р37. А – расположение соединения-лидера **318** в сайте связывания р37, водородная связь показана как желтая прерывистая линия. Б – взаимосвязь результатов расчетов и значений биологических экспериментов

Для оптимальных докинг-позиций оценили энергии связывания (ΔG_{bind}). Значения pIC_{50} , характеризующие противовирусную активность производных адамантана **306–320**, коррелируют со значениями ΔG_{bind} с индексом корреляции равным 0.60 ([рисунок 3–103Б](#)). Результаты молекулярного моделирования находятся в согласии с данными биологических экспериментов.

Таким образом, производные адамантана состоят из фармакофорных признаков, **характерных** для известных ингибиторов р37: тековиримата и производных (+)-камфоры и (–)-фенхона. Соединений **306–320** проявляют противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов за счет ингибирования функции мембранного белка р37.

3.6.4 Построение прогностической модели

Наиболее интересным и желаемым результатом применения теоретических расчетов в ряду биохимических задач является создание прогностической модели, которая позволила бы оценить противовирусную активность ряда соединений до их непосредственного синтеза и биологического эксперимента. Для достижения этой амбициозной цели дополнительно была проведена процедура гибкого молекулярного докинга опубликованных ранее производных адамантана (**83–100**). Структурные особенности соединений представлены на [рисунке 1–49](#). Среди нескольких докинг-решений (не более 10) была выбрана оптимальная позиция, соответствующая взаимодействию атомов лигандов с ключевыми а.о., в совокупности с энергетическими параметрами и расположением арильного заместителя. Результаты молекулярного докинга представлены в [таблице 3–35](#). В отличие от данных, представленных в работе [207], значения docking score расположены в интервале от -5.0 до -8.7 ккал/моль, причем минимальные значения характерны для четырех соединений-лидеров **83**, **86**, **89** и **98**. Данные docking score и binding affinity между собой не коррелируют ([рисунок 3–104А](#)). Основное несоответствие касается соединений **91–94** с менее выраженной активностью: значения binding affinity близки к -9 ккал/моль, а docking score к -5.4 ккал/моль. Для оценки аффинности рассматриваемых соединений в программах AutoDock Vina и Glide используются разные алгоритмы и разные оценочные функции. По этой причине взаимосвязь между энергетическими параметрами стыковки, оцененными разными методами, отсутствует. Программное обеспечение AutoDock основано на ламарковском алгоритме стыковки, в то время как в Glide используется серия иерархических фильтров для поиска возможных местоположений лиганда в области связывания в белке. Кроме того, докинг всех исследуемых производных адамантана был проведен в гибких условиях. Учитывалось влияние лиганда на расположение окружающих его а.о. сайта связывания, а не просто на конформацию боковых цепей, как это происходит в программном обеспечении AutoDock Vina. Подход, используемый в данной работе, позволяет получить более точные позиции стыковки лиганда и белка. Взаимосвязь между результатами

молекулярного докинга, описанного в работе [207], и значениями pIC_{50} характеризующими противовирусную активность производных **83–100**, практически отсутствует (рисунк 3–104Б). Индекс корреляции значений энергетических параметров (docking score), полученных в результате процедуры молекулярного докинга с использованием алгоритма Glide, и pIC_{50} (VV) составляет более 50% (рисунк 3–104Б). Все производные адамантана **83–100** располагаются в сайте связывания практически схожим образом: между карбонильным атомом кислорода (и/или аминогруппой –NH–) и аспарагинами в положениях 312 и/или 329 формируется водородная связь, жесткий адамантановый фрагмент расположен рядом с гидрофобными а.о. A240, L239 и W279, фторметильная группа взаимодействует с F52, C52, L118, C120 и L144. Дополнительно соединения **85**, **87–89** образуют π - π стекинг-взаимодействие с ароматическим кольцом F52, а агент **97** – с H334. Необходимо отметить, что расположение лигандов, соответствующих оптимальным докинг-позициям, полученным в данной работе, несколько отличается от расположения лигандов в сайте связывания, описанных в работе [207].

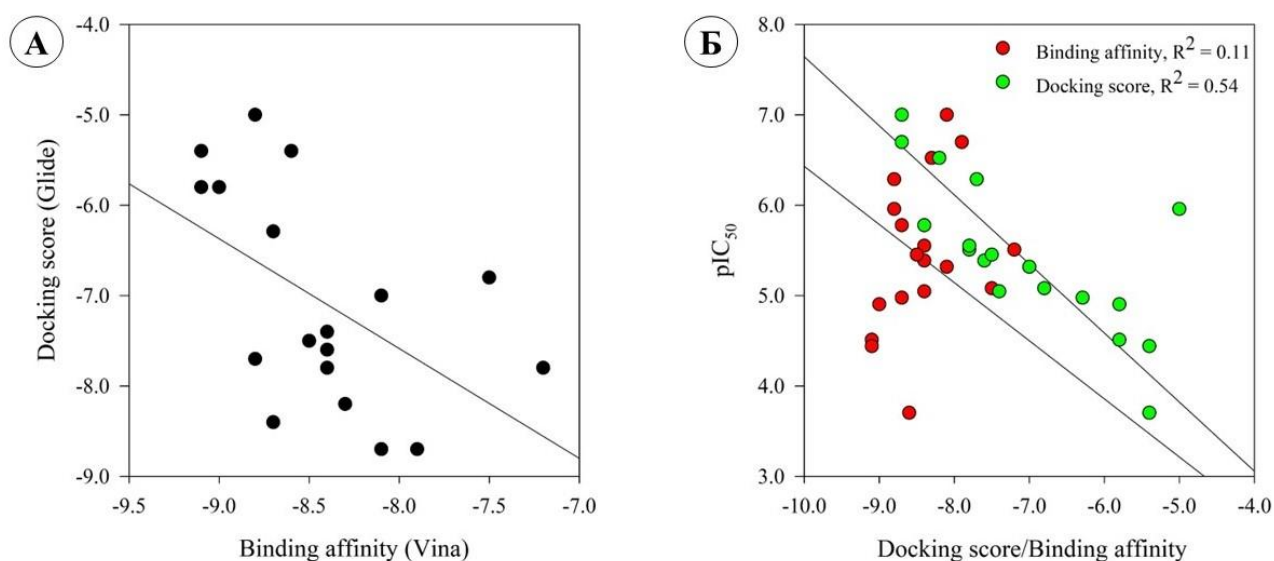


Рисунок 3-104 – Анализ результатов молекулярного докинга: А – взаимосвязь энергетических параметров стыковки производных адамантана **83–100**, описанных в работе [207] и оцененных в результате принудительного молекулярного докинга; Б – взаимосвязь энергетических параметров молекулярного докинга и значений противовирусной активности производных адамантана в отношении ортопоксвируса VV.

Таблица 3-35 – Результаты процедур молекулярного докинга соединений **83-102**, описанных в работе [207]

Соединение	Аффинность к сайту связывания, ккал/моль [207]	pIC50 [207]	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD, ккал/моль	ΔG_{bind} , ккал/моль	Взаимодействие с а.о.
83	-8.1	7.00	-8.7	-63.9	-796.4	-42.17	N312 водородный мостик с NH N329 водородный мостик с O=C C120, L118, F52 гидрофобные с –CF3
84	-8.4	5.36	-7.6	-53.8	-794.85	-35.6	N312 водородный мостик с NH N329 водородный мостик с O=C C120, L118, F52 гидрофобные с –CF3
85	-8.1	5.32	-7.0	-47.4	-791.98	-35.7	N329 водородный мостик с O=C F52 – π - π стекинг C120, L118, F52 гидрофобные с –CF3
86	-8.3	6.52	-8.2	-65.3	-795.13	-42.47	N312 водородный мостик с NH N329 водородный мостик с O=C C120, L118, F52 гидрофобные с –CF3
87	-7.5	5.08	-6.8	-54.4	-794.49	-39.05	N329 водородный мостик с O=C N312 водородный мостик с NH F52 – π - π стекинг C120, L118 гидрофобные с –Br
88	-7.2	5.51	-7.8	-62.3	-795.53	-35.2	N329 водородный мостик с C=O N312 водородный мостик с NH F52 – π - π стекинг C120, L118 гидрофобные с –Br
89	-7.9	6.70	-8.7	-63.9	-796.89	-43.75	N329 водородный мостик с O=C F52 – π - π стекинг C120, L118, F52 гидрофобные с –CF3
90	-8.8	5.96	-5.0	-61.5	-792.80	-35.81	N329 водородный мостик с O=C и NH N312 водородный мостик с NH W279 – гидрофобные со стороны «клетки»

Таблица 3–32 – Продолжение

Соединение	Аффинность к сайту связывания, ккал/моль [207]	pIC50 [207]	Docking score, ккал/моль	Emodel	IFD, ккал/моль	ΔG_{bind} , ккал/моль	Взаимодействие с а.о.
91	-9.1	4.51	-5.8	-50.9	-794.02	-27.10	N329 водородный мостик с O=C W279 – гидрофобные со стороны «клетки»
92	-9.0	4.90	-5.8	-50.2	-793.47	-29.37	N329 водородный мостик с O=C и NH N312 водородный мостик с NH A240, L239, W279 – гидрофобные со стороны «клетки»
93	-9.1	4.44	-5.4	-52.3	-794.54	-29.81	H334, N329 водородный мостик с O=C A240, L239 – гидрофобные со стороны «клетки»
94	-8.6	3.70	-5.4	-47.2	-790.85	-31.93	N279 водородный мостик к атому –N= A240, L239, W279 – гидрофобные со стороны «клетки» –CF3 экспонирован из сайта связывания
95	-8.4	5.55	-7.8	-55.7	-794.17	-34.48	N329 водородный мостик с O=C W279 – гидрофобное взаимодействие со стороны «клетки»
96	-8.5	5.45	-7.5	-56.7	-794.67	-36.54	N329 водородный мостик с O=C A240, L239, W279 – гидрофобные взаимодействия со стороны «клетки»
97	-8.7	4.98	-6.3	-50.7	-793.18	-35.85	H334 π - π стекинг-взаимодействие, W279 – гидрофобное взаимодействие со стороны «клетки»
98	-8.8	6.29	-7.7	-56.3	-794.16	-43.99	N312 водородный мостик с –NH–, N329 водородный мостик с O=C L239, I144, W279 – гидрофобные взаимодействия со стороны «клетки» L118, C120 – со стороны –CF3
99	-8.7	5.78	-8.4	-59.0	-795.36	-36.74	N329 водородный мостик с NH, H334 π - π стекинг-взаимодействие W279 – гидрофобное взаимодействие со стороны «клетки», L116, L118, C120 – со стороны –CF3
100	-8.4	5.05	-7.4	-59.6	-794.49	-35.28	N312 водородный мостик с –NH–, N329 водородный мостик с O=C, метильный фрагмент экспонирован.

На [рисунке 3–105А](#) показана взаимосвязь результатов принудительного молекулярного докинга и данных о противовирусной активности производных адамантана. Темно-синие точки на графике соответствуют производным **83–100**, а светло-синие – производным **306–320**. Можно отметить, что индекс корреляции, характеризующий взаимосвязь аффинности агентов **83–100** к сайту связывания в белке р37, и значений pIC_{50} (VV) выше, чем в случае характерным для агентов **306–320**. Результаты молекулярного моделирования всех производных адамантана **83–100** и **306–320** были объединены с целью построения прогностической модели ([рисунк 3–105Б](#)).

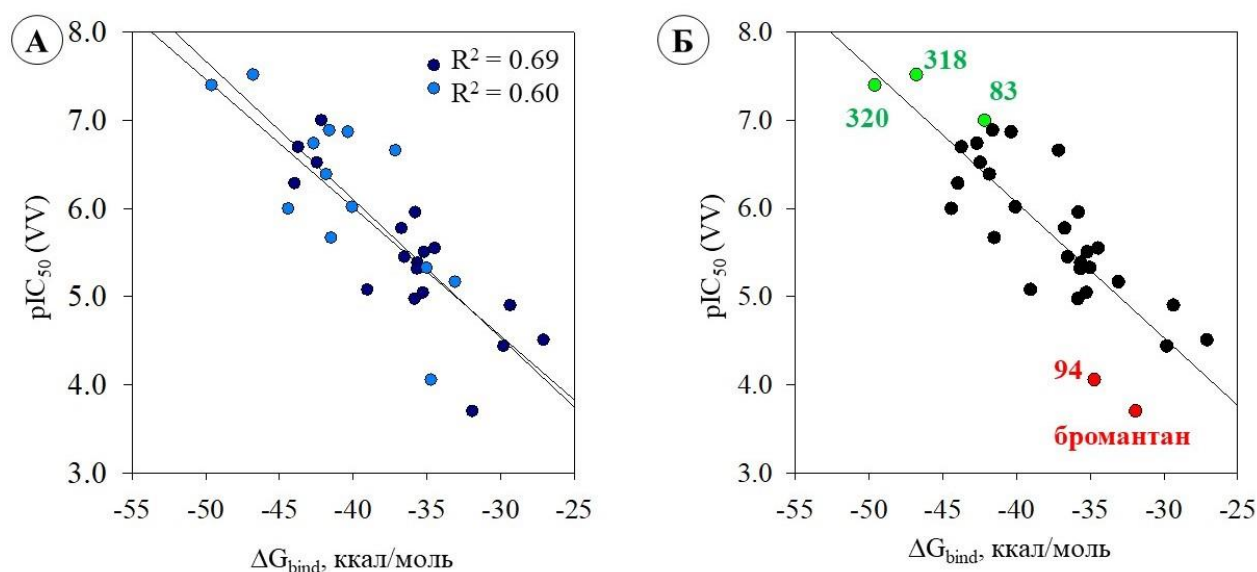


Рисунок 3-105 – Взаимосвязь результатов молекулярного моделирования и данных биологических экспериментов: темно-синие точки ● – соответствуют результатам докинга соединений **83–100**, голубые точки ● – результатам докинга производных адамантана **306–320**.

Полученная математическая модель была проверена следующим образом: в обзоре [212] были выбраны четыре противовирусных агента **321–324**, дополнительно были сгенерированы еще четыре соединения ([рисунк 3–106](#)). В молекулах **321** и **324** была заменена нитрогруппа и атом хлора, соответственно, на $-CF_3$ заместитель, в молекуле **322** атом брома был замещен на нитрогруппу. Соединение **327** было получено путем замены нитрогруппы на фторметильный фрагмент в соединении-лидере **318**. Данных о синтезе и оценке противовирусной активности соединений **325–328** в научных публикациях не было найдено. Возможно, данные соединения были синтезированы и прошли биологические испытания. Другими словами, в рамках данной работы не рассматривается факт уникальности данных соединений.

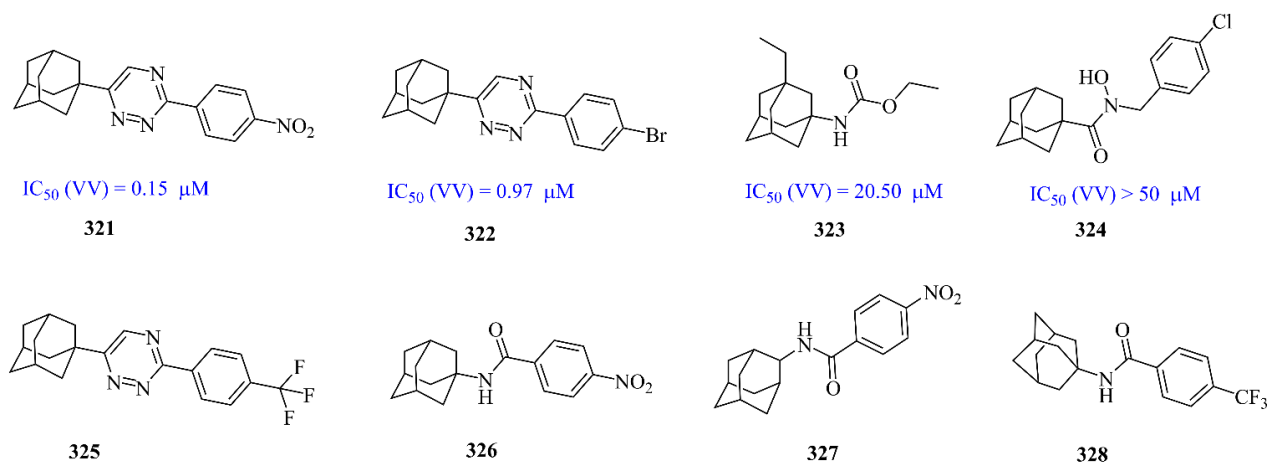


Рисунок 3-106 – Потенциальные ингибиторы р37.

Пройдя этапы подготовки лигандов к расчету, соединения **321–328** были подвержены процедуре молекулярного докинга в фосфолипазный домен белка ортопоксвирусов р37. В качестве референс-соединения был рассмотрен тековиримат. Оптимальная докинг-позиция была выбрана на основании минимального значениями RMSD и ранжирования энергетических параметров, характеризующих аффинность лигандов к сайту связывания. Кроме того, обращали внимание на расположение лиганда в полости белка и характер межмолекулярных взаимодействий между атомами лиганда и а.о. сайта связывания. В результате для каждого лиганда было выбрано 2–4 позиции из 10 возможных, для которых была оценена энергия связывания лиганда и белка (ΔG_{bind}) с использованием диэлектрической модели Борна. Расчеты были проведены в неявном присутствии молекул воды. Используя коэффициенты, полученные в математической модели на [рисунке 3–105Б](#), были оценены значения pIC_{50} и получен некоторый доверительный интервал значений концентраций полумаксимального ингибирования ([таблица 3–36](#)). Кроме того, были рассчитаны среднеарифметические значения pIC_{50} , и была оценена относительная погрешность для соединений **321–324**. Значение погрешности во всех случаях не превышает 8%.

Анализ результатов, представленных в [таблице 3–36](#) позволяют предположить, что модель удовлетворительная. Во всех случаях экспериментальное значение IC_{50} попадает в доверительный интервал. Здесь необходимо отметить несколько важных моментов: как правило, экспериментальные значения ингибирующей активности также представляют собой некоторый доверительный интервал. Результат расчета чувствителен к размеру молекулы: структуры **323**, **324**, **326** и **327** характеризуются достаточно большим предсказанным доверительным интервалом, ввиду меньшего, по сравнению с тековириматом, размера.

Таблица 3-36 – Результаты проверки адекватности прогностической модели.

Соединение	Эксперимент		Теория						
	IC ₅₀ , μМ	pIC ₅₀	ΔG _{bind} , ккал/моль		ΔG _{bind} , ккал/моль	pIC ₅₀	δ, %	Доверительный интервал IC ₅₀ , μМ	
			max	min					
321	0.16	6.80	-39.82	-46.45	-42.00	6.23	8	0.27	1.06
322	0.97	6.01	-38.98	-45.70	-42.24	6.27	4	0.16	1.67
323	20.50	4.69	-28.57	-35.42	-32.73	4.69	3	5.71	48.60
324	50.03	4.30	-26.45	-36.36	-31.15	4.87	7	84.0	126.62
325	н/д	–	-40.08	-42.82	-41.67	6.18	–	0.44	10.14
326	н/д	–	-32.14	-51.26	-41.52	6.16	–	0.02	17.74
327	н/д	–	-32.52	-42.42	-38.09	5.64	–	0.51	15.56
328	н/д	–	-31.48	-49.86	-37.71	5.58	–	0.04	17.64

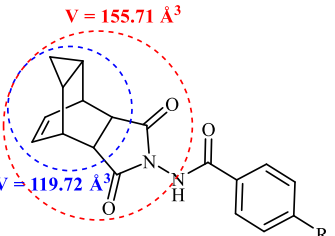
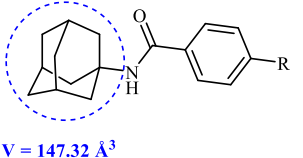
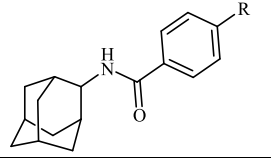
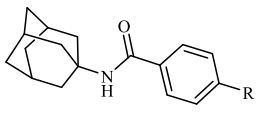
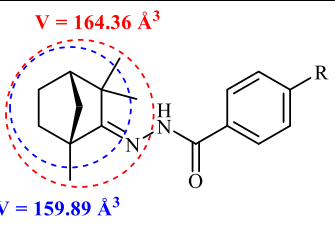
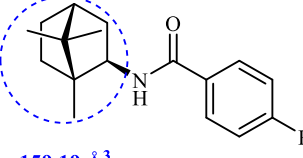
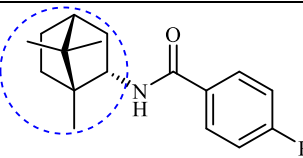
В целом данный результат следует рассматривать в качестве первого, или предварительного, этапа для создания предсказательных моделей. Тем не менее, такой подход, очевидно, работает, но имеет ряд ограничений. Во-первых, для создания адекватной математической модели требуется максимально большое количество соединений со схожим фармакофорным профилем и достоверными значениями ингибирующей активности. В идеальном варианте это значение должно соответствовать ингибированию конкретной биологической мишени, что в рамках противовирусных задач кажется малореальным. Во-вторых, требуется четкое обоснование выбора биологической мишени. В-третьих, крайне важно подобрать корректный протокол молекулярного докинга. Референсная позиция должна быть, как минимум, минимизирована методами молекулярной динамики. И, наконец, выбор оптимальной позиции должен быть основан на положении лиганда в сайте связывания, характере взаимодействий с ключевыми а.о., в совокупности с минимальными значениями энергетических параметров. Строить модель зависимости pIC₅₀ от значения балла стыковки можно, но использование ее в предсказательных целях сомнительно. Необходимы дополнительные расчеты энергии связывания при определенных настройках алгоритма расчета. И самое главное, результатом предсказания должен быть именно доверительный интервал, учитывая точность расчетов методами силовых полей.

3.6.4. Фармакофорная модель ингибитора p37

Анализ научной литературы и результаты молекулярного моделирования позволяют провести разбор структурных и фармакофорных особенностей малых молекул (таблица 3–37). Структура ингибитора p37 должна содержать гидрофобный углеводородный каркас, который

укладывается в гидрофобную полость белка, окруженную рядом а.о. таких как F52, C53, L118, C120, L144, L239.

Таблица 3-37 – Структурные особенности ингибиторов p37

Структура ¹ , заместитель R =	–H	–F	–Cl	–Br	–CF ₃	–NO ₂	Значения
 $V = 155.71 \text{ Å}^3$ $V = 119.72 \text{ Å}^3$	н/д	н/д	0.02	0.02	0.04	0.02	IC ₅₀ , μM [213]
	н/р	н/р	н/р	н/р	-51.19	н/р	ΔG_{bind} , ккал/моль ²
 $V = 147.32 \text{ Å}^3$	н/д	н/д	н/д	0.02	0.10	0.70 ³	IC ₅₀ , μM [207]
	н/р	н/р	н/р	н/р	-42.17	-41.52 ³	ΔG_{bind} , ккал/моль
	н/д	н/д	н/д	3.10	0.20	2.27	IC ₅₀ , μM [207]
	н/р	н/р	н/р	-35.20	-43.75	-38.09	ΔG_{bind} , ккал/моль
	4.70	0.41	0.13	0.13	2.59	0.03	IC ₅₀ , μM [324]
	-35.03	-41.85	-40.37	-41.63	-37.71	-46.80	ΔG_{bind} , ккал/моль
 $V = 164.36 \text{ Å}^3$ $V = 159.89 \text{ Å}^3$	16.5	9.7	0.9	2.2	5.0	5.0	IC ₅₀ , μM [317]
	-21.0	-24.08	-46.34	-28.05	-27.90	-34.55	ΔG_{bind} , ккал/моль
 $V = 159.19 \text{ Å}^3$	н/д	14.9	0.6	1.4	0.6	0.9	IC ₅₀ , μM [317]
	н/р	-23.68	-27.92	-38.46	-30.66	-32.19	ΔG_{bind} , ккал/моль
 $V = 159.19 \text{ Å}^3$	н/д	н/д	0.24	0.36	×	0.03	IC ₅₀ , μM [317]
	н/р	н/р	-35.98	-41.09	×	-44.94	ΔG_{bind} , ккал/моль

¹ оцененный объем «клетки» с заместителем, включающим азот (красный круг), только углеводородной «клетки» (синий круг);

² значения энергии связывания, полученные в результате молекулярного моделирования;

³ предсказанное значение IC₅₀ по математической модели на рисунке 3-104Б;

⁴ средневзвешенное значение энергии связывания

н/д – нет данных; н/р – не рассчитывали

При этом размер «клетки», вероятно, имеет значение. Так, объем жесткого каркаса тековиримата, содержащего только углеводородную «клетку» (в [таблице 3–37](#) этот фрагмент молекулы выделен синим кругом), составляет $119.72 \text{ \AA}^3$. Среди рассматриваемых каркасных соединений, наиболее близким по объёму является каркас адамантана, равный $147.32 \text{ \AA}^3$. Объемы «клетки» (+)-камфоры и (–)-фенхона чуть более $159 \text{ \AA}^3$. Если в рассматриваемую жесткую «клетку» тековиримата включить пирролидиновый фрагмент (в [таблице 3–37](#) эта часть молекулы выделен красным кругом), то объем данного скаффолда составляет уже $155.71 \text{ \AA}^3$, что ближе по значению объемов, характерных для производных (+)-камфоры и (–)-фенхона. В данном случае учитывается только факт размерности, но не рассматривается фармакофорный профиль жесткого каркаса. Очевидно, что у тековиримата атомы пирролидинового фрагмента могут участвовать в образовании межмолекулярных взаимодействий с полярными и/или заряженными аминокислотами сайта связывания. Например, карбонильный кислород фрагмента образует водородную связь с K312, а.о. фосфолипазного домена. В случае производных адамантана ключевую роль в активности соединений в отношении ортопоксвирусов, вероятно, играет расположение заместителя «клетки». Так, производные 1-адамантана проявляют выраженную активность против вируса, в отличие от производных 2-адамантана. Среди производных (+)-фенхона и (–)-камфоры, S-стереоизомеры производных (+)-фенхона наиболее активные, чем R-стереоизомеры. На примере тековиримата природа арильного заместителя в 4-положении в ряду $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{NO}_2$ практически не оказывает влияния на значение IC_{50} . В случае производных адамантанов, (–)-фенхона и (+)-камфоры, наиболее активны те структуры, у которых есть такие же, как и у тековиримата, заместители. Необходимо также отметить два противовирусных агента, биологическая активность и значения энергии связывания с p37 которых соизмеримы с показателями, характерными для тековиримата. Это S-стереоизомер производного (+)-камфоры **297** и 1-адамантановое производное **318**, содержащие $-\text{NO}_2$ группы в положении 4 ароматического кольца.

С учетом сказанного можно сделать следующий вывод: соединения, содержащие жесткий каркас (адамантановый или (+)-камфоры), и схожий с тековириматом фармакофорный профиль, проявляют выраженную противовирусную активность за счет ингибирования мембранного белка p37. Соединения связываются в полости белка таким образом, чтобы жесткий гидрофобный каркас клетки был расположен вблизи гидрофобных а.о., таких как фенилаланин, лейцин, аланин. Донорно-акцепторный фрагмент $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ должен быть расположен рядом с а.о. фосфолипазного домена N312, K314 и/или S135, S140. Арильный заместитель в *пара*-положении должен быть погружен в полость сайта связывания. При этом допускается замена

электроноакцепторной гидрофобной группы $-\text{CF}_3$ на $-\text{NO}_2$ без существенного изменения энергетических параметров связывания и ингибирующей концентрации.

3.7. Методология расчета, или как правильно моделировать вирусные белки

Данный раздел посвящен рекомендациям адекватного применения методов молекулярного моделирования, которые, безусловно, необходимы для обоснованного выбора мишени, описания механизма противовирусного действия исследуемых соединений, создания прогностической модели и рекомендаций для структурной модификации лигандов с целью повышения их противовирусной активности. Все теоретические расчеты должны быть дополнены результатами биологических экспериментов.

С чего начинается стадия молекулярного моделирования или, другими словами, когда необходимо начинать привлекать теоретические расчеты? Ответ на этот вопрос зависит, прежде всего, от постановки задачи. В данной работе, во всех рассматриваемых примерах первичным этапом является лиганд (рисунки 3–107, блок лиганд): синтезированный ряд малых молекул с общим скаффолдом. В данных примерах не будет рассматриваться вопрос, почему синтезируются именно эти соединения. Кажется логичным начинать разработку новых (например, противовирусных) соединений *de novo*, исходя из фармакофорного профиля именно сайта связывания ингибиторов того или иного вирусного белка. Однако, как показывает практика и глубокий анализ литературных данных, место связывания ингибиторов мембранных вирусных белков – вопрос достаточно сложный и спорный. Как минимум по этой причине изначально синтезированные лиганды проходят биологические эксперименты для определения их противовирусной активности и цитотоксичности. Теоретически на данном этапе исследования можно провести анализ структура-активность и, опираясь на опыт и химическую интуицию, предложить структурную модификацию рассматриваемых соединений. Далее следует синтезировать новые соединения и проверить их биологическую активность. Эти манипуляции можно продолжать до тех пор, пока не получится желаемый результат. Опустим здесь вопрос о временных и финансовых затратах.

Выбор и обоснование выбора биологической мишени (рисунки 3–107, блок белок) являются едва ли не самыми важными этапами исследования противовирусной (да и любой другой) активности исследуемых соединений. Сузить круг потенциальных мишеней позволяет ряд биологических экспериментов, одним из которых является эксперимент по времени добавления. Фактически изучение механизма противовирусной активности методами молекулярного моделирования без результатов данного эксперимента – задача достаточно трудоемкая и, вероятно, бессмысленная. Теоретически, ингибируя любой вирусный белок малыми молекулами, можно подавить вирусную инфекцию. Однако процесс выбора белка с

помощью процедур молекулярного докинга и динамики требует большого количества времени и, учитывая границы применимости методов молекулярного моделирования, не исключает ошибочных выводов. Этот тезис еще раз подчеркивает необходимость совокупного исследования: *in vitro* ↔ *in silico*. Дополнительные биологические эксперименты, такие как мутагенез, использование псевдовиральных систем и прочие тесты, позволяют уточнить выбор потенциальной биологической мишени. При этом описать механизм противовирусного действия на данном этапе достаточно сложно, как и предложить варианты структурной модификации лигандов с целью повышения их противовирусной активности. Основная проблема заключается в месте связывания потенциальных ингибиторов вирусных белков. На данном этапе необходимо подключать методы молекулярного моделирования с целью обоснования выбора биологической мишени как минимум, и/или создания прогностической модели, как максимум.

Использование методов молекулярного моделирования начинается с момента поиска геометрических параметров биологической мишени в соответствующих базах данных. Далее следует анализ структурных и функциональных особенностей белка, поиск возможных ошибок в структуре, исправление их и подготовка протеина к расчетам. В случае отсутствия геометрических параметров белка в базе данных возникает вопрос об использовании различных методов предсказания третичной структуры белка. В данной случае не заостряется внимание на выборе программного обеспечения. Этот выбор всегда остается за исследователем с учетом его компетенций и возможностей.

Далее следует анализ результатов доступных биологических экспериментов, который в совокупности с пониманием функциональных особенностей белка, позволяет сделать выбор в пользу потенциального места связывания. Здесь можно приступить к выбору алгоритма молекулярного докинга. Обсуждать тонкие настройки алгоритма расчета бессмысленно, так как это зависит от конкретной биологической задачи и структурных особенностей белка и лиганда. В любом случае алгоритм и протокол молекулярного докинга должен быть обоснован. Это можно сделать на основании процедур ре-докинга структур-референсов и сравнения полученных в результате расчета геометрических параметров лиганд-белкового комплекса с данными расшифрованными экспериментальными методами (РСА, ЭМ и другие). В случае отсутствия соединений-референсов, результаты молекулярного докинга должны находиться в согласии с результатами уже известных биологических экспериментов и функциональных особенностей белка. Оптимальная докинг-позиция, для последующих уточняющих расчетов, может быть выбрана на основании визуального фильтрации, или с помощью дополнительных расчетов, например, методами метадинамики. Далее можно оценить энергию лиганда и белка для поиска взаимосвязи между результатами расчета и экспериментальными данными. Молекулярно-

динамические симуляции лиганд-белковых комплексов позволяют оценить степень влияния лиганда на вторичную структуру белка.

Анализ результатов теоретического эксперимента должен проводиться в совокупности с данными биологических тестов с учетом особенностей биологической функции белка. Если результаты адекватные, то их можно использовать для описания механизма биологической активности лигандов, создания рекомендаций для структурной модификации и создания прогностической модели. Необходимо отметить, что полученные в результате структурной модификации новые лиганды должны снова пройти процедуры молекулярного докинга и динамики. А для создания прогностических моделей требуется достаточно большое количество лигандов с достоверно определенными значениями биологической активности. Если результаты молекулярного моделирования не согласуются с результатами биологических экспериментов, то необходимо пересмотреть либо выбор места связывания потенциальных лигандов в белке, либо выбранную биологическую мишень. В таком случае встает вопрос о необходимости привлечения дополнительных биологических экспериментов. Или, поиск ошибок в теоретическом расчете, начиная со стадии выбора алгоритма и настройки протокола молекулярного докинга.

Таким образом вдумчивый и осмысленный подход, включающий в себя анализ результатов биологических экспериментов, исследование функциональных особенностей рассматриваемого белка, а также скрупулёзный анализ теоретических расчетов, без сомнения гарантируют успешный результат.

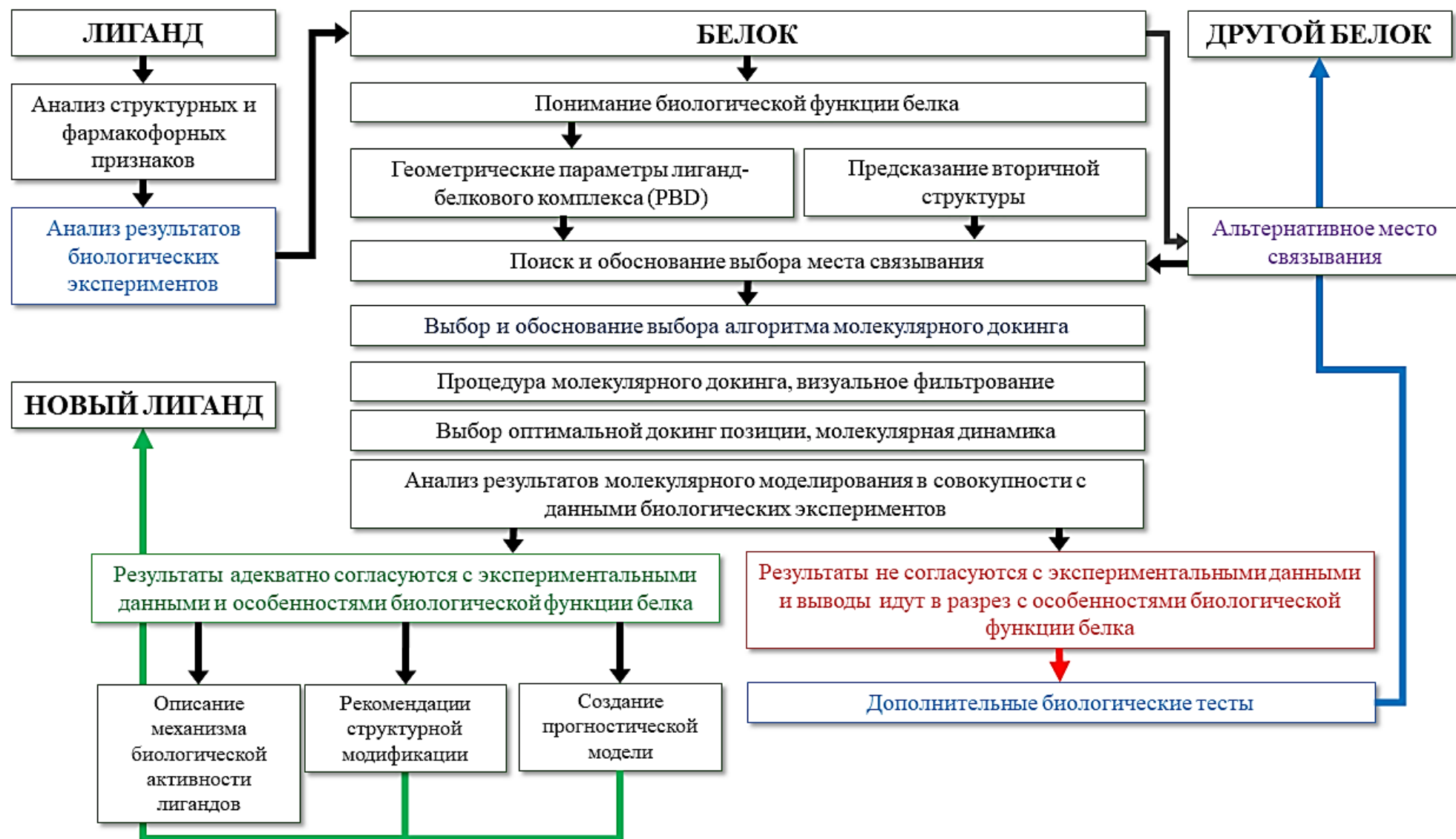


Рисунок 3-107 – Методология молекулярного моделирования

4. ВЫВОДЫ

В рамках данной диссертационной работы:

Впервые описан фармакофорный профиль альтернативного сайта связывания каркасных производных на основе терпеновых соединений – ингибиторов гемагглютинаина вируса гриппа, расположенный в области пептида слияния. Показано, что данная полость предпочтительна для связывания малых молекул объемом не более $300\text{\AA}^3$, содержащих жесткий гидрофобный каркас и полярный заместитель. Связывание малых молекул в месте протеолиза энергетически стабилизирует конформацию белка, что затрудняет его последующие конформационные перестройки и препятствует слиянию вирусных и клеточных мембран.

Впервые математически обосновано, что снижение патогенности камфецин-резистентного штамма вируса гриппа может быть связано с влиянием камфецина на структуру гемагглютинаина. Аминокислотная замена V615L в месте протеолиза стабилизирует префузионную конформацию белка и энергетически затрудняет дальнейшие конформационные перестройки. Описан энергетический профиль конформационных переходов гемагглютинаина вируса гриппа дикого типа и камфецин-резистентного штамма при различных значениях pH среды.

Впервые собраны и представлены геометрические параметры полноразмерного протонного M2 канала вируса гриппа. Предполагается, что каркасные производные терпеновых соединений, среди которых камфецин и гинсамид, подавляют фузогенную активность гемагглютинаина за счет связывания со стеблевой частью домена белка, а также могут блокировать ионную проводимость протонного M2 канала.

Определен вероятный сайт связывания ингибиторов S-белка SARS-CoV-2, подавляющих фузогенную активность белка. Описан фармакофорный профиль полости, расположенной рядом с пептидом слияния в области гептадных повторов. Показано, что связывание умифеновира происходит со второй субъединицей белка и оказывает на вторичную структуру доменов белка.

Описан механизм противовирусной активности производных эфиров (–)-борнеола, заключающийся в подавлении фузогенной активности поверхностного вирусного белка SARS-CoV-2 за счет связывания в месте пептида слияния. Результаты расчетов полностью согласуются с экспериментальными данными.

Определен вероятный сайт связывания производных усниновой кислоты, расположенный в N-терминальном домене S-белка SARS-CoV-2. Описан фармакофорный профиль сайта и, на основании результатов молекулярного моделирования, выдвинуто предположение, что

противовирусная активность производных усниновой кислоты, вероятно, связана влиянием на функцию N-терминального домена, что может приводить к подавлению активности S-белка.

Проведенный анализ фармакофорного профиля сайта связывания ингибиторов F-белка респираторно-синцитиального вируса позволил объяснить противовирусную активность производных фенилкумаринов и *N*-содержащих эфиров (–)-борнеола, которая может быть связана с влиянием малых молекул на F-белок. Впервые для этой группы соединений и этой мишени даны рекомендации по структурной модификации исследуемых лигандов с целью увеличения аффинности к сайту связывания ингибиторов F-белка.

Согласно результатам молекулярного моделирования, бициклический каркас производных камфена обеспечивает эффективное связывания с гидрофобными полостями сайтов связывания в гемагглютанине вируса гриппа и гликопротеине вируса Эбола. Активация обоих поверхностных белков происходит при пониженных значениях pH среды. Дальнейший поиск новых аналогов, в том числе этих двух структурных фрагментов, может привести к открытию нового ингибитора, нацеленного на стадию слияния мембран и обладающего широким спектром противовирусной активности.

Показано, что малые молекулы, объемом до $350\text{\AA}^3$ и количеством атомов порядка 70, содержащие жёсткий гидрофобный фрагмент, акцепторную группу и протонированный атом азота могут одновременно связываться в сайтах связывания ингибиторов поверхностных белков I типа: а именно гемагглютинаина вируса гриппа, S-белка SARS-CoV-2, F-белка респираторно-синцитиального вируса и гликопротеина вируса Эбола. Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что механизм противовирусной активности этих соединений, вероятно, заключается, в подавлении фузогенной активности упомянутых вирусных белков.

Производные (+)-камфоры и (–)-фенхона проявляют противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов за счет возможного ингибирования мембранного белка p37. Соединения связываются в области фосфолипидного домена и оказывают влияние на вторичную структуру белка.

Представлена прогностическая модель для оценки биологической активности производных адамантана – ингибиторов мембранного белка ортопоксвирусов p37. Показано, что для создания подобной модели требуется достаточно большое (не менее 35) количество соединений с достоверно определенными значениями биологической активности. Методы молекулярного моделирования для оценки энергии связывания должны включать в себя совокупные результаты молекулярно-динамических симуляций для определения референсной докинг-позиции и процедуры гибкого молекулярного докинга с последующей оценкой энергии связывания.

5. ПРИЛОЖЕНИЯ

5.1. Лиганд-белковые комплексы

Таблица 5-1 – PDB коды комплексов, рассматриваемых в данной работе мембранных вирусных белков с лигандами.

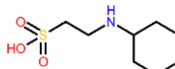
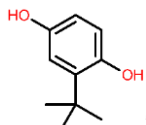
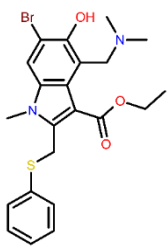
PBD ID	Штамм вируса	Лиганд	Место связывания	Литература
Гемагглютинин				
6CF5	A/Viet Nam/1203/2004 (H5N1)	 N-циклогексилтаурин	Сайт связывания рецептора HA ₁	[25]
6CEX	A/Hong Kong/1/1968 (H3N2)		Сайт связывания рецептора HA ₁	
			Стеблевая часть HA ₂ , гидрофобная полость между короткой и длинной α-спиралями двух протомеров HA ₂	
3EYM	A/Aichi/2/1968 (H3N2)	 ТБГХ	Стеблевая часть HA ₂ , гидрофобная полость между короткой и длинной α-спиралями двух протомеров	[28]
3EYK	A/Mallard/Astrakhan/244/1982 (H14N6)			
5T6N	A/HongKong/1/68 (H3N2)	 Арбидол	Стеблевая часть HA ₂ , гидрофобная полость между короткой и длинной α-спиралями двух протомеров	[50]
5T6S	A/ Shanghai/2/13 (H7N9)			
5W6U	A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	Циклический пептид P2	Высоко консервативный эпитоп стеблевой части домена	[63]
5W6I		Циклический пептид P3		
5W5U		Циклический пептид P4		
5W5S		Циклический пептид P5		
5W6R		Циклический пептид P6		
5W6T		Циклический пептид P7		

Таблица 5–1 – Продолжение

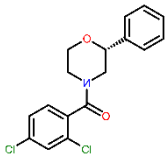
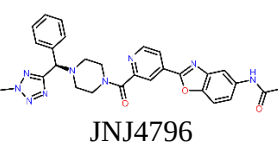
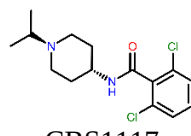
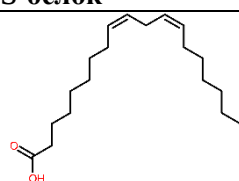
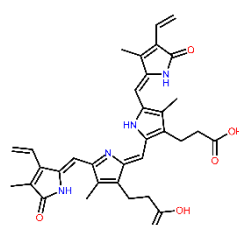
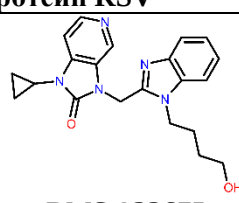
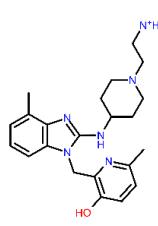
PBD ID	Штамм вируса	Лиганд	Место связывания	Литература
Гемагглютинин				
6WCR	A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	 F0045(S)	Высоко консервативный эпитоп стеблевой части домена	[67]
6CF7	A/Solomon Islands/3/06 (H1N1)	 JNJ4796	Высоко консервативный эпитоп стеблевой части домена	[65]
6CFG	A/Vietnam/1203/04 (H5N1)			
6VMZ	A/Chicken/Vietnam/30/03(H5N1)	 CBS1117	Высоко консервативный эпитоп стеблевой части домена	[68]
S-белок				
6ZB4	SARS-CoV-2 (WT, Wuhan)	 Линолевая кислота	Гидрофобный карман в РСД S ₁	[85]
7OD3	SARS-CoV-2 (Alfa B.1.1.7, UK)			
7B62	SARS-CoV-2 (WT, Wuhan)	 Биливердин	N—концевой домен S ₁ SARS-CoV-2 (аминокислоты с 14 по 330)	[84]
7NT9			N—концевой домен S ₁ SARS-CoV-2 (аминокислоты с 14 по 1139)	
7C53	SARS-CoV-2 (WT, Wuhan)	Пептид EK1	HR1	[116]
5ZVK	MERS-CoV	Пептид EK1	HR1	[115]
F-протеин RSV				
5EA7	Human RSV A2	 BMS-233675	Гидрофобная полость внутри тримера между FP и HRB	[127]
5EA3	Human RSV A2	 JNJ-240868	Гидрофобная полость внутри тримера между FP и HRB	[127]

Таблица 5–1 – Продолжение

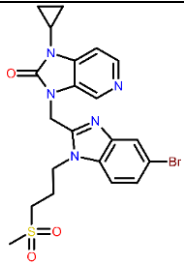
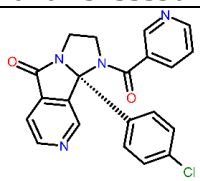
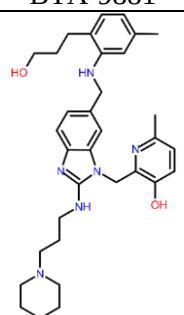
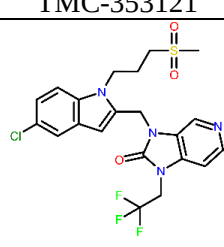
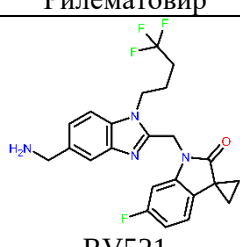
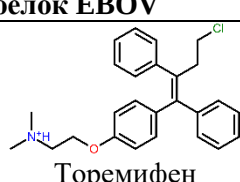
PBD ID	Штамм вируса	Лиганд	Место связывания	Литература
F-протеин RSV				
5EA4	Human RSV A2	 JNJ-49153390	Гидрофобная полость внутри тримера между FP и HRB	[127]
5EA6	Human RSV A2	 BTA-9881	Гидрофобная полость внутри тримера между FP и HRB	[127]
5EA5	Human RSV A2	 TMC-353121	Гидрофобная полость внутри тримера между FP и HRB	[127]
5KWW	Human RSV A2	 JNJ-53718678 Рилематовир	Гидрофобная полость внутри тримера между FP и HRB	[140]
7KQD	Human RSV A2	 RV521 Сисунатовир	Гидрофобная полость внутри тримера между FP и HRB	[141]
GP-белок EBOV				
5JQ7	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)	 Торемифен	Гидрофобный туннель DFF	[151]

Таблица 5–1 – Продолжение

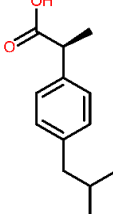
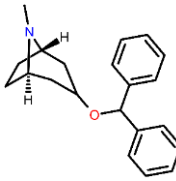
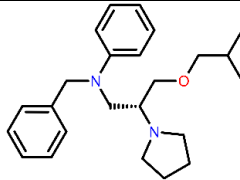
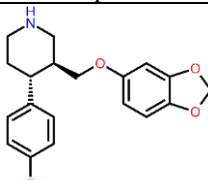
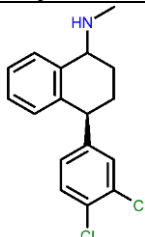
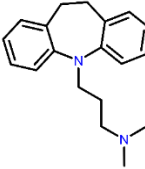
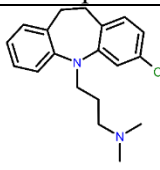
PBD ID	Штамм вируса	Лиганд	Место связывания	Литература
GP-белок EBOV				
5JQB	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)	 Ибупрофен	Гидрофобный туннель DFF	[151]
6F6S	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)	 Бензитропин	Гидрофобный туннель DFF	[163]
6F5U	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)	 Бепридил	Гидрофобный туннель DFF	[163]
6F6I	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)	 Пароксетин	Гидрофобный туннель DFF	[163]
6F6N	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)	 Сертралин	Гидрофобный туннель DFF	[163]
6G9B	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)	 Имипрамин	Гидрофобный туннель DFF	[160]
6G9I	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)	 Кломипрамин	Гидрофобный туннель DFF	[160]

Таблица 5–1 – Продолжение

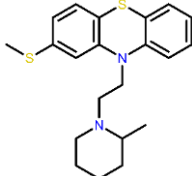
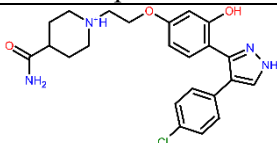
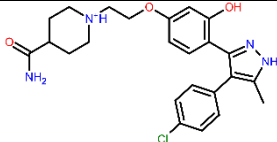
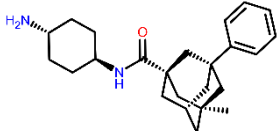
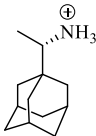
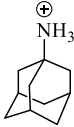
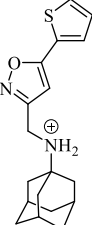
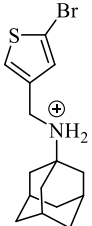
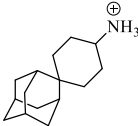
PBD ID	Штамм вируса	Лиганд	Место связывания	Литература
GP-белок EBOV				
6G95	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)	 Тиоридазин	Гидрофобный туннель DFF	[160]
6HS4	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)		Гидрофобный туннель DFF	[165]
6HSO	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)		Гидрофобный туннель DFF	[165]
6NAE	Zaire ebolavirus (штамм Mayinga-76)		Гидрофобный туннель DFF	[166]

Таблица 5-2 – PDB коды комплексов ТМД М2 канала с малыми молекулами

Структура соединения	Активность (TEVC)	PDB код	Штамм вируса	Форма канала (место связывания)
	91% WT 13% S31N [184]	2RLF [177]	A/H3N2/Udon/307/72 WT (S31)	Закрытая (внешняя часть ТМД ближе к С-концу)
		6BKL [194]	A/H5N1/Goose/Guangdong/1/1996 WT (S31)	Закрытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
		6BOC [194]		Открытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
		6BKL [194]		Закрытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
		6BOC [194]		Открытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
		6BKL [194]		Открытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
	91% WT 36% S31N [184]	3C9J [181]	A/H5N1/Hong Kong/156/1997 WT (S31)	Открытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
		2KAD [325]	A/H5N1/Hong Kong/156/1997 WT (S31)	Открытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
		2KQT [246]	A/H3N2/Udon/307/72 WT (S31)	Закрытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
		6BKK [194]	A/H5N1/Goose/Guangdong/1/1996 WT (S31)	Закрытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
	11% WT 90% S31N [184,185]	2LYO [184]	A/H3N2/Chiba/5/71 S31N	Закрытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
	76% S31N	2MUW	A/H3N2/Hong Kong/2005 S31N	Закрытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
	77% WT S31	2MUV	A/H3N2/Hong Kong/2005 WT (S31)	Закрытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
	87.5% S31N-V27A 70% WTS31 [187,326]	6BMZ [194]	A/H5N1/Goose/Guangdong/1/1996 WT (S31)	Закрытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
		6NV1 [193]	A/H5N1/Indonesia/2007 WT (S31)	Закрытая (внутри ТМД ближе к N-концу)
		6OUG [193]	A/H3N2/Memphis/1/1971 V27A	Закрытая (внутри ТМД ближе к N-концу)

5.2. Анализ молекулярно-динамических симуляций

5.2.1. Протонный M2-канал вируса гриппа

Камфецин – M2 канал

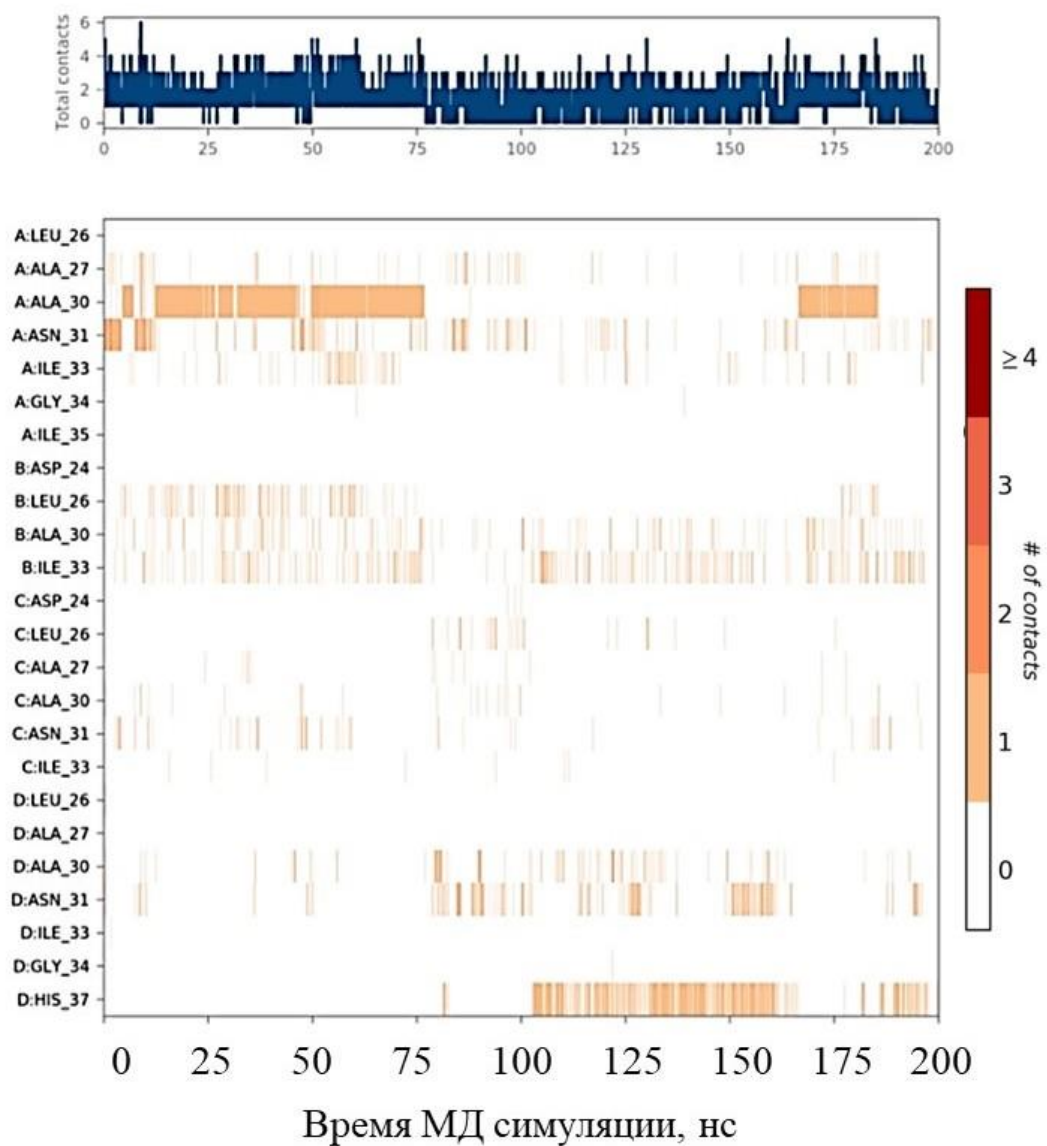


Рисунок 5-1 – Количество межмолекулярных контактов между атомами камфецина и а.о. сайта связывания, регистрируемые в течение всего времени симуляции

Гинсамид – M2 канал

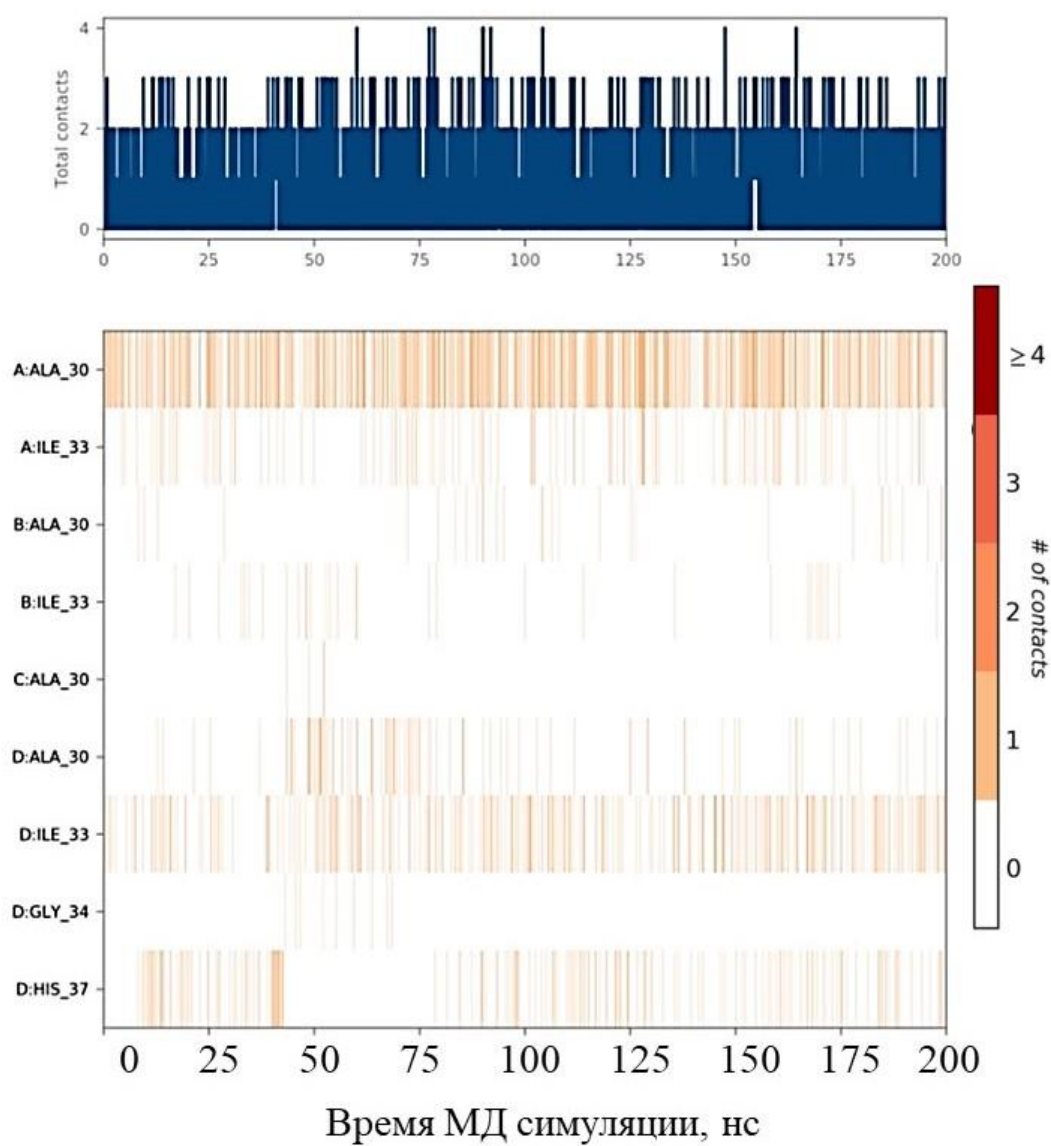


Рисунок 5-2 – Количество межмолекулярных контактов между атомами гинсамида и а.о. сайта связывания, регистрируемые в течение всего времени симуляции

5.2.2. Поверхностный S-белков вируса SARS-CoV-2

Представлены результаты молекулярно-динамических симуляций в течение 300 нс при 310 К для ряда мультилигандных систем: А – РСД и комплекс РСД-АПФ2 в присутствии 1 молекулы Умифеновира (Арбидола); Б – в присутствии 5 молекул; В – присутствии 10 молекул лиганда; Г – в присутствии 15 молекул лиганда.

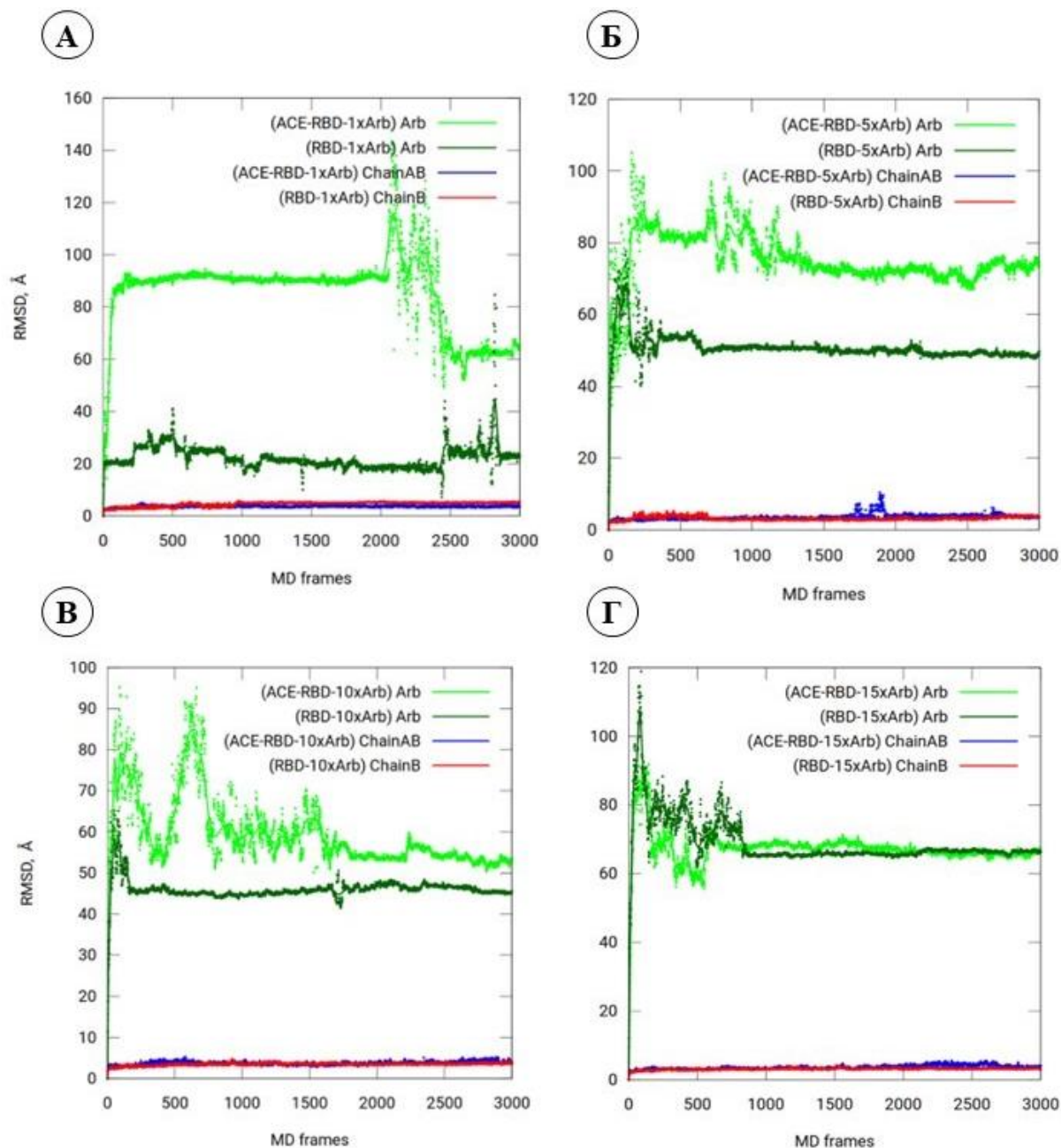


Рисунок 5-3 – Изменение значение RMSD при молекулярно-динамических симуляциях систем RBD-nArb и ACE-RBD-nArb, n = 1, 5, 10, 15.

Представлены результаты молекулярно-динамических симуляций в течение 300 нс при 310 К для ряда мультилигандных систем: Д – РСД и комплекс РСД-АПФ2 в присутствии 20-ти молекул лиганда, Е – полноразмерная луковичная головка S-белка SARS-CoV-2 с 3-мя молекулами Арбидола, Ж, З – симуляции при 400 К для систем РСД и РСД-АПФ2 с 1 и 20 молекулами лиганда.

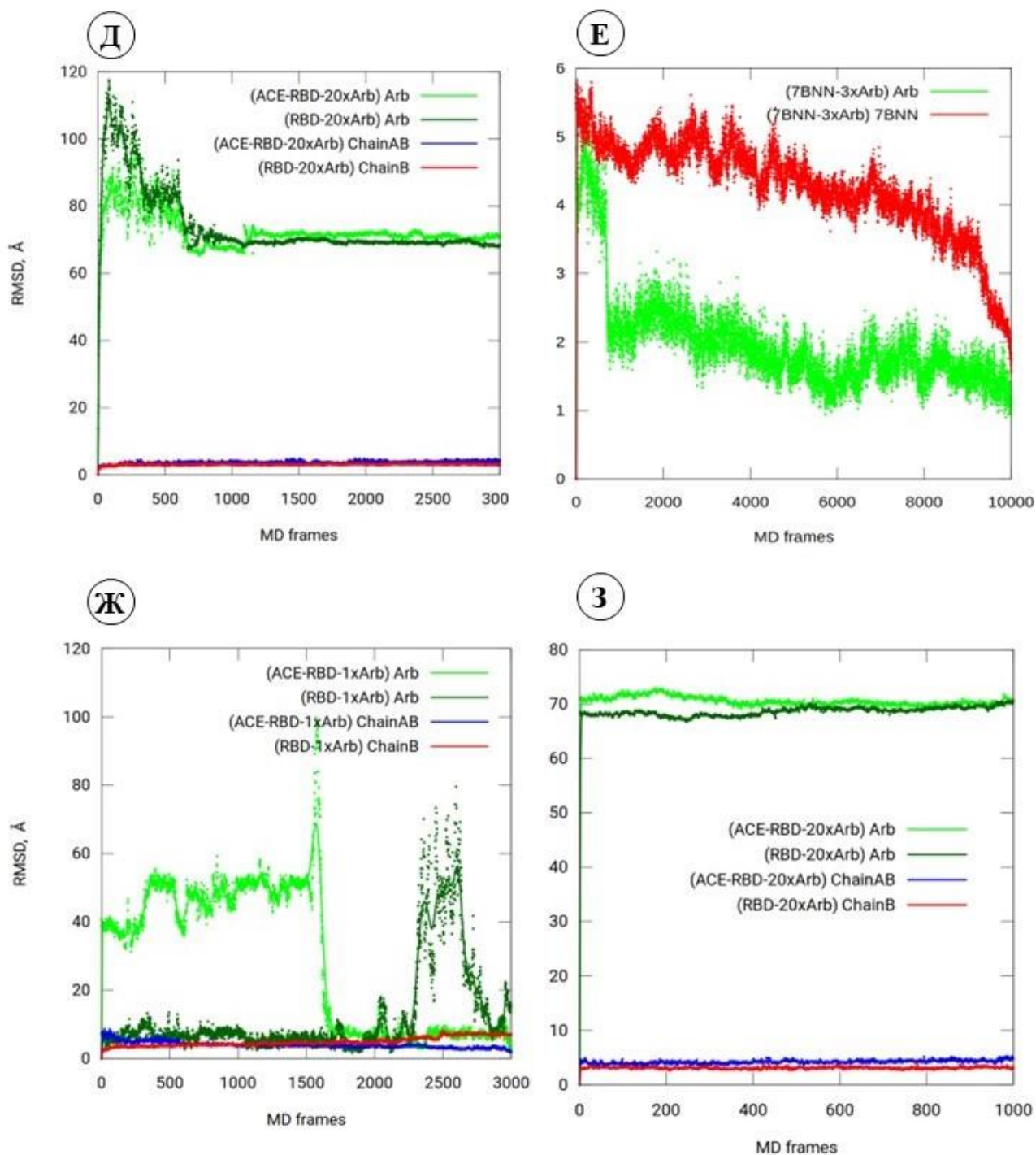


Рисунок 5-3 – (продолжение) Изменение значение RMSD при молекулярно-динамических симуляциях систем RBD-nArb и ACE-RBD-nArb, n = 1, 20.

Ниже представлены значения для гликозилированного РСД в присутствии 1 (И) и 20 (К) молекул Арбидола.

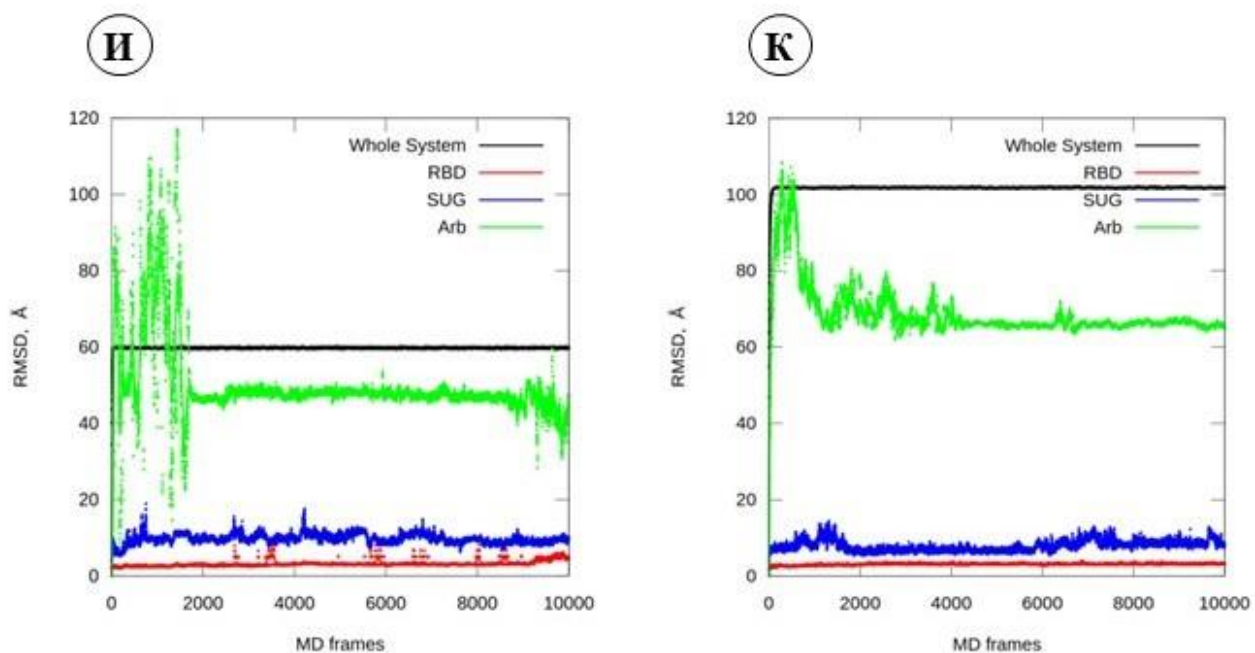
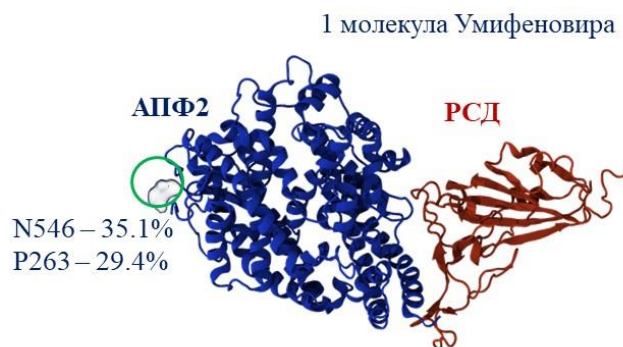
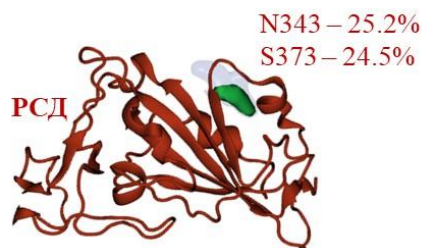


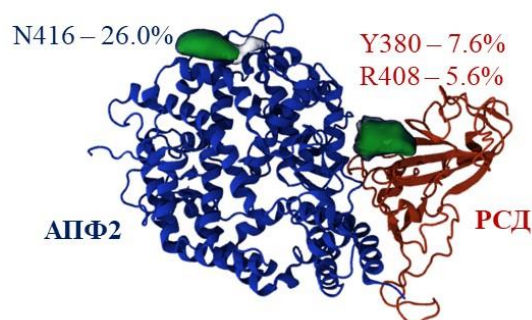
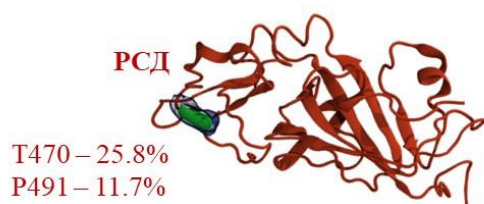
Рисунок 5–3 – (продолжение) Изменение значение RMSD при молекулярно-динамических симуляциях систем RBD-SUG-nArb, n = 1, 20.

Статистическая обработка траекторий молекулярно-динамической симуляции систем RBD-n×Arb, ACE2-RBD-n×Arb: карты заселенности, демонстрирующие частоту «появления» лиганда (лигандов) на поверхности белка. Облака указывают на площадь контакта лиганда и белка, в % указано время продолжительности межмолекулярного контакта с указанным а.о. от всего времени симуляции; колебания вторичной структуры РСД в присутствии n молекул Умифеновира.

T = 310 K



T = 400 K



T = 310 K

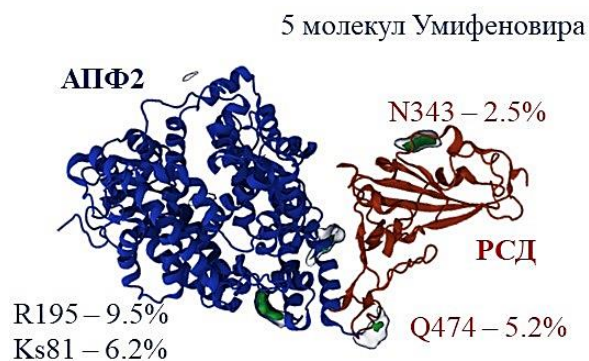
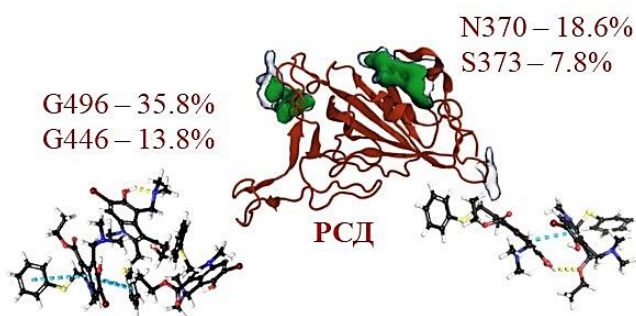
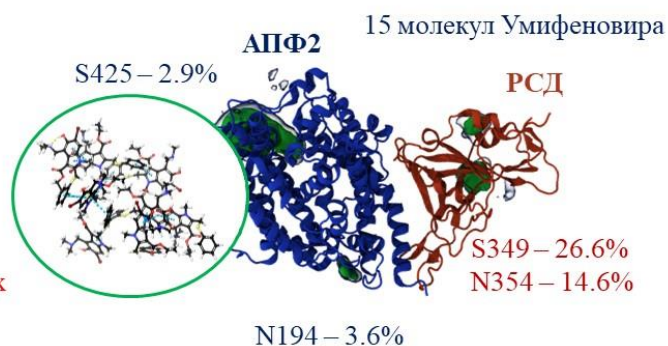
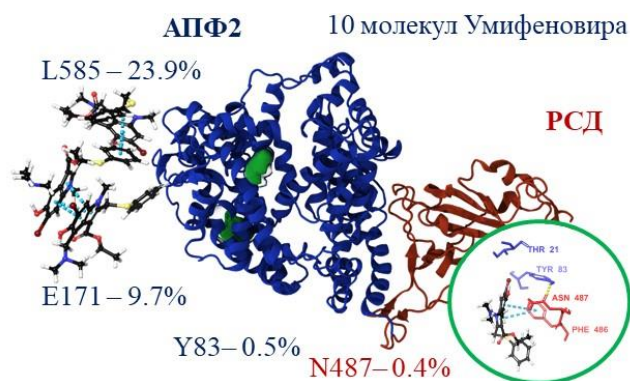
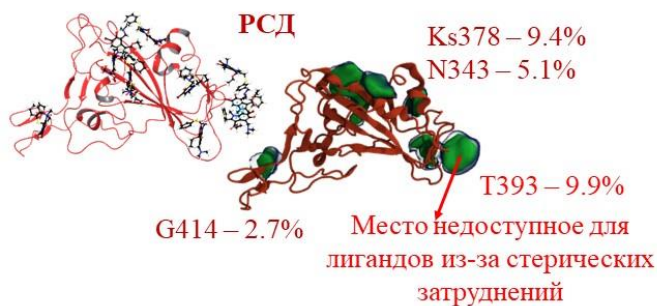
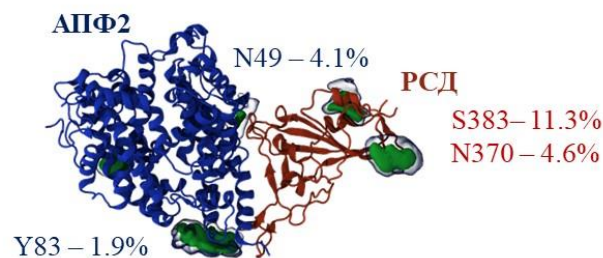
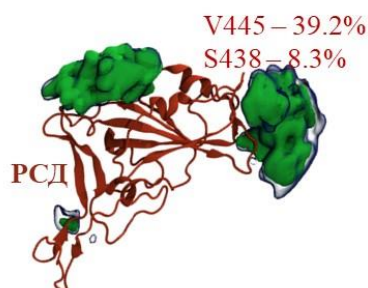


Рисунок 5-4 – Карты заселенности

T = 310 K



T = 310 K



T = 400 K

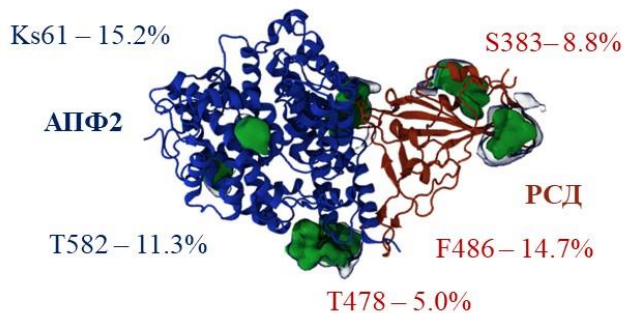
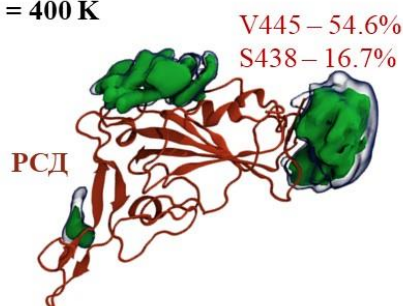


Рисунок 5–4 – (продолжение)

Ниже представлены колебания значений RMSD трех молекул **177** в сайте связывания S₂-субъединицы SARS-CoV-2. Система состояла из луковичной головки S-белка и трех молекул **177** помещенных в область центральных и гептадных повторов. На каждый протомер белка приходится по одному лиганду. Регистрация RMSD производилась для каждого лиганда в отдельности.

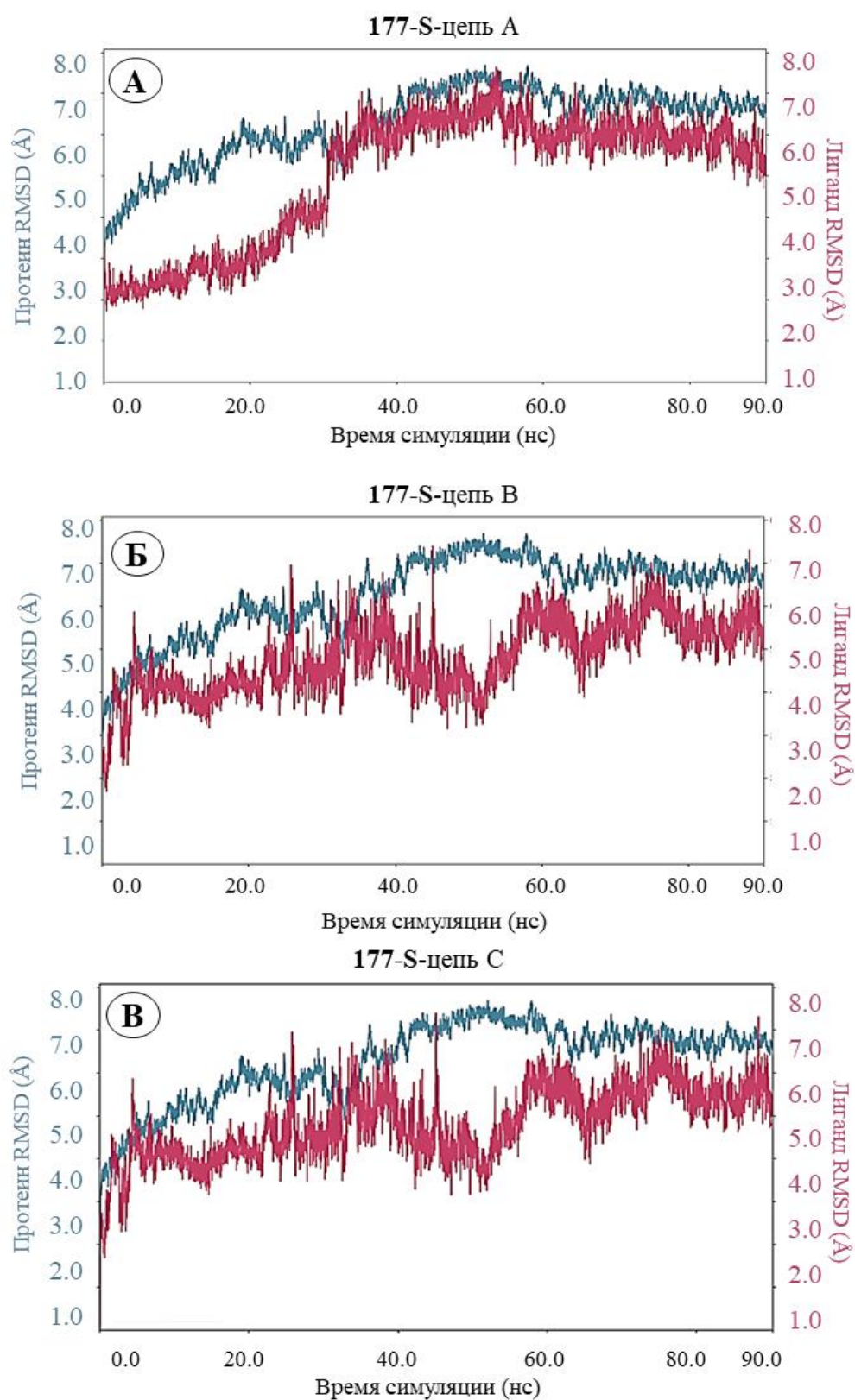


Рисунок 5-5 Изменения значений RMSD комплекса лиганд-белок

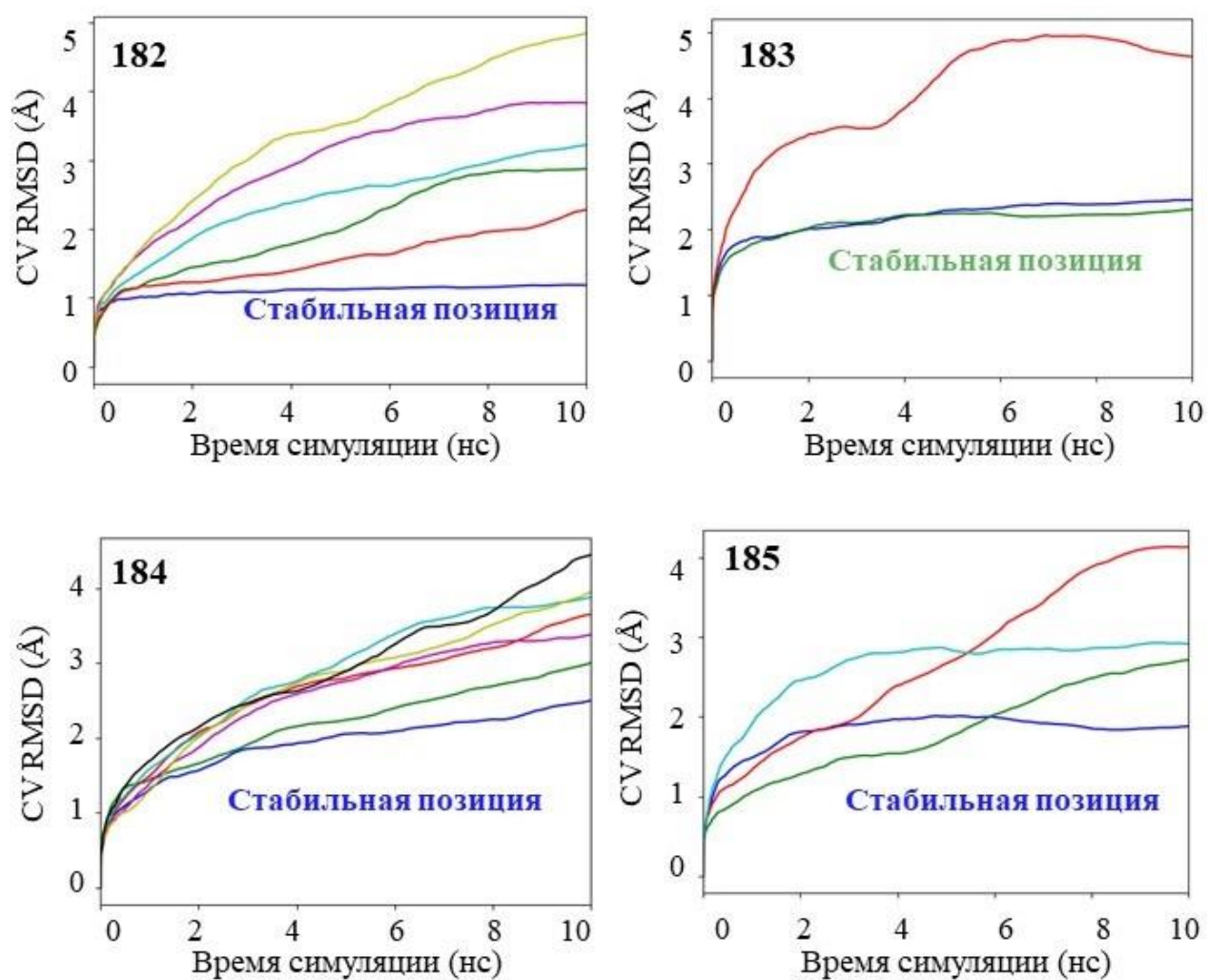


Рисунок 5-6 – Анализ траекторий метадинамики производных усниновой кислоты **182–185** связанных N-терминальном домене S-белка SARS-CoV-2

5.2.3 Поверхностный F-белок РСВ

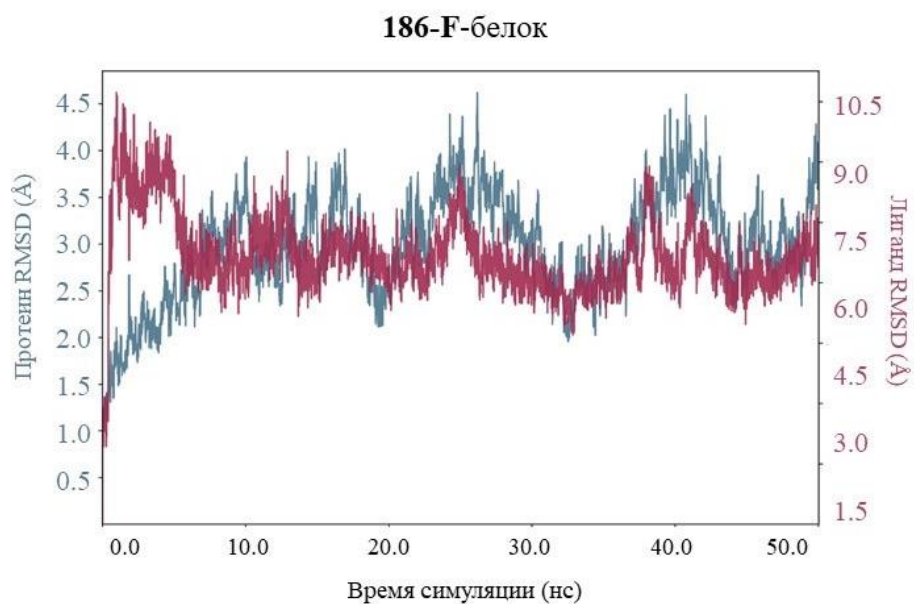


Рисунок 5-7 – Изменения среднеквадратичного положения атомов (RMSD) атомов лиганда (**186**) и протеина (F-белок) в лиганд-белковом комплексе **186-F**.

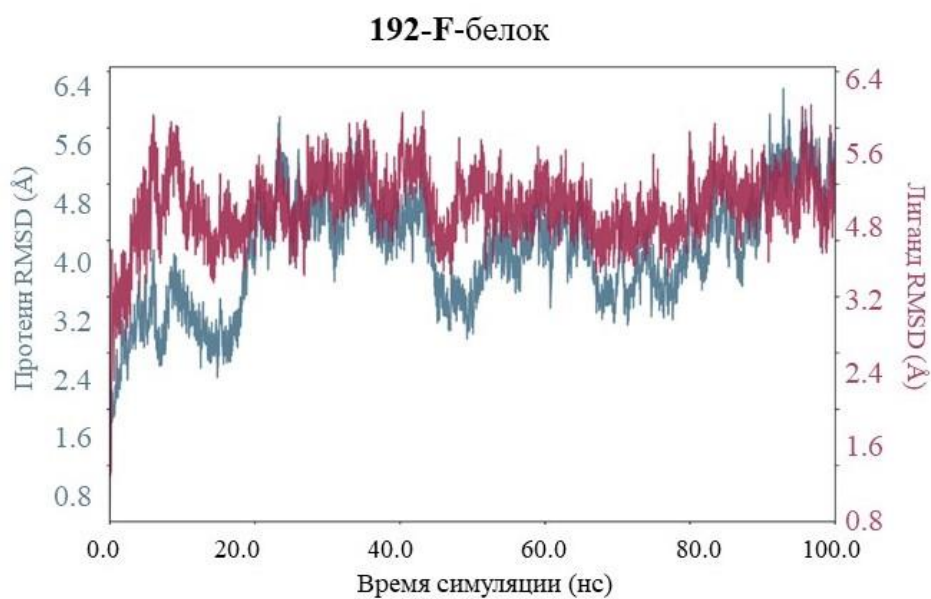


Рисунок 5-8 – Изменения среднеквадратичного положения атомов (RMSD) атомов лиганда (**192**) и протеина (F-белок) в лиганд-белковом комплексе **192-F**.

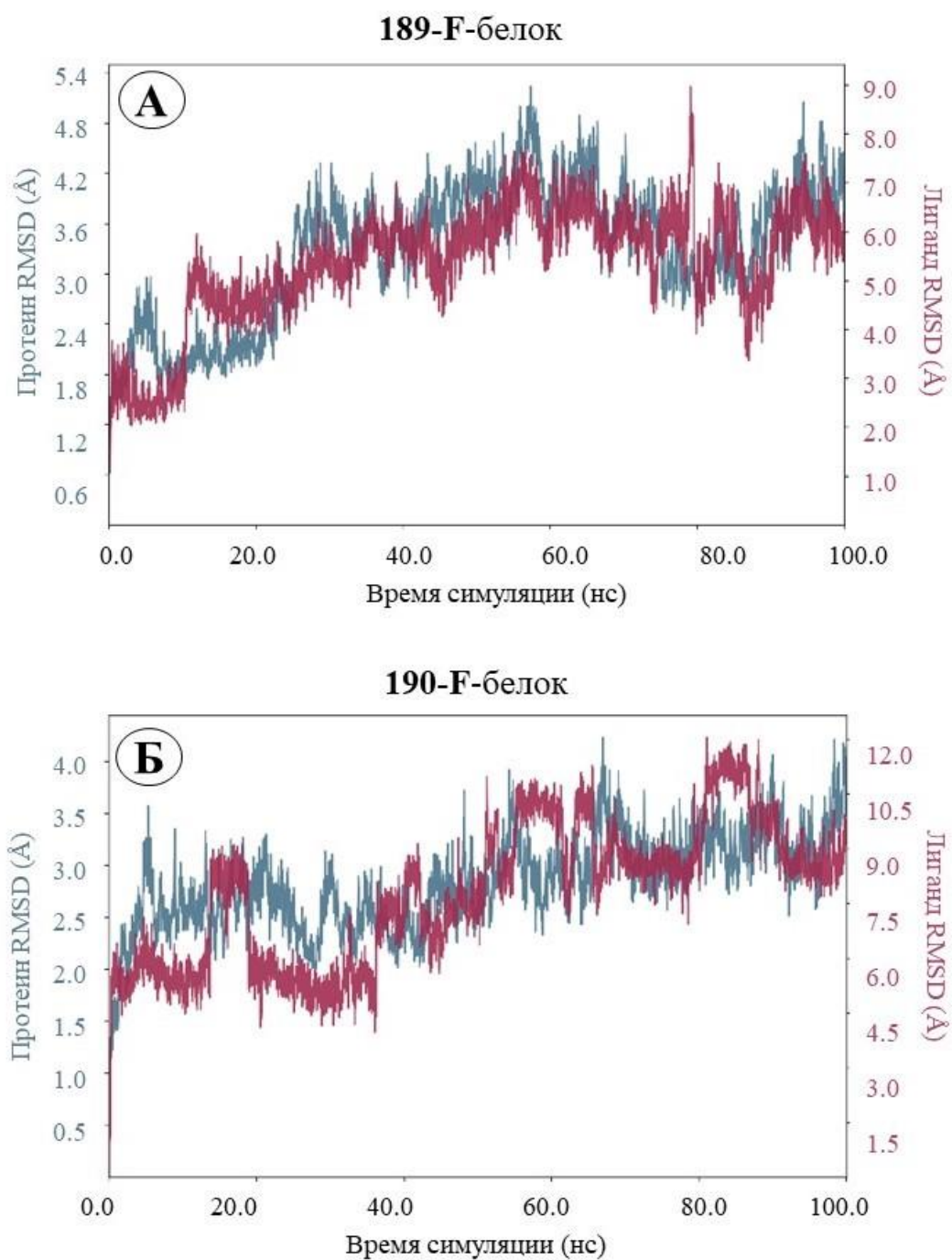


Рисунок 5-9 – Изменения среднеквадратичного положения атомов RMSD атомов лиганда и протеина (F-белок) в лиганд-белковых комплексах **189-F** (А) и **190-F** (Б).

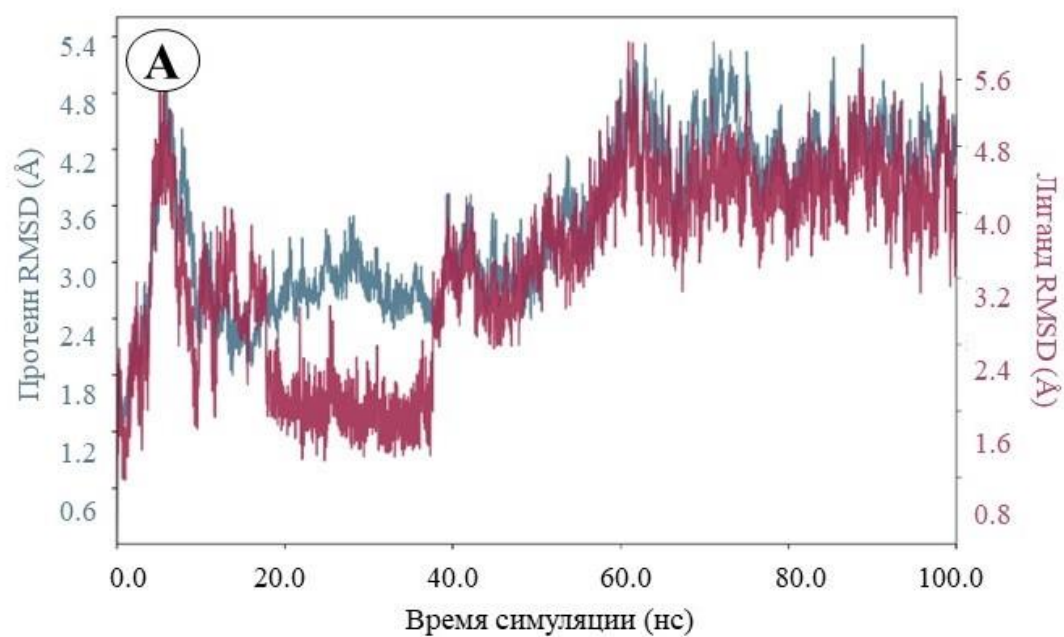
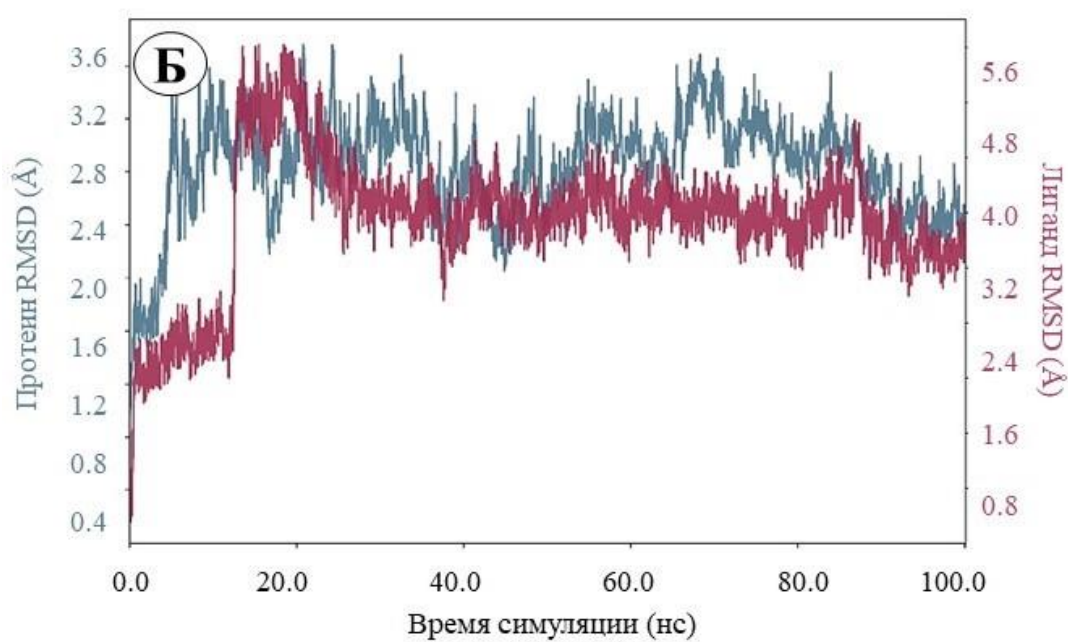
219-F-белок**224-F-белок**

Рисунок 5-10 – Изменения среднеквадратичного положения атомов RMSD атомов лиганда и протеина (F-белок) в лиганд-белковых комплексах **189-F** (А) и **190-F** (Б).

5.2.4. Мембранный вирусный белок р37

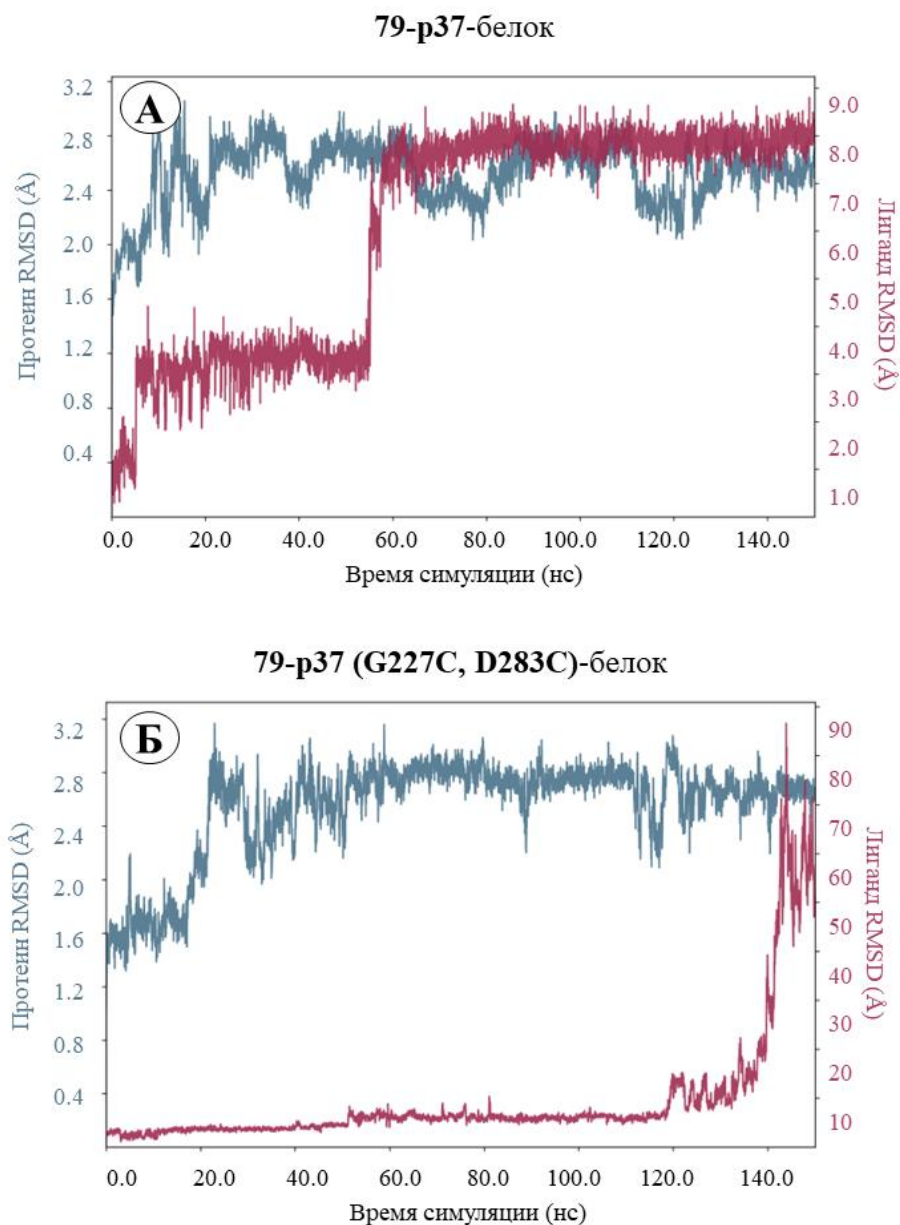


Рисунок 5-11 – Изменения среднеквадратичного положения атомов (RMSD) атомов тековиримата в комплексе с нативным белком р37 **79-р37** (А) и белком р37, в котором были проведены две аминокислотные замены **79-р37 (G227C, D283C)** (Б).

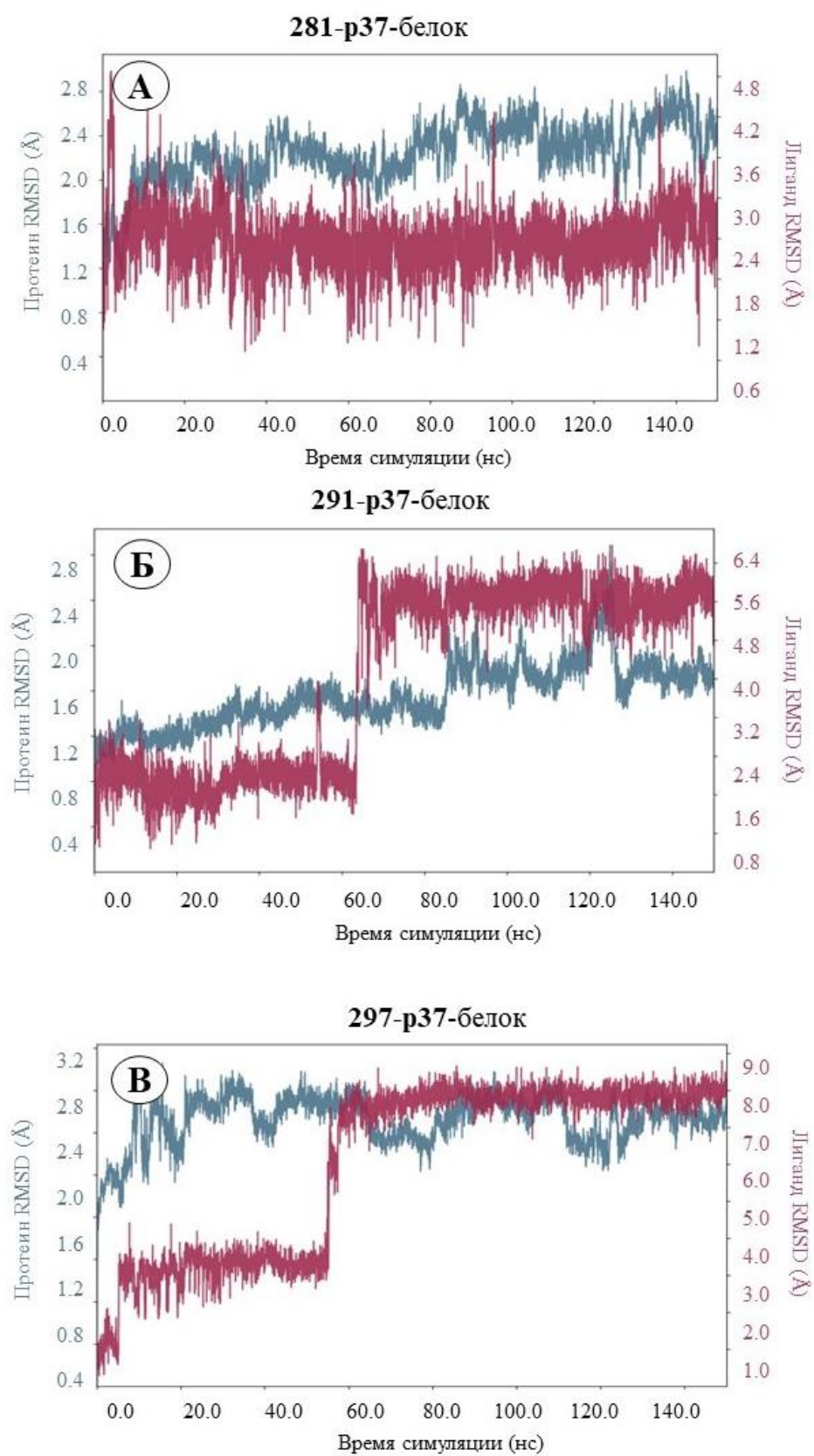


Рисунок 5-12 – Изменения среднеквадратичного положения атомов (RMSD) атомов в лиганд-белковых комплексах **281-p31** (А), **291-p37** (Б) и **297-p37** (В).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. White J. M., Whittaker G. R. Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes // *Traffic*. – 2016. – Vol. 17, № 6. – P. 593-614.
2. Harrison S. C. Viral membrane fusion // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 15, № 7. – P. 690–698.
3. Harrison S. C. Viral membrane fusion // *Virology*. Academic Press Inc., – 2015. – Vol. 479–480. – P. 498–507.
4. Barrett C. T., Dutch R.E. Viral Membrane Fusion, and the Transmembrane Domain // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 7. – P. 693.
5. White J. M., Delos S. E., Brecher M., Schornberg K. Structures, and mechanisms of viral membrane fusion proteins: Multiple variations on a common theme // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 43, № 3. – P. 189–219.
6. Denolly S., Cosset F.-L. HIV fusion: Catch me if you can // *J. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 295, № 45. – P. 15196-15197.
7. Ward A. E., Kiessling V., Pornillos O., White M. J., Ganser-Pornillos B. K., Tamm L. K. HIV-cell membrane fusion intermediates are restricted by Serincs as revealed by cryo-electron and TIRF microscopy // *J. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 295, № 45 – P. 15183-15195.
8. Beniac D. R., Timothy B. F. Structure of the Ebola virus glycoprotein spike within the virion envelope at 11 Å resolution // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 46374.
9. Blijleven J. S., Mechanisms of influenza viral membrane fusion // *Semin. Cell Dev. Biol.* Academic Press, – 2016. – Vol. 60. – P. 78–88.
10. Benton D. J., Gamblin S. J., Rosenthal P. B., Skehel J. J. Structural transitions in influenza haemagglutinin at membrane fusion pH // *Nature*. – 2020. – Vol. 583, № 7814. – P. 150–153.
11. Yin H.-S., Paterson R. G., Wen X., Lamb R. A., Jardetzky T. S. Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 102, № 26. P. – 9288–9293.
12. Jackson C. B., Farzan M., Chen B., Cjoe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2022. – Vol. 23, № 1. – P. 3–20.
13. Afonso C. L., Amarasinghe G. K., Bányaí K., Bào Y., Basler C. F., Bavari S., Bejerman N., Blasdel K. R., Briand F. X., Briesse T., Bukreyev A., Calisher C. H., Chandran K., Chéng J., Clawson A. N., Collins P. L., Dietzgen R. G., Dolnik O., Domier L. L., Dürrwald R., Dye J. M, Easton A. J., Ebihara H., Farkas S. L., Freitas-Astúa J., Formenty P., Fouchier R. A., Fù Y., Ghedin E., Goodin M. M., Hewson R., Horie M., Hyndman T. H., Jiāng D., Kitajima E. W., Kobinger G. P., Kondo H., Kurath G., Lamb R. A., Lenardon S., Leroy E. M., Li C. X., Lin X. D., Liú L., Longdon B., Marton S., Maisner

- A., Mühlberger E., Netesov S. V., Nowotny N., Patterson J. L., Payne S. L., Paweska J. T., Randall R. E., Rima B. K., Rota P., Rubbenstroth D., Schwemmle M., Shi M., Smither S. J., Stenglein M. D., Stone D. M., Takada A., Terregino C., Tesh R. B., Tian J. H., Tomonaga K., Tordo N., Towner J. S., Vasilakis N., Verbeek M., Volchkov V. E., Wahl-Jensen V., Walsh J. A., Walker P. J., Wang D., Wang L. F., Wetzel T., Whitfield A. E., Xiè J. T., Yuen K. Y., Zhang Y. Z., Kuhn J. H. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016 // *Arch. Virol.* – 2016. – Vol. 161, № 8. – P. 2351–2360.
14. Berman H.M. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Res.* 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 235–242.
 15. Yin H.-S., Wen X., Paterson R. G., Lamb R. A., Jardetzky T. S. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation // *Nature*. – 2006. – Vol. 439, № 7072. – P. 38–44.
 16. Rey F. A., Heinz F. X., Mandl C., Kunz C., Harrison S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution // *Nature*. – 1995. – Vol. 375, № 6529. – P. 291–298.
 17. Bressanelli S., Stiasny K., Allison S. L., Stura E. A., Duquerroy S., Lescar J., Heinz F. X., Rey F. A. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23, № 4. – P. 728–738.
 18. Roche S., Rey F. A., Gaudin Y., Bressanelli S. Structure of the Prefusion Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G // *Science*. – 2007. – Vol. 315, № 5813. – P. 843–848.
 19. Roche S., Bressanelli S., Rey F. A., Gaudin Y. Crystal Structure of the Low-pH Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G // *Science*. – 2006. – Vol. 313, № 5784. – P. 187–191.
 20. Gamblin S. J., Haire L. F., Russell R. J., Stevens D. J., Xiao B., Ha Y., Vasisht N., Steinhauer D. A., Daniels R. S., Elliot A., Wiley D. C., Skehel J. J. The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin // *Science*. – 2004. – Vol. 303, № 5665. – P. 1838–1842.
 21. Benton D. J., Nans A., Calder L. J., Skehel J. J. eInfluenza hemagglutinin membrane anchor // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2018. – Vol. 115, № 40. – P. 10112–10117.
 22. Walls A. C., Park Y.-J., Tortorici M. A., Wall A., McGuire A. T., Veerler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein // *Cell*. – 2020. – Vol. 181, № 2. P. – 281–292.e6.
 23. Huang Y., Yang Ch., Xu X.-f., Xu. W., Li Sh.-w. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19 // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2020. – Vol. 41, № 9. – P. 1141–1149.
 24. **Borisevich S. S.**, Zarubaev V. V., Shcherbakov D. N., Yarovaya O. I., Salakhutdinov N. F. Molecular Modeling of Viral Type I Fusion Proteins: Inhibitors of Influenza Virus Hemagglutinin and the Spike Protein of Coronavirus (review) // *Viruses* – 2023. – Vol. 15. – P. 902
 25. Kadam R.U., Wilson I.A. A small-molecule fragment that emulates binding of receptor and broadly neutralizing antibodies to influenza A hemagglutinin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2018. – Vol.

115, № 16. – P. 4240–4245.

26. Le K. P., Do Ph.-Ch., Amaro R., Le L. Molecular Docking of Broad-Spectrum Antibodies on Hemagglutinins of Influenza A Virus // *Evol. Bioinforma.* – 2019. – Vol. 15. – P. 1176934319876938.
27. Li M., Wang B. Computational studies of H5N1 hemagglutinin binding with SA- α -2, 3-Gal and SA- α -2, 6-Gal // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 347, № 3. – P. 662–668.
28. Russell R. J., Kerry P. S., Stevens D. J., Steinhauer D. A., Martin S. R., Gamblin S. J., Skehel J. J. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 105, № 46. – P. 17736-17741.
29. Yang J., Li M., Shen X., Liu Sh. Influenza A Virus Entry Inhibitors Targeting the Hemagglutinin // *Viruses.* – 2013. – Vol. 5. – P. 352–373.
30. Chen Z., Cui Q., Caffrey M., Rong L., Du R. Small Molecule Inhibitors of Influenza Virus Entry // *Pharmaceuticals.* – 2021. – Vol. 14, № 6. – P. 587.
31. Petrova V. N., Russell C. A. The evolution of seasonal influenza viruses // *Nat. Rev. Microbiol.* Nature Publishing Group. – 2018. – Vol. 16, № 1. – P. 47–60.
32. Matrosovich M., Herrler G., Klenk H. D. Sialic acid receptors of viruses // *Top. Curr. Chem.* – 2015. – Vol. 367. – P. 1–28.
33. Xu R., Wilson I. A. Structural Characterization of an Early Fusion Intermediate of Influenza Virus Hemagglutinin // *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85, № 10. – P. 5172-5182.
34. Hamilton B. S., Whittaker G. R., Daniel S. Influenza Virus-Mediated Membrane Fusion: Determinants of Hemagglutinin Fusogenic Activity and Experimental Approaches for Assessing Virus Fusion // *Viruses.* – 2012. – Vol. 4, № 7. – P. 1144–1168.
35. Chernomordik L. V., Kozlov M. M. Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes // *Annu. Rev. Biochem.* – 2003. – Vol. 72, № 1. – P. 175–207.
36. Lazniewski M., Dawson W. K., Szczepinska T., Plewczynski D. The structural variability of the influenza A hemagglutinin receptor-binding site // *Brief. Funct. Genomics.* – 2018. – Vol. 17, № 6. – P. 415–427.
37. Luo M. Influenza Virus Entry // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – Vol. 726. – P. 201–221.
38. Priyadarzini T. R. K., Selvin J. F. A., Grimona M. M., Fukui K., Veluraja K. Theoretical Investigation on the Binding Specificity of Sialyldisaccharides with Hemagglutinins of Influenza A Virus by Molecular Dynamics Simulations // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 41. – P. 34547–34557.
39. Wang L., Wu Y., Yao Sh., Ge H., Zhu Ya., Chen K., Chem W., Zhang Y., Zhu W., Wang H.,
40. Lu W., Du W., Somovilla V. J., Yu G., Haksar D., de Vries E., Boons G.-J., de Vries R. P., de Haan C. A. M., Pieters R. J. Enhanced Inhibition of Influenza A Virus Adhesion by Di- and Trivalent Hemagglutinin Inhibitors: rapid-communication // *J. Med. Chem. American Chemical Society.* – 2019.

– Vol. 62, № 13. – P. 6398–6404.

41. Meng L., Su Y., Yang F., Xiao S., Yin Z., Liu J., Zhong J., Zhou D., Yu F. Design, synthesis and biological evaluation of amino acids-oleanolic acid conjugates as influenza virus inhibitors // *Bioorganic Med. Chem. Pergamon*. – 2019. – Vol. 27, № 23. – P. 115147.
42. Sacramento C. Q., Marttorelli A., Fintelman-Rodrigues N., de Freitas C. S., de Melo G. R., Rocha M. E., Kaiser C. R., Rodrigues K. F., da Costa G. L., Alves C. M., Santos-Filho O., Barbosa J. P., Souza T. M. Aureonitol, a fungi-derived tetrahydrofuran, inhibits influenza replication by targeting its surface glycoprotein hemagglutinin // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, № 10. – P. e0139236.
43. Chang Y.-J., Yeh C.-Y., Cheng J.-C., Huang Y.-Q., Hsu K. C., Lin Y. F., Lu C. H. Potent sialic acid inhibitors that target influenza A virus hemagglutinin // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 8637.
44. Strauch E. M., Bernard S. M., La D., Bohn A. J., Lee P. S., Anderson C. E., Nieusma T., Holstein C. A., Garcia N. K., Hooper K. A., Ravichandran R., Nelson J. W., Sheffler W., Bloom J. D., Lee K. K., Ward A. B., Yager P., Fuller D. H., Wilson I. A., Baker D. Computational design of trimeric influenza-neutralizing proteins targeting the hemagglutinin receptor binding site // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35, № 7. – P. 667–671.
45. Guan S., Wang T., Kuai Z., Qian M., Tian X., Zhang X., Yu Y., Wang S., Zhang H., Li H., Kong W., Shan Y.. Exploration of binding and inhibition mechanism of a small molecule inhibitor of influenza virus H1N1 hemagglutinin by molecular dynamics simulation // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 3786.
46. Shen X., Zhu Z., Ding Y., Wu W., Yang J., Liu Sh. An oligothiophene compound neutralized influenza A viruses by interfering with hemagglutinin // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* – 2018. – Vol. 1860, № 3. – P. 784-791.
47. Du R., Cheng H., Cui Q., Peet P. N., Gaisina I. N., Romg L. Identification of a novel inhibitor targeting influenza A virus group 2 hemagglutinins // *Antiviral Res.*, – 2021. – Vol. 186. – P. 105013.
48. Ahmed A.A., Abouzid M. Arbidol targeting influenza virus A Hemagglutinin; A comparative study // *Biophys. Chem.* – 2021. – Vol. 277. – P. 106663.
49. Bodian D.L., Yamasaki R. B., Buswell R. L., Stearns J. F., White J. M., Kuntz I. D. Inhibition of the Fusion-Inducing Conformational Change of Influenza Hemagglutinin by Benzoquinones and Hydroquinones // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32, № 12.– P. 2967–2978.
50. Kadam R.U., Wilson I.A. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2017. – Vol. 114, № 2. – P. 206–214.
51. Yang H., Chang J. C., Guo Z., Carney P. J., Shore D. A., Donis R. O., Cox N. J., Villanueva J. M., Klimov A. I., Stevens J. Structural Stability of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Hemagglutinins // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88, № 9. – P. 4828–4838.
52. Hoffman L.R., Kuntz I.D., White J.M. Structure-based identification of an inducer of the low-

pH conformational change in the influenza virus hemagglutinin: irreversible inhibition of infectivity // *J. Virol.* – 1997. – Vol. 71, № 11. – P. 8808–8820.

53. Boriskin Y. S., Leneva I. A., Pecheur E.-I., Polyak S. J. Arbidol: A Broad-Spectrum Antiviral Compound that Blocks Viral Fusion // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15, № 10. – P. 997–1005.

54. Wright Z. V. F., Wu N. C., Kadam R. U., Wilson I. A., Wolan D. W. Structure-based optimization and synthesis of antiviral drug Arbidol analogues with significantly improved affinity to influenza hemagglutinin // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* – 2017. – Vol. 27, № 16. – P. 3744–3748.

55. Vanderlinden E., Göktas F., Cesur Z., Froeyen M., Reed M. L., Russell C. J., Cesur N., Naesens L. Novel Inhibitors of Influenza Virus Fusion: Structure-Activity Relationship and Interaction with the Viral Hemagglutinin // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84, № 9. – P. 4277–4288.

56. Cihan-Üstündağ G., Zopun M., Vanderlinden E., Ozkirimli E., Persoons L., Çapan G., Naesens L. Superior inhibition of influenza virus hemagglutinin-mediated fusion by indole-substituted spirothiazolidinones // *Bioorganic Med. Chem.* – 2020. – Vol. 28, № 1. – P. 115130.

57. Laursen N.S., Wilson I.A. Broadly neutralizing antibodies against influenza viruses // *Antiviral Res.* – 2013. – Vol. 98, № 3. – P. 476–483.

58. Dreyfus C., Ekiert D.C., Wilson I.A. Structure of a Classical Broadly Neutralizing Stem Antibody in Complex with a Pandemic H2 Influenza Virus Hemagglutinin // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87, № 12. – P. 7149–7154.

59. Corti D., Voss J., Gamblin S. J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S. G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B. M., Agatic G., Bianchi S., Giacchetto-Sasselli I., Calder L., Sallusto F. A Neutralizing Antibody Selected from Plasma Cells That Binds to Group 1 and Group 2 Influenza A Hemagglutinins // *Science.* – 2011. – Vol. 333, № 6044. – P. 850–856.

60. Basu A., Antanasijevic A., Wang M., Li B., Mills D. M., Ames J. A., Nash P. J., Williams J. D., Peet N. P., Moir D. T., Prichard M. N., Keith K. A., Barnard D. L., Caffrey M., Rong L., Bowlin T. L. New Small Molecule Entry Inhibitors Targeting Hemagglutinin-Mediated Influenza A Virus Fusion // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88, № 3. – P. 1447–1460.

61. Huang Q., Korte T., Rachakonda P. S., Knapp E. W., Herrmann A. Energetics of the loop-to-helix transition leading to the coiled-coil structure of influenza virus hemagglutinin HA2 subunits // *Proteins.* – 2009. – Vol. 74, № 2. – P. 291–303.

62. Leiva R., Barniol-Xicota M., Codony S., Ginex T., Vanderlinden E., Montes M., Caffrey M., Luque F. J., Naesens L., Vázquez S. Aniline-Based Inhibitors of Influenza H1N1 Virus Acting on Hemagglutinin-Mediated Fusion // *J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 61, № 1. – P. 98–118.

63. Kadam R. U., Juraszek J., Brandenburg B., Buyck C., Schepens W. B. G., Kesteley B., Stoops B., Vreeken R. J., Vermond J., Goutier W., Tang C., Vogels R., Friesen R. H. E., Goudsmit J, van

- Dongen M. J. P, Wilson I. A. Potent peptidic fusion inhibitors of influenza virus // *Science*. – 2017. – Vol. 358, № 6362. – P. 496–502.
64. Ekiert D. C., Bhabha G., Elsliger M. A., Friesen R. H., Jongeneelen M., Throsby M., Goudsmit J., Wilson I. A. Antibody Recognition of a Highly Conserved Influenza Virus Epitope // *Science*. – 2009. – Vol. 324, № 5924. – P. 246–251.
65. van Dongen M. J. P., Kadam R. U., Juraszek J., Lawson E., Brandenburg B., Schmitz F., Schepens W. B. G., Stoops B., van Diepen H. A., Jongeneelen M., Tang C., Vermond J., van Eijgen-Obregoso Real A., Blokland S., Garg D., Yu W., Goutier W., Lanckacker E., Klap J. M., Peeters D. C. G, Wu J., Buyck C., Jonckers T. H. M, Roymans D., Roevens P., Vogels R., Koudstaal W., Friesen R. H. E., Raboisson P., Dhanak D., Goudsmit J., Wilson I. A. A small-molecule fusion inhibitor of influenza virus is orally active in mice // *Science*. – 2019. – Vol. 363, № 6431. – P. eaar6221.
66. De Angelis M., Casciaro B., Genovese A., Brancaccio D., Marcocci M. E., Novellino E., Carotenuto A., Palamara A. T., Mangoni M. L., Nencioni L. Temporin g, an amphibian antimicrobial peptide against influenza and parainfluenza respiratory viruses: Insights into biological activity and mechanism of action // *FASEB J*. – 2021. – Vol. 35, № 2. – P. 1–14.
67. Yao Y., Kadam R. U., Lee C. D., Woehl J. L., Wu N. C., Zhu X., Kitamura S., Wilson I. A., Wolan D. W. An influenza A hemagglutinin small-molecule fusion inhibitor identified by a new high-throughput fluorescence polarization screen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2020. – Vol. 117, № 31. – P. 18431–18438.
68. Antanasijevic A., Durst M. A., Cheng H., Gaisina I. N., Perez J. T., Manicassamy B., Rong L., Lavie A., Caffrey M. Structure of avian influenza hemagglutinin in complex with a small molecule entry inhibitor // *Life Sci. Alliance*. – 2020. – Vol. 3, № 8. – P.e202000724.
69. Wang A., Li Y., Lv K., Gao R., Wang A., Yan H., Qin X., Xu S., Ma C., Jiang J., Wei Z., Zhang K., Liu M. Optimization and SAR research at the piperazine and phenyl rings of JNJ4796 as new anti-influenza A virus agents, part 1 // *Eur. J. Med. Chem*. – 2021. – Vol. 222. – P. 113591.
70. Elebeedy D., Badawy I., Elmaaty A. A., Saleh M. M., Kandeil A., Ghanem A., Kutkat O., Alnajjar R., Abd E. I. Maksoud A. .I, Al-Karmalawy A. A. In vitro and computational insights revealing the potential inhibitory effect of Tanshinone IIA against influenza A virus // *Comput. Biol. Med*. – 2022. – Vol. 141. – P. 105149.
71. Motohashi Y., Igarashi M., Okamatsu M., Noshi T., Sakoda Y., Yamamoto N., Ito K., Yoshida R., Kida H. Antiviral activity of stachyflin on influenza A viruses of different hemagglutinin subtypes // *Virol. J*. – 2013. – Vol. 10. – P. 118-128.
72. Kim J. I., Lee S., Lee G. Y., Park S., Bae J. Y., Heo J., Kim H. Y., Woo S. H., Lee H. U., Ahn C. A., Bang H. J., Ju H. S., Ok K., Byun Y., Cho D. J., Shin J. S., Kim D. Y., Park M. S., Park M. S. Novel Small Molecule Targeting the Hemagglutinin Stalk of Influenza Viruses // *J. Virol*. – 2019. – Vol.

93, № 17. – P.e00878-19.

73. de Castro S., Ginex T., Vanderlinden E., Laporte M., Stevaert A., Cumella J., Gago F., Camarasa M. J., Luque F. J., Naesens L., Velazquez S. N-benzyl 4,4-disubstituted piperidines as a potent class of influenza H1N1 virus inhibitors showing a novel mechanism of hemagglutinin fusion peptide interaction // *Eur. J. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 194. – P. 112223.

74. Zhao X., Li R., Zhou Y., Xiao M., Ma C., Yang Z., Zeng S., Du Q., Yang C., Jiang H., Hu Y., Wang K., Mok C. K. P., Sun P., Dong J., Cui W., Wang J., Tu Y., Yang Z., Hu W. Discovery of Highly Potent Pinanamine-Based Inhibitors against Amantadine- and Oseltamivir-Resistant Influenza A Viruses // *J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 61, № 12. – P. 5187–5198.

75. Tang T., Bidon M., Jaimes J. A., Whattaker G. R., Daniel S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development // *Antiviral Res.* – 2020. – Vol. 178. – P. 104792.

76. Casalino L., Gaieb Z., Goldsmith J. A., Hjorth C. K., Dommer A. C., Harbison A. M., Fogarty C. A., Barros E. P., Taylor B. C., McLellan J. S., Fadda E., Amaro R. E. Beyond shielding: The roles of glycans in the SARS-CoV-2 spike protein // *ACS Cent. Sci.* – 2020. – Vol. 6, № 10. – P. 1722–1734.

77. Carino A., Moraca F., Fiorillo B., Marchianò S., Sepe V., Biagioli M., Finamore C., Bozza S., Francisci D., Distrutti E., Catalanotti B., Zampella A., Fiorucci S. Hijacking SARS-CoV-2/ACE2 receptor interaction by natural and semi-synthetic steroidal agents acting on functional pockets on the receptor binding domain // *Front. Chem.* – 2020. – Vol. 8. – P. 1–15.

78. Benton D. J., Wrobel A. G., Roustan C., Borg A., Xu P., Martin S. R., Rosenthal P. B., Skehel J. J., Gamblin S. J. The effect of the D614G substitution on the structure of the spike glycoprotein of SARS-CoV-2 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2021. – Vol. 118, № 9. – P. e2022586118.

79. Woo H., Park S. J., Choi Y. K., Park T., Tanveer M., Cao Y., Kern N. R., Lee J., Yeom M. S., Croll T. I., Seok C., Im W. Developing a Fully Glycosylated Full-Length SARS-CoV-2 Spike Protein Model in a Viral Membrane // *J. Phys. Chem.* – 2020. Vol. 124, №33. – P. 7128–7137.

80. Choi Y.K., Cao Y., Frank M., Woo H., Park S. J., Yeom M. S., Croll T. I., Seok C., Im W. Structure, Dynamics, Receptor Binding, and Antibody Binding of the Fully Glycosylated Full-Length SARS-CoV-2 Spike Protein in a Viral Membrane // *J. Chem. Theory Comput.* – 2021. – Vol. 17, № 4. – P. 2479–2487.

81. Wrapp D., Wang N., Corbett K. S., Goldsmith J. A., Hsieh C. L., Abiona O., Graham B. S., McLellan J. S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation // *Science.* – 2020. – Vol. 367, № 6483. – P. 1260–1263.

82. Zhu C., He G., Yin Q., Zeng L., Ye X., Shi Y., Xu W. Molecular biology of the SARs-CoV-2 spike protein: A review of current knowledge // *J. Med. Virol.* – 2021. – Vol. 93, № 10. – P. 5729–5741.

83. Jin Z., Du X., Xu Y., Deng Y., Liu M., Zhao Y., Zhang B., Li X., Zhang L., Peng C., Duan Y.,

- Yu J., Wang L., Yang K., Liu F., Jiang R., Yang X., You T., Liu X., Yang X., Bai F., Liu H., Liu X., Guddat L. W., Xu W., Xiao G., Qin C., Shi Z., Jiang H., Rao Z., Yang H. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors // *Nature*. – 2020. – Vol. 582, № 7811. – P. 289–293.
84. Rosa A., Pye V. E., Graham C., Muir L., Seow J., Ng K. W., Cook N. J., Rees-Spear C., Parker E., Dos Santos M. S., Rosadas C., Susana A., Rhys H., Nans A., Masino L., Roustan C., Christodoulou E., Ulferts R., Wrobel A. G., Short C. E., Fertleman M., Sanders R. W., Heaney J., Spyer M., Kjær S., Riddell A., Malim M. H., Beale R., MacRae J. I., Taylor G. P., Nastouli E., van Gils M. J., Rosenthal P. B., Pizzato M., McClure M. O., Tedder R. S., Kassiotis G., McCoy L. E., Doores K. J., Cherepanov P. SARS-CoV-2 can recruit a heme metabolite to evade antibody immunity // *Sci. Adv.* – 2021. – Vol. 7, № 22. – P.eabg7607.
85. Toelzer C., Gupta K., Yadav S. K. N., Borucu U., Davidson A. D., Kavanagh Williamson M., Shoemark D. K., Garzoni F., Staufer O., Milligan R., Capin J., Mulholland A. J., Spatz J., Fitzgerald D., Berger I., Schaffitzel C. Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein // *Science*. – 2020. – Vol. 370, № 6517. – P. 725–730.
86. Maffucci I., Contini A. In Silico Drug Repurposing for SARS-CoV-2 Main Proteinase and Spike Proteins // *J. Proteome Res.* – 2020. – Vol. 19, № 11. – P. 4637–4648.
87. Teli D. M., Shah M. B., Chhabria M. T. In silico Screening of Natural Compounds as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease and Spike RBD: Targets for COVID-19 // *Front. Mol. Biosci.* – 2021. – Vol. 7. – P. 599079.
88. Zígolo M. A., Goytia M. R., Poma H. R., Rajal V. B., Irazusta V. P. Virtual screening of plant-derived compounds against SARS-CoV-2 viral proteins using computational tools // *Sci. Total Environ.* – 2021. – Vol. 781. – P. 146400.
89. Shikder M., Kazi A.A., Hasib T. A., Ray P., Khalipha A. B. R., Kabir Md. L. In-Silico Molecular Docking and Pharmacokinetic Activity Analysis of Potential Inhibitors against SARS-CoV-2 Spike Glycoproteins // *Appl. Microbiol. Theory & Technol.* – 2021. – Vol. 2, №2. – P. 83–99.
90. Aallaei M., Molaakbari E., Mostafavi P., Salarizadeh N., Maleksah R. E., Afzali D. Investigation of Cu metal nanoparticles with different morphologies to inhibit SARS-CoV-2 main protease and spike glycoprotein using Molecular Docking and Dynamics Simulation // *J. Mol. Struct.* – 2022. – Vol. 1253. – P. 132301.
91. Deganutti G., Prischi F., Reynolds C.A. Supervised molecular dynamics for exploring the druggability of the SARS-CoV-2 spike protein // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* – 2021. – Vol. 35, № 2. – P. 195–207.
92. Xiu S., Dick A., Ju H., Mirzaie S., Abdi F., Cocklin S., Zhan P., Liu X. Inhibitors of SARS-CoV-2 Entry: Current and Future Opportunities // *J. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 63, № 21. – P. 12256–12274.

93. Aherfi S., Pradines B., Devaux C., Honore S., Colson P., Scola B., Raoult D. Drug repurposing against SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 and MERS-CoV // *Future Microbiol.* – 2021. – Vol. 16, № 17. – P. 1341–1370.
94. Cantuti-Castelvetri L., Ojha R., Pedro L. D., Djannatian M., Franz J., Kuivanen S., van der Meer F., Kallio K., Kaya T., Anastasina M., Smura T., Levanov L., Szirovicza L., Tobi A., Kallio-Kokko H., Österlund P., Joensuu M., Meunier F. A., Butcher S. J., Winkler M. S., Mollenhauer B., Helenius A., Gokce O., Teesalu T., Hepojoki J., Vapalahti O., Stadelmann C., Balistreri G., Simons M. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity // *Science.* – 2020. – Vol. 370, № 6518. – P. 856–860.
95. Wang K., Chen W., Zhang Z., Deng Y., Lian J. Q., Du P., Wei D., Zhang Y., Sun X. X., Gong L., Yang X., He L., Zhang L., Yang Z., Geng J. J., Chen R., Zhang H., Wang B., Zhu Y. M., Nan G., Jiang J. L., Li L., Wu J., Lin P., Huang W., Xie L., Zheng Z. H., Zhang K., Miao J. L., Cui H. Y., Huang M., Zhang J., Fu L., Yang X. M., Zhao Z., Sun S., Gu H., Wang Z., Wang C. F., Lu Y., Liu Y. Y., Wang Q. Y., Bian H., Zhu P., Chen Z. N. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2020. – Vol. 5, № 1. – P. 283.
96. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 // *Science.* – 2020. – Vol. 367, № 6485. – P. 1444–1448.
97. Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo Ch., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 // *Nature.* – 2020. – Vol. 581, № 7807. – P. 221–224.
98. Adediji A.O., Severson W., Jonsson C., Singh K., Weiss S. R., Sarafianos S. G. Novel Inhibitors of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry That Act by Three Distinct Mechanisms // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87, № 14. – P. 8017–8028.
99. Razizadeh M., Nikfar M., Liu Y. Small molecule therapeutics to destabilize the ACE2-RBD complex: A molecular dynamics study // *Biophys. J.* – 2021. – Vol. 120, № 14. – P. 2793–2804.
100. Cagno V., Magliocco G., Tapparel C., Daali Y. The tyrosine kinase inhibitor nilotinib inhibits SARS-CoV-2 in vitro // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2021. – Vol. 128, № 4. – P. 621–624.
101. Banerjee S., Yadav S., Banerjee S., Fakayode S. O., Parvathareddy J., Reichard W., Surendranathan S., Mahmud F., Whatcott R., Thammathong J., Meibohm B., Miller D. D., Jonsson C. B., Dubey K. D. Drug Repurposing to Identify Nilotinib as a Potential SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitor: Insights from a Computational and In Vitro Study // *J. Chem. Inf. Model.* – 2021. – Vol. 61, № 11. – P. 5469–5483.
102. Roth S., Danielli A. Rapid and sensitive inhibitor screening using magnetically modulated biosensors // *Sensors.* – 2021. – Vol. 21, № 14. – P. 4814.
103. Ruan Z., Liu C., Guo Y., He Z., Huang X., Jia X., Yang T. SARS-CoV-2 and SARS-CoV: Virtual screening of potential inhibitors targeting RNA-dependent RNA polymerase activity (NSP12) // *J. Med. Virol.* – 2021. – Vol. 93, № 1. – P. 389–400.

104. Galimberti S., Petrini M., Barate C., Ricci F., Balducci S., Grassi S., Guerrini F., Ciabatti E., Mechelli S., Di Paolo A., Baldini C., Baglietto L., Macera L., Spezia P. G., Maggi F. Tyrosine Kinase Inhibitors Play an Antiviral Action in Patients Affected by Chronic Myeloid Leukemia: A Possible Model Supporting Their Use in the Fight Against SARS-CoV-2 // *Front. Oncol.* – 2020. Vol. 10. – P. 1428.
105. Bouchlarhem A., Haddar L., Lamzouri O., Onci-Es-Saad, Nasri S., Aichouni N., Bkiyar H., Mebrouk Y., Skiker I. et al. Multiple cranial nerve palsies revealing blast crisis in patient with chronic myeloid leukemia in the accelerated phase under nilotinib during severe infection with SARS-COV-19 virus: Case report and review of literature // *Radiol. Case Reports.* – 2021. – Vol. 16, № 11. P. – 3602–3609.
106. Mediouni S., Housni B. Identification of potent small molecule inhibitors of SARS-CoV-2 entry // *SLAS Discov.* – 2022. – Vol. 27, № 1. – P. 8–19.
107. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor // *Nature.* – 2020. – Vol. 581, № 7807. – P. 215–220.
108. Kalhor H., Sadeghi S., Abolhasani H., Kalhor R., Rahimi H. Repurposing of the approved small molecule drugs in order to inhibit SARS-CoV-2 S protein and human ACE2 interaction through virtual screening approaches // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2022. – Vol. 40, № 3. – P. 1299–1315.
109. Wei T.Z., Wang H., Wu X. Q., Lu Y., Guan S. H., Dong F. Q., Dong C. L., Zhu G. L., Bao Y. Z., Zhang J., Wang G. Y., Li H. Y. In Silico Screening of Potential Spike Glycoprotein Inhibitors of SARS-CoV-2 with Drug Repurposing Strategy // *Chin. J. Integr. Med.* – 2020. – Vol. 26, № 9. – P. 663–669.
110. Tong L., Wang L., Liao S., Xiao X., Qu J., Wu C., Zhu Y., Tai W., Huang Y., Wang P., Li L., Zhang R., Xiang Y., Cheng G. A Retinol Derivative Inhibits SARS-CoV-2 Infection by Interrupting Spike-Mediated Cellular Entry // *MBio.* – 2022. – Vol. 13, № 4. – P.e0148522.
111. Fantini J., Di Scala C., Chahinian H., Yahi N. Structural and molecular modelling studies reveal a new mechanism of action of chloroquine and hydroxychloroquine against SARS-CoV-2 infection // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2020. – Vol. 55, № 5. – P. 105960.
112. Fantini J., Chahinian H., Yahi N. Synergistic antiviral effect of hydroxychloroquine and azithromycin in combination against SARS-CoV-2: What molecular dynamics studies of virus-host interactions reveal // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2020. – Vol. 56, № 2. – P. 106020.
113. Braz H. L. B., Silveira J. A. M., Marinho A. D., de Moraes M. E. A., Moraes Filho M. O., Monteiro H. S. A., Jorge R. J. B. In silico study of azithromycin, chloroquine and hydroxychloroquine and their potential mechanisms of action against SARS-CoV-2 infection // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2020. – Vol. 56, № 3. – P. 106119.

114. Colson P., Rolain J. M., Lagier J. C., Brouqui P., Raoult D. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19 // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2020. – Vol. 55, № 4. – P. 105932.
115. Xia S., Yan L., Xu W., Agrawal A. S., Algaissi A, Tseng C. K., Wang Q., Du L., Tan W., Wilson I. A., Jiang S., Yang B., Lu L. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike // *Sci. Adv.* – 2019. – Vol. 5, № 4. – P. eaav4580.
116. Xia S., Lan Q., Zhu Y., Wang Ch., Xu W., Li Y., Wang L., Jiao F., Zhou J., Hua C., Wanh Q., Cai X., Wu Y., Gao J., Liu H., Sun G., Munch J., Kirchhoff F., Yuan Z., Xie Y., Sun F., Juang Sh. Structural and functional basis for pan-CoV fusion inhibitors against SARS-CoV-2 and its variants with preclinical evaluation // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. 288.
117. Wang X., Cao R., Zhang H., Liu J., Xu M., Hu H., Li Y., Zhao L., Li W., Sun X., Yang X., Shi Z., Deng F., Hu Z., Zhong W., Wang M. The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro // *Cell Discov.* – 2020. – Vol. 6, № 1. – P. 28.
118. Cai L., Guo X., Cao Y., Ying P., Hong L., Zhang Y., Yi G., Fu M. Determining available strategies for prevention and therapy: Exploring COVID-19 from the perspective of ACE2 (Review) // *Int. J. Mol. Med.* – 2021. – Vol. 47, № 4. – P. 43.
119. Vankadari N. Arbidol: A potential antiviral drug for the treatment of SARS-CoV-2 by blocking trimerization of the spike glycoprotein // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2020. – Vol. 56, № 2. – P. 105998.
120. Padhi A. K., Swal A., Khan J. M., Ahamed M., Tripathi T. Unraveling the mechanism of arbidol binding and inhibition of SARS-CoV-2: Insights from atomistic simulations // *Eur. J. Pharmacol.* – 2021. – Vol. 894. – P. 173836.
121. Huynh T., Wang H., Luan B. In Silico Exploration of the Molecular Mechanism of Clinically Oriented Drugs for Possibly Inhibiting SARS-CoV-2's Main Protease // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2020. – Vol. 11, № 11. – P. 4413–4420.
122. Ghasemlou A., Uskoković V., Sefidbakht Y. Exploration of potential inhibitors for SARS-CoV-2 Mpro considering its mutants via structure-based drug design, molecular docking, MD simulations, MM/PBSA, and DFT calculations // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2022. – Vol. 70, № 1. – P. 439-457.
123. Musarrat F., Chouljenko V., Dahal A., Nabi R., Chouljenko T., Jois S. D., Kousoulas K. G. The anti-HIV drug nelfinavir mesylate (Viracept) is a potent inhibitor of cell fusion caused by the SARSCoV-2 spike (S) glycoprotein warranting further evaluation as an antiviral against COVID-19 infections // *J. Med. Virol.* – 2020. – Vol. 92, № 10. – P. 2087–2095.
124. Li H., Cheng C., Shi S., Wu Y., Gao Y., Liu Z., Liu M., Li Z., Huo L., Pan X., Liu S., Song G. Identification, optimization, and biological evaluation of 3-O- β -chacotriosyl ursolic acid derivatives as novel SARS-CoV-2 entry inhibitors by targeting the prefusion state of spike protein // *Eur. J. Med. Chem.* – 2022. – Vol. 238. – P. 114426.

125. Gentile F., Oprea T. I., Tropsha A., Cherkasov A. Surely you are joking, Mr Docking! // *Chem. Soc. Rev.* – 2023. – Vol. 52, № 3. – P. 872–878.
126. Griffiths C., Drews S.J., Marchant D.J. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2017. – Vol. 30, № 1. – P. 277–319.
127. Battles M. B., Langedijk J. P., Furmanova-Hollenstein P., Chaiwatpongsakorn S., Costello H. M., Kwanten L., Vranckx L., Vink P., Jaensch S., Jonckers T. H., Koul A., Arnoult E., Peeples M. E., Roymans D., McLellan J. S. Molecular mechanism of respiratory syncytial virus fusion inhibitors // *Nat. Chem. Biol.* – 2016. – Vol. 12, № 2. – P. 87–93.
128. Xie Q., Wang Z., Ni F., Chen X., Ma J., Patel N., Lu H., Liu X., Tian J.-H., Flyer D., Massare M. J., Ellingsworth L., Glenn G., Smith G., Wang Q. Structure basis of neutralization by a novel site II/IV antibody against respiratory syncytial virus fusion protein // *PLoS One* – 2019. – Vol. 14, № 2. – P. e0210749.
129. McLellan J.S., Ray W.C., Peeples M.E. Structure and Function of Respiratory Syncytial Virus Surface Glycoproteins. // *Curr. Top. Microbiol Immunol.* – 2013. – Vol. 372. – P. 83–104.
130. Rossey I., Hsieh C. L., Sedeyn K., Ballegeer M., Schepens B., Mclellan J. S., Saelens X. A Vulnerable, Membrane-Proximal Site in Human Respiratory Syncytial Virus F Revealed by a Prefusion-Specific Single-Domain Antibody // *J. Virol.* – 2021. – Vol. 95, № 11. – P. e02279-20.
131. McLellan J. S., Chen M., Joyce M. G., Sastry M., Stewart-Jones G. B., Yang Y., Zhang B., Chen L., Srivatsan S., Zheng A., Zhou T., Graepel K. W., Kumar A., Moin S., Boyington J. C., Chuang G. Y., Soto C., Baxa U., Bakker A. Q., Spits H., Beaumont T., Zheng Z., Xia N., Ko S. Y., Todd J. P., Rao S., Graham B. S., Kwong P. D. Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus // *Science.* – 2013. – Vol. 342, № 6158. – P. 592–598.
132. Cianci C., Yu K. L., Combrink K., Sin N., Pearce B., Wang A., Civiello R., Voss S., Luo G., Kadow K., Genovesi E. V., Venables B., Gulgeze H., Trehan A., James J., Lamb L., Medina I., Roach J., Yang Z., Zadjura L., Colonna R., Clark J., Meanwell N., Krystal M. Orally Active Fusion Inhibitor of Respiratory Syncytial Virus // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48, № 2. – P. 413–422.
133. Magro M., Andreu D., Gómez-Puertas P., Melero J. A., Palomo C. Neutralization of Human Respiratory Syncytial Virus Infectivity by Antibodies and Low-Molecular-Weight Compounds Targeted against the Fusion Glycoprotein // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84, № 16. – P. 7970–7982.
134. Andries K., Moeremans M., Gevers T., Willebrords R., Sommen C., Lacrampe J., Janssens F., Wyde P. R. Substituted benzimidazoles with nanomolar activity against respiratory syncytial virus // *Antiviral Res.* – 2003. – Vol. 60, № 3. – P. 209–219.
135. Douglas J. L., Panis M. L., Ho E., Lin K. Y., Krawczyk S. H., Grant D. M., Cai R., Swaminathan S., Chen X., Cihlar T. Small Molecules VP-14637 and JNJ-2408068 Inhibit Respiratory Syncytial Virus

Fusion by Similar Mechanisms // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49, № 6. – P. 2460–2466.

136. Roymans D., De Bondt H. L., Arnoult E., Geluykens P., Gevers T., Van Ginderen M., Verheyen N., Kim H., Willebrords R., Bonfanti J. F., Bruinzeel W., Cummings M. D., van Vlijmen H., Andries K. Binding of a potent small-molecule inhibitor of six-helix bundle formation requires interactions with both heptad-repeats of the RSV fusion protein // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. Vol. 107, № 1. – P. 308–313.

137. Heylen E., Neyts J., Jochmans D. Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus antiviral drug discovery // *Biochem. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 127. – P. 1–12.

138. Cichero E., Calautti A., Francesconi V., Tonelli M., Schenone S., Fossa P. Probing In Silico the Benzimidazole Privileged Scaffold for the Development of Drug-like Anti-RSV Agents // *Pharmaceuticals.* – 2021. – Vol. 14, № 12. – P. 1307.

139. Cockerill G.S. JNJ-5371678, Defining a Role for Fusion Inhibitors in the Treatment of Respiratory Syncytial Virus // *J. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 63, № 15. – P. 8043–8045.

140. Roymans D., Alnajjar S. S., Battles M. B., Sitthicharoenchai P., Furmanova-Hollenstein P., Rigaux P., Berg J. V. D., Kwanten L., Ginderen M. V., Verheyen N., Vranckx L., Jaensch S., Arnoult E., Voorzaat R., Gallup J. M., Larios-Mora A., Crabbe M., Huntjens D., Raboisson P., Langedijk J. P., Ackermann M. R., McLellan J. S., Vendeville S., Koul A. Therapeutic efficacy of a respiratory syncytial virus fusion inhibitor // *Nat. Commun.* – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 167.

141. Cockerill G.S., Angell R. M., Bedernjak A., Chuckowree I., Fraser I., Gascon-Simorte J., Gilman M. S. A., Good J. A. D., Harland R., Johnson S. M., Ludes-Meyers J. H., Littler E., Lumley J., Lunn G., Mathews N., McLellan J. S., Paradowski M., Peeples M. E., Scott C., Tait D., Taylor G., Thom M., Thomas E., Barber C. V., Ward S. E., Watterson D., Williams G., Young P., Powell K. Discovery of Sisunatovir (RV521), an Inhibitor of Respiratory Syncytial Virus Fusion // *J. Med. Chem.* – 2021. – Vol. 64, № 7. – P. 3658–3676.

142. Feng S., Hong D., Wang B., Zheng X., Miao K., Wang L., Yun H., Gao L., Zhao S., Shen H. C. Discovery of Imidazopyridine Derivatives as Highly Potent Respiratory Syncytial Virus Fusion Inhibitors // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2015. – Vol. 6, № 3. – P. 359–362.

143. Cianci C., Langley D. R., Dischino D. D., Sun Y., Yu K. L., Stanley A., Roach J., Li Z., Dalterio R., Colonno R., Meanwell N. A., Krystal M. Targeting a binding pocket within the trimer-of-hairpins: Small-molecule inhibition of viral fusion // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 101, № 42. – P. 15046–15051.

144. DeVincenzo J. P., Sangi M., Sperandio D., Parrish J. P., Eisenberg E., Perron M., Hui H., Zhang L., Siegel D., Yang H., Saunders O., Booramra C., Lee G., Samuel D., Babaoglu K., Carey A., Gilbert B. E., Piedra P. A., Strickley R., Iwata Q., Hayes J., Stray K., Kinkade A., Theodore D., Jordan R., Desai

- M., Cihlar T. Oral GS-5806 Activity in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 371, № 8. – P. 711–722.
145. Mackman R. L., Sangi M., Sperandio D., Parrish J. P., Eisenberg E., Perron M., Hui H., Zhang L., Siegel D., Yang H., Saunders O., Booramra C., Lee G., Samuel D., Babaoglu K., Carey A., Gilbert B. E., Piedra P. A., Strickley R., Iwata Q., Hayes J., Stray K., Kinkade A., Theodore D., Jordan R., Desai M., Cihlar T. Discovery of an Oral Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Inhibitor (GS-5806) and Clinical Proof of Concept in a Human RSV Challenge Study // *J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 58, № 4. – P. 1630–1643.
146. Porter D. P., Guo Y., Perry J., Gossage D. L., Watkins T. R., Chien J. W., Jordan R. Assessment of Drug Resistance during Phase 2b Clinical Trials of Presatovir in Adults Naturally Infected with Respiratory Syncytial Virus // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2020. – Vol. 64, № 9. – P.e02312.
147. Lee J.E., Saphire E.O. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry // *Future Virol.* – 2009. – Vol. 4, № 6. – P. 621–635.
148. Hunt C.L., Lennemann N.J., Maury W. Filovirus Entry: A Novelty in the Viral Fusion World // *Viruses.* – 2012. – Vol. 4, № 2. – P. 258–275.
149. Jain S., Martynova E., Rizvanov A., Khaiboullina S., Barabwal M. Structural and Functional Aspects of Ebola Virus Proteins // *Pathogens.* – 2021. – Vol. 10, № 10. – P. 1330.
150. Cohen-Dvashi H., Zehner M., Ehrhardt S., Katz M., Elad N., Klein F., Diskin R. Structural Basis for a Convergent Immune Response against Ebola Virus // *Cell Host Microbe.* – 2020. – Vol. 27, № 3. – P. 418–427.e4.
151. Zhao Y., Ren J., Harlos K., Jones D. M., Zeltina A., Bowden T. A., Padilla-Parra S., Fry E. E., Stuart D. I. Toremifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein // *Nature.* – 2016. – Vol. 535, № 7610. – P. 169–172.
152. Martin B., Hoenen T., Canard B., Decroly E. Filovirus proteins for antiviral drug discovery: A structure/function analysis of surface glycoproteins and virus entry // *Antiviral Res.* – 2016. – Vol. 135. – P. 1–14.
153. Malashkevich V. N., Schneider B. J., McNally M. L., Milhollen M. A., Pang J. X., Kim P. S. Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 96, № 6. – P. 2662–2667.
154. Basu A., Li B., Mills D. M., Panchal R. G., Cardinale S. C., Butler M. M., Peet N. P., Majgier-Baranowska H., Williams J. D., Patel I., Moir D. T., Bavari S., Ray R., Farzan M. R., Rong L., Bowlin T. L. Identification of a Small-Molecule Entry Inhibitor for Filoviruses // *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85, № 7. – P. 3106–3119.
155. Nayal M., Honig B. On the nature of cavities on protein surfaces: Application to the identification of drug-binding sites // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* – 2006. – Vol. 63, № 4. – P. 892–906.

156. Halgren T. New Method for Fast and Accurate Binding-site Identification and Analysis // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2007. – Vol. 69, № 2. – P. 146–148.
157. Johansen L. M., DeWald L. E., Shoemaker C. J., Hoffstrom B. G., Lear-Rooney C. M., Stossel A., Nelson E., Delos S. E., Simmons J. A., Grenier J. M., Pierce L. T., Pajouhesh H., Lehár J., Hensley L. E., Glass P. J., White J. M., Olinger G. G. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 7, № 290. – P. ra89
158. Kouznetsova J., Sun W., Martínez-Romero C., Tawa G., Shinn P., Chen C. Z., Schimmer A., Sanderson P., McKew J. C., Zheng W., García-Sastre A. Identification of 53 compounds that block Ebola virus-like particle entry via a repurposing screen of approved drugs // *Emerg. Microbes Infect.* – 2014. – Vol. 3, № 1. – P. 1–7.
159. Wang Y., Cui R., Li G., Gao Q., Yuan S., Altmeyer R., Zou G. Teicoplanin inhibits Ebola pseudovirus infection in cell culture // *Antiviral Res.* – 2016. – Vol. 125. – P. 1–7.
160. Zhao Y., Ren J., Fry E. E., Xiao J., Townsend A. R., Stuart D. I. Structures of Ebola Virus Glycoprotein Complexes with Tricyclic Antidepressant and Antipsychotic Drugs // *J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 61, № 11. – P. 4938–4945.
161. Veljkovic V., Goeijenbier M., Glisic S., Veljkovic N., Perovic V. R., Sencanski M., Branch D. R., Paessler S. In silico analysis suggests repurposing of ibuprofen for prevention and treatment of EBOLA virus disease // *F1000Res.* – 2015. – Vol. 4. P. 104. – P. 1-18.
162. Anderson A.C. The Process of Structure-Based Drug Design // *Chem. Biol.* – 2003. – Vol. 10, № 9. – P. 787–797.
163. Ren J., Zhao Y., Fry E. E., Stuart D. Target Identification and Mode of Action of Four Chemically Divergent Drugs against Ebolavirus Infection // *J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 61, № 3. – P. 724–733.
164. Cui Q., Cheng H., Xiong R., Zhang G., Du R., Anantpadma M., Davey R. A., Rong L. Identification of Diaryl-Quinoline Compounds as Entry Inhibitors of Ebola Virus // *Viruses.* – 2018. – Vol. 10, № 12. – P. 678.
165. Shaikh F., Zhao Y., Alvarez L., Iliopoulou M., Lohans C., Schofield C. J., Padilla-Parra S., Siu S. W. I., Fry E. E., Ren J., Stuart D. I. Structure-Based in Silico Screening Identifies a Potent Ebolavirus Inhibitor from a Traditional Chinese Medicine Library // *J. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 62, № 6. – P. 2928–2937.
166. Plewe M. B., Sokolova N. V., Gantla V. R., Brown E. R., Naik S., Fetsko A., Lorimer D. D., Dranow D. M., Smutney H., Bullen J., Sidhu R., Master A., Wang J., Kallel E. A., Zhang L., Kalveram B., Freiberg A. N., Henkel G., McCormack K. Discovery of Adamantane Carboxamides as Ebola Virus Cell Entry and Glycoprotein Inhibitors // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2020. – Vol. 11, № 6. – P. 1160–1167.
167. Tsang N. Y., Li W. F., Varhegyi E., Rong L., Zhang H. J. Ebola Entry Inhibitors Discovered from Maesa perlaris // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 5. – P. 2620.

168. Singleton C. D., Humby M. S., Yi H. A., Rizzo R. C., Jacobs A. Identification of Ebola Virus Inhibitors Targeting GP2 Using Principles of Molecular Mimicry // *J. Virol.* – 2019. – Vol. 93, № 15. – P. e00676-19.
169. Schafer A., Xiong R., Cooper L., Nowar R., Lee H., Li Y., Ramirez B. E., Peet N. P., Caffrey M., Thatcher G. R. J., Saphire E. O., Cheng H., Rong L. Evidence for distinct mechanisms of small molecule inhibitors of filovirus entry // *PLOS Pathog.* – 2021. – Vol. 17, № 2. – P. e1009312.
170. Castaño-Rodríguez C., Honrubia J. M., Gutiérrez-Álvarez J., DeDiego M. L., Nieto-Torres J. L., Jimenez-Guardeño J. M., Regla-Nava J. A., Fernandez-Delgado R., Verdía-Báguena C., Queralt-Martín M., Kochan G., Perlman S., Aguilella V. M., Sola I., Enjuanes L. Role of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporins E, 3a, and 8a in Replication and Pathogenesis // *MBio* – 2018. – Vol. 9, № 3. – P. e02325-17.
171. Gan S.-W., Tan E., Lin X., Yu D., Wang J., Tan G. M., Vararattanavech A., Yeo C. Y., Soon C. H., Soong T. W., Pervushin K., Torres J. The Small Hydrophobic Protein of the Human Respiratory Syncytial Virus Forms Pentameric Ion Channels // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 29. – P. 24671–24689.
172. Strebel K. HIV-1 Vpu — an ion channel in search of a job // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2014. – Vol. 1838, № 4. – P. 1074–1081.
173. To J., Torres J. Viroporins in the Influenza Virus // *Cells.* – 2019. – Vol. 8, № 7. – P. 654.
174. Jalily P. H., Duncan M. C., Fedida D., Wang J., Tietjen I. Put a cork in it: Plugging the M2 viral ion channel to sink influenza // *Antiviral Res.* – 2020. – Vol. 178. – P. 104780.
175. Watkins L. C., DeGrado W. F., Voth G. A. Influenza A M2 Inhibitor Binding Understood through Mechanisms of Excess Proton Stabilization and Channel Dynamics // *J. Am. Chem. Soc.* – 2020. – Vol. 142, № 41. – P. 17425–17433.
176. Balgi A. D., Wang J., Cheng D. Y., Ma C., Pfeifer T. A., Shimizu Y., Anderson H. J., Pinto L. H., Lamb R. A., DeGrado W. F., Roberge M. Inhibitors of the Influenza A Virus M2 Proton Channel Discovered Using a High-Throughput Yeast Growth Restoration Assay // *PLoS One* – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. e55271.
177. Schnell J. R., Chou J. J. Structure, and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus // *Nature.* – 2008. – Vol. 451, № 7178. – P. 591–595.
178. Leiding T., Wang J., Martinsson J., DeGrado W. F., Arsköld S. Proton and cation transport activity of the M2 proton channel from influenza A virus // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – Vol. 107, № 35. – P. 15409–15414.
179. Stauffer S., Feng Y., Nebioglu F., Heilig R., Picotti P., Helenius A. Stepwise Priming by Acidic pH and a High K⁺ Concentration Is Required for Efficient Uncoating of Influenza A Virus Cores after Penetration // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88, № 22. – P. 13029–13046.

180. Liang R., Li H., Swanson J. M., Voth G. A. Multiscale simulation reveals a multifaceted mechanism of proton permeation through the influenza A M2 proton channel // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2014. – Vol. 111, № 26. – P. 9396–9401.
181. Stouffer A. L., Acharya R., Salom D., Levine A. S., Di Costanzo L., Soto C. S., Tereshko V., Nanda V., Staybrook S., DeGrado W. F. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel // *Nature*. – 2008. – Vol. 451, № 7178. – P. 596–599.
182. Davies W. L., Grunert R. R., Haff R. F., McGahen J. W., Neumayer E. M., Paulshock M., Watts J. C., Wood T. R., Hermann E. C., Hoffmann C. E. Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine) // *Science*. – 1964. – Vol. 144, № 3620. – P. 862–863.
183. Bright R. A., Medina M. J., Xu X., Perez-Oronoz G., Wallis T. R., Davis X. M., Povinelli L., Cox N. J., Klimov A.I. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern // *Lancet*. – 2005. – Vol. 366, № 9492. – P. 1175–1181.
184. Wang J., Wu Y., Ma C., Fiorin G., Wang J., Pinto L. H., Lamb R. A., Klein M. L., DeGrado W. F. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2013. – Vol. 110, № 4. – P. 1315–1320.
185. Li F., Ma Ch., DeGrado W. F., Wang J. Discovery of Highly Potent Inhibitors Targeting the Predominant Drug-Resistant S31N Mutant of the Influenza A Virus M2 Proton Channel // *J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 59, № 3. – P. 1207–1216.
186. Wu Y., Canturk B., Jo H., Ma C., Gianti E., Klein M. L., Pinto L. H., Lamb R. A., Fiorin G., Wang J., DeGrado W. F. Flipping in the Pore: Discovery of Dual Inhibitors That Bind in Different Orientations to the Wild-Type versus the Amantadine-Resistant S31N Mutant of the Influenza A Virus M2 Proton Channel // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – Vol. 136, № 52. – P. 17987–17995.
187. Wang J., Ma C., Fiorin G., Carnevale V., Wang T., Hu F., Lamb R. A., Pinto L. H., Hong M., Klein M. L., DeGrado W. F. Molecular Dynamics Simulation Directed Rational Design of Inhibitors Targeting Drug-Resistant Mutants of Influenza A Virus M2 // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 133, № 32. – P. 12834–12841.
188. Rey-Carrizo M., Barniol-Xicota M., Ma C., Frigolé-Vivas M., Torres E., Naesens L., Llabrés S., Juárez-Jiménez J., Luque F. J., DeGrado W. F., Lamb R. A., Pinto L. H., Vázquez S. et al. Easily Accessible Polycyclic Amines that Inhibit the Wild-Type and Amantadine-Resistant Mutants of the M2 Channel of Influenza A Virus // *J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 57, № 13. – P. 5738–5747.
189. Zhao X., Jie Y., Rosenberg M. R., Wan J., Zeng S., Cui W., Xiao Y., Li Z., Tu Z., Gasarotto M. G., Hu W. et al. Design and synthesis of pinanamine derivatives as anti-influenza A M2 ion channel inhibitors // *Antiviral Res.* – 2012. – Vol. 96, № 2. – P. 91–99.
190. Balannik V., Wang J., Ohigashi Y., Jing X., Magavern E., Lamb R. A., DeGrado W. F., Pinto L.

- H. Design and Pharmacological Characterization of Inhibitors of Amantadine-Resistant Mutants of the M2 Ion Channel of Influenza A Virus // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48, № 50. – P. 11872–11882.
191. To J., Surya W., Torres J. Targeting the Channel Activity of Viroporins // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* – 2016. – Vol. 104. – P. 307–355.
192. Pielak R.M., Schnell J.R., Chou J.J. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 106, № 18. – P. 7379–7384.
193. Thomaston J. L., Konstantinidi A., Liu L., Lambrinidis G., Tan J., Caffrey M., Wang J., DeGrado W. F., Kolocouris A. X-ray Crystal Structures of the Influenza M2 Proton Channel Drug-Resistant V27A Mutant Bound to a Spiro-Adamantyl Amine Inhibitor Reveal the Mechanism of Adamantane Resistance // *Biochemistry*. – 2020. – Vol. 59, № 4. – P. 627–634.
194. Thomaston J. L., Polizzi N. F., Konstantinidi A., Wang J., Kolocouris A., DeGrado W. F. Inhibitors of the M2 Proton Channel Engage and Disrupt Transmembrane Networks of Hydrogen-Bonded Waters // *J. Am. Chem. Soc.* – 2018. – Vol. 140, № 45. – P. 15219–15226.
195. Leonov H., Astrahan P., Krugliak M., Arkin I. T. How Do Aminoadamantanes Block the Influenza M2 Channel, and How Does Resistance Develop? // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 133, № 25. – P. 9903–9911.
196. Watkins L.C., DeGrado W.F., Voth G.A. Multiscale Simulation of an Influenza A M2 Channel Mutant Reveals Key Features of Its Markedly Different Proton Transport Behavior // *J. Am. Chem. Soc.* – 2022. – Vol. 144, № 2. – P. 769–776.
197. DiEuliis D., Berger K., Gronvall G. Biosecurity Implications for the Synthesis of Horsepox, an Orthopoxvirus // *Heal. Secur.* – 2017. – Vol. 15, № 6. – P. 629–637.
198. Sklenovská N., Van Ranst M. Emergence of Monkeypox as the Most Important Orthopoxvirus Infection in Humans // *Front. Public Heal.* – 2018. – Vol. 6. – P. 241.
199. Smith G.L., Vanderplasschen A., Law M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus // *J. Gen. Virol.* – 2002. – Vol. 83, № 12. – P. 2915–2931.
200. Chen Y., Honeychurch K. M., Yang G., Byrd C. M., Harver C., Hruby D. E., Jordan R. Vaccinia virus p37 interacts with host proteins associated with LE-derived transport vesicle biogenesis // *Virol. J.* – 2009. – Vol. 6, № 1. – P. 44.
201. Blasco R., Lorenzo M. M., Sánchez-Puig J. M., Blasco R. Sequence and analysis of a swinepox virus homologue of the vaccinia virus major envelope protein P37 (F13L) // *J. Gen. Virol.* – 2000. – Vol. 81, № 4. – P. 1073–1085.
202. Yang G., Pevear D. C., Davies M. H., Collett M. S., Bailey T., Rippen S., Barone L., Burns C., Rhodes G., Tohan S., Huggins J. W., Baker R. O., Buller R. L., Touchette E., Waller K., Schriewer J., Neyts J., DeClercq E., Jones K., Hruby D., Jordan R. An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal Orthopoxvirus

Challenge // J. Virol. – 2005. – Vol. 79, № 20. – P. 13139–13149.

203. Ponting C.P., Kerr I.D. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: Identification of duplicated repeats and potential active site residues // Protein Sci. – 1996. – Vol. 5, № 5. – P. 914–922.

204. Roper R.L., Moss B. Envelope Formation Is Blocked by Mutation of a Sequence Related to the HKD Phospholipid Metabolism Motif in the Vaccinia Virus F13L Protein // J. Virol. – 1999. – Vol. 73, № 2. – P. 1108–1117.

205. Grosenbach D.W., Jordan R., Hruby D.E. Development of the small-molecule antiviral ST-246® as a smallpox therapeutic // Future Virol. – 2011. – Vol. 6, № 5. – P. 653–671.

206. Duraffour S., Lorenzo M. M., Zöller G., Topalis D., Grosenbach D., Hruby D. E., Andrei G., Blasco R., Meyer H., Snoeck R. ST-246 is a key antiviral to inhibit the viral F13L phospholipase, one of the essential proteins for orthopoxvirus wrapping // J. Antimicrob. Chemother. – 2015. – Vol. 70, № 5. – P. 1367–1380.

207. Shiryayev V. A., Skomorohov M. Y., Leonova M. V., Bormotov N. I., Serova O. A., Shishkina L. N., Agafonov A. P., Maksyutov R. A., Klimochkin Y. N. Adamantane derivatives as potential inhibitors of p37 major envelope protein and poxvirus reproduction. Design, synthesis and antiviral activity // Eur. J. Med. Chem. – 2021. – Vol. 221. – P. 113485.

208. Leiros I., McSweeney S., Hough E. The Reaction Mechanism of Phospholipase D from Streptomyces sp. Strain PMF. Snapshots along the Reaction Pathway Reveal a Pentacoordinate Reaction Intermediate and an Unexpected Final Product // J. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 339, № 4. – P. 805–820.

209. Wanka L., Iqbal K., Schreiner P.R. The Lipophilic Bullet Hits the Targets: Medicinal Chemistry of Adamantane Derivatives // Chem. Rev. – 2013. – Vol. 113, № 5. – P. 3516–3604.

210. Kolocouris A., Dimas K., Pannecouque C., Witvrouw M., Foscolos G. B., Stamatiou G., Fytas G., Zoidis G., Kolocouris N., Andrei G., Snoeck R., De Clercq E. New 2-(1-adamantylcarbonyl)pyridine and 1-acetyladamantane thiosemicarbazones–thiocarbonohydrazones: cell growth inhibitory, antiviral and antimicrobial activity evaluation // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2002. – Vol. 12, № 5. – P. 723–727.

211. Banie H., Sinha A., Thomas R. J., Sircar J. C., Richards M. L. 2-Phenylimidazopyridines, a New Series of Golgi Compounds with Potent Antiviral Activity // J. Med. Chem. – 2007. – Vol. 50, № 24. – P. 5984–5993.

212. Klimochkin Y.N., Shiryayev V.A., Leonova M. V. Antiviral properties of cage compounds. New prospects // Russ. Chem. Bull. – 2015. – Vol. 64, № 7. – P. 1473–1496.

213. Jordan R., Leeds J. M., Tyavangimatt S., Hruby D. E. Development of ST-246® for Treatment of Poxvirus Infections // Viruses. – 2010. – Vol. 2, № 11. – P. 2409–2435.

214. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // J. Comput. Chem. – 2010. – Vol. 32, № 2.

– P. 455-461.

215. Ramachandran, K.I., Deepa, G., Namboori K. Computational Chemistry and Molecular Modeling. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. 405 p.
216. Ferreira L., Dos Santos R. N., Oliva G., Andricopulo A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, № 7. – P. 13384–13421.
217. Batool M., Ahmad B., Choi S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 11. – P. 2783.
218. Song C. M., Lim S.J., Tong J.C. Recent advances in computer-aided drug design // *Brief. Bioinform.* – 2009. – Vol. 10, № 5. – P. 579–591.
219. Anfinsen C. B. Principles that Govern the Folding of Protein Chains // *Science*. – 1973. – Vol. 181, № 4096. – P. 223–230.
220. Dill K. A., Ozkan S. B., Shell M. S., Weiki T. R. The Protein Folding Problem // *Annu. Rev. Biophys.* – 2008. – Vol. 37, № 1. – P. 289–316.
221. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S. A. A., Ballard A. J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A. W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature*. – 2021. – Vol. 596, № 7873. – P. 583–589.
222. Mariani V., Biasini M., Barbato A., Schwede T. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29, № 21. – P. 2722–2728.
223. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all // *Nat. Methods*. – 2022. – Vol. 19, № 6. – P. 679–682.
224. Baek M., DiMaio F., Anishchenko I., Dauparas J., Ovchinnikov S., Lee G. R., Wang J., Cong Q., Kinch L. N., Schaeffer R. D., Millán C., Park H., Adams C., Glassman C. R., DeGiovanni A., Pereira J. H., Rodrigues A. V., van Dijk A. A., Ebrecht A. C., Opperman D. J., Sagmeister T., Buhlheller C., Pavkov-Keller T., Rathinaswamy M. K., Dalwadi U., Yip C. K., Burke J. E., Garcia K. C., Grishin N. V., Adams P. D., Read R. J., Baker D. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network // *Science*. – 2021. – Vol. 373, № 6557. – P. 871–876.
225. Steinegger M., Mirdita M., Söding J. Protein-level assembly increases protein sequence recovery from metagenomic samples manyfold // *Nat. Methods*. – 2019. – Vol. 16, № 7. – P. 603–606.
226. Steinegger M., Söding J. Clustering huge protein sequence sets in linear time // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 2542.
227. Pearlman D. A., Cheatham T. E., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K. M., Onufriev A.,

- Simmerling C., Wang B. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules // *Comput. Phys. Commun.* – 1995. – Vol. 91, № 1–3. – P. 1–41.
228. Brooks B. R., Brooks C. L. 3rd, Mackerell A. D. Jr, Nilsson L., Petrella R. J., Roux B., Won Y., Archontis G., Bartels C., Boresch S., Caflisch A., Caves L., Cui Q., Dinner A. R., Feig M., Fischer S., Gao J., Hodoscek M., Im W., Kuczera K., Lazaridis T., Ma J., Ovchinnikov V., Paci E., Pastor R. W., Post C. B., Pu J. Z., Schaefer M., Tidor B., Venable R. M., Woodcock H. L., Wu X., Yang W., York D. M., Karplus M. CHARMM: The biomolecular simulation program // *J. Comput. Chem.* – 2009. – Vol. 30, № 10. – P. 1545–1614.
229. Lu C., Wu Ch., Ghoreishi D., Chen W., Wang L., Damm W., Ross G. A., Dahlgren M. K., Russell E., Von Bargen C. D., Abel R., Friesner R. A., Harder E. D. OPLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space // *J. Chem. Theory Comput.* – 2021. – Vol. 17, № 7. – P. 4291–4300.
230. Mannige R. V. An exhaustive survey of regular peptide conformations using a new metric for backbone handedness (χ) // *PeerJ.* – 2017. – Vol. 5. – P. e3327.
231. An J., Totrov M., Abagyan R. Pocketome via Comprehensive Identification and Classification of Ligand Binding Envelopes // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2005. – Vol. 4, № 6. – P. 752–761.
232. Laurie A. T. R., Jackson R. M. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites // *Bioinformatics.* – 2005. – Vol. 21, № 9. – P. 1908–1916.
233. Halgren T. A. Identifying and Characterizing Binding Sites and Assessing Druggability // *J. Chem. Inf. Model.* – 2009. – Vol. 49, № 2. – P. 377–389.
234. Hartenfeller M., Schneider G. De Novo Drug Design // *Methods Mol. Bio.* – 2011. – Vol. 672. – P. 299–323.
235. Friesner R. A., Banks J. L., Murphy R. B., Halgren T. A., Klicic J. J., Mainz D. T., Repasky M. P., Knoll E. H., Shelley M., Perry J. K., Shaw D. E., Francis P., Shenkin P. S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47, № 7. – P. 1739–1749.
236. Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2015. – Vol. 10, № 5. – P. 449–461.
237. Ode H., Nakashima M., Kitamura S., Sugiura W., Sato H. Molecular dynamics simulation in virus research // *Frontiers in Microbiology.* – 2012. – Vol. 3. – P. 258.
238. Laio A., Parrinello M. Escaping free-energy minima // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 99, № 20. – P. 12562–12566.
239. Zhao H., Caflisch A. Molecular dynamics in drug design // *Eur. J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 91. – P. 4–14.

240. Lin X., Li X., Lin X. A review on applications of computational methods in drug screening and design // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 6. – P.1375.
241. Prieto-Martínez F. D., Lopez-Lopez E., Juarez-Mercado K. E., Medina-Franco J. L. Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives // *In Silico Drug Design*. – 2019. – P. 19–44.
242. Hagan M. F., Zandi R. Recent advances in coarse-grained modeling of virus assembly // *Curr. Opin. Virol.* – 2016. – Vol. 18. – P. 36–43.
243. Xu R., Ekiert D. C., Krause J. C., Hai R., Crowe J. E. Jr, Wilson I. A. Structural Basis of Preexisting Immunity to the 2009 H1N1 Pandemic Influenza Virus // *Science*. – 2010. – Vol. 328, № 5976. – P.357-360.
244. Yang H., Chen L. M., Carney P. J., Donis R. O., Stevens J. Structures of Receptor Complexes of a North American H7N2 Influenza Hemagglutinin with a Loop Deletion in the Receptor Binding Site // *PLoS Pathog.* – 2010. – Vol. 6, № 9. – P. e1001081.
245. Zhang W., Shi Y., Lu X., Shu Y., Qi J., Gao G. F. An Airborne Transmissible Avian Influenza H5 Hemagglutinin Seen at the Atomic Level // *Science*. – 2013. – Vol. 340, № 6139. – P. 1463–1467.
246. Cady S. D., Schmidt-Rohr K., Wang L., Soto C. S., DeGrado W. F., Hong M. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers // *Nature*. – 2010. – Vol. 385, № 7281. – P. 689–692.
247. Wang Y., Chen Y., Prevost J., Ullah I., Lu M., Gong Sh. Y., Tauzin A., Gasser R., Vezina D., Ahand S. P., Goyette G., Chatterjee D., Ding Sh., Tolbert W. D., Grunst M. W., Bo Yu., Zhang Sh., Richard J., Zhou F., Huang R. K., Esser L., Zeher A., Cote M., Kumar P., Sodroski J., Xia D., Uchil P. D., Pazgier M., Finzi A., Mothes W. Structural basis for SARS-CoV-2 Delta variant recognition of ACE2 receptor and broadly neutralizing antibodies // *Nat. Commun.* – 2022. – Vol. 13, № 1.– P. 871.
248. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Petersson G. A., Nakatsuji H.; Li X., Caricato M., Marenich A. V., Bloino J., Janesko B. G., Gomperts R., Mennucci B., Hratch D.J. GAUSSIAN: Revision C.01. Wallingford CT: Gaussian, Inc., 2016.
249. Zhao Y., Schultz N.E., Truhlar D.G. Design of Density Functionals by Combining the Method of Constraint Satisfaction with Parametrization for Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions // *J. Chem. Theory Comput.* – 2006. – Vol. 2, № 2. – P. 364–382.
250. Grimme S., Antony J., Ehrlich S., Krieg H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu // *J. Chem. Phys.* – 2010. – Vol. 132, № 15. – P. 154104.
251. Schäfer A., Huber C., Ahlrichs R. Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr // *J. Chem. Phys.* – 1994. – Vol. 100, № 8. – P. 5829–5835.

252. Bochevarov A. D., Harder E., Hughes T. F., Greenwood J. R., Braden D. A., Philipp D. M., Rinaldo D., Halls M. D., Zhang J., Friesner R. A. Jaguar: A high-performance quantum chemistry software program with strengths in life and materials sciences // *Int. J. Quantum Chem.* – 2013. – Vol. 113, № 18. – P. 2110–2142.
253. Bochevarov A. D., Watson M. A., Greenwood J. R., Philipp D. M. Multiconformation, Density Functional Theory-Based p K a Prediction in Application to Large, Flexible Organic Molecules with Diverse Functional Groups // *J. Chem. Theory Comput.* – 2016. – Vol. 12, № 12. – P. 6001–6019.
254. Henderson L.J. Concerning the relationship between the strength of the acids and their capacity to the preserve neutrality // *Am. J. Physiol. Content.* – 1908. – Vol. 21, № 2. – P. 173–179.
255. Po H. N., Senozan N. M. The Henderson-Hasselbalch Equation: Its History and Limitations // *J. Chem. Educ.* – 2001. – Vol. 78, № 11. – P. 1499.
256. Eldridge M. D., Murray C. W., Auton T. R., Paolini G. V., Mee R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* – 1997. Vol. 11, № 5. – P. 425–445.
257. Sherman W., Beard H. S., Farid R. Use of an Induced Fit Receptor Structure in Virtual Screening // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2006. – Vol. 67, № 1. – P. 83–84.
258. Becke A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange // *J. Chem. Phys.* – 1993. – Vol. 98, № 7. – P. 5648–5652.
259. Petersson G. A., Al-Laham M. A. A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms // *J. Chem. Phys.* – 1991. – Vol. 94, № 9. – P. 6081–6090.
260. Baltina L. A., Lai H. C., Liu Y. C., Huang S. H., Hour M. J., Baltina L. A., Nugumanov T. R., **Borisevich S. S.**, Khalilov L. M., Petrova S. F., Khursan S. L., Lin C. W. Glycyrrhetic acid derivatives as Zika virus inhibitors: Synthesis and antiviral activity in vitro // *Bioorganic Med. Chem.* – 2021. – Vol. 41, № 4. – P. 116204.
261. Valdés-Barrera I. D., Cuca-Suarez L. E., Coy-Barrera E. D. Nectandra amazonum-derived flavonoids as COX-1 inhibitors: in vitro and docking studies. // *Nat. Prod. Commun.* – 2014. – Vol. 9, № 5. – P. 649–652.
262. Al-Blewi F. F., Rezki N., Al-Sodies S. A., Bardaweel S. K., Sabbah D. A., Messali M., Aourad M. R. Novel amphiphilic pyridinium ionic liquids-supported Schiff bases: ultrasound assisted synthesis, molecular docking and anticancer evaluation // *Chem. Cent. J.* – 2018. – Vol. 12, № 1. – P. 118.
263. Dan N. T., Quang H. D., Van Truong V., Huu Nghi D., Cuong N. M., Cuong T. D., Toan T. Q., Bach L. G., Anh N. H. T., Mai N. T., Lan N. T., Van Chinh L., Quan P. M. e Design, synthesis, structure, in vitro cytotoxic activity evaluation and docking studies on target enzyme GSK-3 β of new indirubin-3'-oxime derivatives // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 11429.
264. Bülbül E. F., Melesina J. , Ibrahim H. S., Abdelsalam M., Vecchio A., Robaa D., Zessin M.,

- Schutkowski M., Sippl W. Docking, Binding Free Energy Calculations and In Vitro Characterization of Pyrazine Linked 2-Aminobenzamides as Novel Class I Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 8. – P. 2526.
265. Artyushin O. I., Moiseeva A. A., Zarubaev V. V., Slita A. V., Galochkina A. V., Muryleva A. A., **Borisevich S. S.**, Yarovaya O. I., Salakhutdinov N. F., Brel V. K. Synthesis of Camphene and Cytisine Conjugates Using Click Chemistry Methodology and Study of Their Antiviral Activity // *Chemistry & Biodiversity* – 2019. – Vol.16. No.11. – P. e1900340.
266. Yang Y., Yang P., Wang N., Chen Z., Su D., Zhou Z. H., Rao Z., Wang X. Architecture of the herpesvirus genome-packaging complex and implications for DNA translocation // *Protein Cell*. – 2020. – Vol. 11, № 5. – P. 339–351.
267. Zhong H. A., Almahmoud S. Docking and Selectivity Studies of Covalently Bound Janus Kinase 3 Inhibitors // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 7. – P. 6023.
268. Burlingham B. T., Widlanski T. S. An Intuitive Look at the Relationship of K_i and IC_{50} : A More General Use for the Dixon Plot // *J. Chem. Educ.* – 2003. – Vol. 80, № 2. – P. 214.
269. Aloia R. C., Tian H., Jensen F. C. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1988. – Vol. 85, № 3. – P. 900–904.
270. Satoh O., Imai H., Yoneyama T., Miyamura T., Utsumi H., Inoue K., Umeda M. Membrane Structure of the Hepatitis B Virus Surface Antigen Particle // *J. Biochem.* – 2000. – Vol. 127, № 4. – P. 543–550.
271. **Borisevich S. S.**, Gureev M. A., Yarovaya O. I., Zarubaev V. V., Kostin G. A., Salakhutdinov N. F.: Can molecular dynamics explain decreased pathogenicity in mutant camphene-resistant influenza virus? // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2022. – Vol. 40. No.12. – P. 5481-5492
272. Shanshin D. V., **Borisevich S. S.**, Bondar A. A., Porozov Y. B., Rukhlova E. A., Protopopova E. V., Ushkalenko N. D., Loktev V. B., Chapoval A. I., Ilyichev A. A., Shcherbakov D. N. Can Modern Molecular Modeling Methods Help Find the Area of Potential Vulnerability of Flaviviruses? // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 14. – P. 7721.
273. Frey B. J., Dueck D. Clustering by Passing Messages Between Data Points // *Science*. – 2007. – Vol. 315, № 5814. – P. 972–976.
274. Ilyina I. V., Zarubaev V. V., Lavrentieva I. N., Shtro A. A., Esaulkova I. L., Korchagina D. V., **Borisevich S. S.**, Volcho K. P., Salakhutdinov N. F. Highly potent activity of isopulegol-derived substituted octahydro-2H-chromen-4-ols against influenza A and B viruses // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2018. – Vol. 28. No.11. – P. 2061-2067.
275. Khomenko T. M., Zarubaev V. V., Kireeva M. V., Volobueva A. S., Slita A. V., **Borisevich S. S.**, Korchagina D. V., Komarova N. I., Volcho K. P., Salakhutdinov N. F. New type of anti-influenza agents based on benzo[d][1,3]dithiol core // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2020. – Vol. 30. No.24. P.

127653.

276. Ilyina I. V., Patrusheva O. S., Zarubaev V. V., Misiurina M. A., Slita A. V., Esaulkova I. L., Korchagina D. V., Gatilov Yu. V., **Borisevich S. S.**, Volcho K. P., Salakhutdinov N. F. Influenza antiviral activity of F- and OH-containing isopulegol-derived octahydro-2H-chromenes // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2021. – Vol. 31. – P. 127677.
277. Zarubaev V. V., Pushkina E. A., **Borisevich S. S.**, Galochkina A. V., Garshinina A. V., Shtro A. A., Egorova A. A., Sokolova A. S., Khursan S. L., Yarovaya O. I., Salakhutdinov N. F. Selection of influenza virus resistant to the novel camphor-based antiviral camphocene results in loss of pathogenicity // *Virology* – 2018. – Vol. 524. – P. 69-77.
278. Sokolova A. S., Yarovaya O. I., Baranova D. V., Galochkina A. V., Shtro A. A., Kireeva M. V., **Borisevich S. S.**, Gatilov Yu. V., Zarubaev V. V., Salakhutdinov N. F.: Quaternary ammonium salts based on (-)-borneol as effective inhibitors of influenza virus. // *Arch.Virol.* – 2021. – Vol.166. – P. 1965-1976.
279. Chernyshov V. V., Yarovaya O. I., Esaulkova I. L., Sinegubova E., **Borisevich S. S.**, Popadyuk I. I., Zarubaev V. V., Salakhutdinov N. F. Novel O-acylated amidoximes and substituted 1,2,4-oxadiazoles synthesised from (+)-ketopinic acid possessing potent virus-inhibiting activity against phylogenetically distinct influenza A viruses // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2022. – Vol. 55. No.1. – P. 128565 280.
280. Volobueva A.S., Yarovaya O. I., Kireeva M. V., **Borisevich S. S.**, Kovaleva K. S., Mainagashev I. Ya., Gatilov Yu. V., Ilyina M. G., Zarubaev V. V., Salakhutdinov N. F. Discovery of New Ginsenol-Like Compounds with High Antiviral Activity // *Molecules* – 2021. – Vol. 26, No. 22. – P. 6794 (Q2).
281. Yarovaya O. I., Kovaleva K. S., **Borisevich S. S.**, Rybalova T. V., Gatilov Yu.V., Sinegubova E. O., Volobueva A. S., Zarubaev V. V., Salakhutdinov N. F. Synthesis, and antiviral properties of tricyclic amides derived from α -humulene and β -caryophyllene // *Mendeleev Commun.* – 2022. – Vol.32. No.5. P. 609–611.
282. Sokolova A. S., Yarovaya O. I., Shernyukov A. V., Gatilov Y. V., Razumova Y. V., Zarubaev V. V., Tretiak T. S., Pokrovsky A. G., Kiselev O. I., Salakhutdinov N. F. Discovery of a new class of antiviral compounds: Camphor imine derivatives // *Eur. J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 105. – P. 263–273.
283. Zarubaev V. V., Garshinina A. V., Tretiak T. S., Fedorova V. A. , Shtro A. A., Sokolova A. S., Yarovaya O. I., Salakhutdinov N. F. Broad range of inhibiting action of novel camphor-based compound with anti-hemagglutinin activity against influenza viruses in vitro and in vivo // *Antiviral Res.* – 2015. – Vol. 120. – P. 126–133.
284. Drakopoulos A., Tzitzoglaki C., Ma C., Freudenberger K., Hoffmann A., Hu Y., Gauglitz G., Schmidtke M., Wang J. Kolocouris A. Affinity of Rimantadine Enantiomers against Influenza A/M2

Protein Revisited // ACS Med. Chem. Lett. – 2017. – Vol. 8, № 2. – P. 145–150.

285. Тандура С. Н., Зарубаев В. В., Анфимо П. М., Киселев О.И. Противогриппозный препарат Дейтифорин // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. Т. 58. – С. 1–3.

286. Yarovaya O. I., Kovaleva K. S., Zaykovskaya A. A., Yashina L. N., Scherbakova N. S., Scherbakov D. N., **Borisevich S. S.**, Zubkov F. I., Antonova A. S., Peshkov R. Yu., Eltsov I. V., Pyankov O. V., Maksyutov R. A., Salakhutdinov N. F. New class of hantaan virus inhibitors based on conjugation of the isoindole fragment to (+)-camphor or (–)- fenchone hydrazone // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2021. – Vol. 40. No.15. – P. 127926.

287. Lin X., Noel J. K., Wang Q., Ma J., Onuchic J. N. Atomistic simulations indicate the functional loop-to-coiled-coil transition in influenza hemagglutinin is not downhill // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2018. – Vol. 115, № 34. – P. E7905-E7913.

288. Cho K. J., Lee J. H., Hong K. W., Kim S. H., Park Y., Lee J. Y., Kang S., Kim S., Yang J. H., Kim E. K., Seok J. H., Unzai S., Park S. Y., Saelens X., Kim C. J., Lee J. Y., Kang C., Oh H. B., Chung M. S., Kim K. H. Insight into structural diversity of influenza virus haemagglutinin // J. Gen. Virol. – 2013. – Vol. 94, № 8. – P. 1712–1722.

289. Matrosovich M., Klenk H.-D. Natural and synthetic sialic acid-containing inhibitors of influenza virus receptor binding // Rev. Med. Virol. – 2003. – Vol. 13, № 2. – P. 85-97.

290. Dreyfus C., Laursen N. S., Kwaks T., Zuijdgeest D., Khayat R., Ekiert D. C., Lee J. H., Metlagel Z., Bujny M. V., Jongeneelen M., van der Vlugt R., Lamrani M., Korse H. J., Geelen E., Sahin Ö., Sieuwerts M., Brakenhoff J. P., Vogels R., Li O. T., Poon L. L., Peiris M., Koudstaal W., Ward A. B., Wilson I. A., Goudsmit J., Friesen R. H. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses // Science. – 2012. – Vol. 337, № 6100. – P. 1343–1348.

291. López-López E., Fernández-de Gortari E., Medina-Franco J.L. Yes SIR! On the structure–inactivity relationships in drug discovery // Drug Discov. Today. – 2022. – Vol. 27, №8. – P. 2353-2362.

292. **Borisevich S. S.**, Gureev M. A. Camphene and ginsamide: dynamics of potential interactions with the influenza virus M2 channel // Russ. Chem. Bull. – 2023. – Vol. 72, № 10. – P. 2548–2558.

293. **Borisevich S. S.**, Khamitov E. M., Gureev M. A., Yarovaya O. I., Rudometova N. B., Zybkina A. V., Mordvinova E. D., Shcherbakov D. N., Maksyutov R. A., Salakhutdinov N. F. Simulation of Molecular Dynamics of SARS-CoV-2 S-Protein in the Presence of Multiple Arbidol Molecules: Interactions and Binding Mode Insights // Viruses – 2022. – Vol.14. No.1. – P.119.

294. Dorr P., Westby M., Dobbs S., Griffin P., Irvine B., Macartney M., Mori J., Rickett G., Smith-Burchnell C., Napier C., Webster R., Armour D., Price D., Stammen B., Wood A., Perros M. Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49, № 11. – P. 4721–4732.

295. Tan Y. S., Verma C. S. Straightforward Incorporation of Multiple Ligand Types into Molecular Dynamics Simulations for Efficient Binding Site Detection and Characterization // *J. Chem. Theory Comput.* – 2020. – Vol. 16, № 10. – P. 6633–6644.
296. Fratev F., Steinbrecher T., Jónsdóttir S.Ó. Prediction of Accurate Binding Modes Using Combination of Classical and Accelerated Molecular Dynamics and Free-Energy Perturbation Calculations: An Application to Toxicity Studies // *ACS Omega.* – 2018. – Vol. 3, № 4. – P. 4357–4371.
297. Blaising J., Polyak S.J., Pécheur E.-I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: An update // *Antiviral Res.* – 2014. – Vol. 107, № 1. – P. 84–94.
298. Zhao P., Praissman J. L., Grant O. C., Cai Y., Xiao T., Rosenbalm K. E., Aoki K., Kellman B. P., Bridger R., Barouch D. H., Brindley M. A., Lewis N. E., Tiemeyer M., Chen B., Woods R. J., Wells L. Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor // *Cell Host Microbe.* – 2020. – Vol. 28, № 4. – P. 586-601.e6.
299. Turoňová B., Sikora M., Schürmann C., Hagen W. J. H., Welsch S., Blanc F. E. C., von Bülow S., Gecht M., Bagola K., Hörner C., van Zandbergen G., Landry J., de Azevedo N. T. D., Mosalaganti S., Schwarz A., Covino R., Mühlebach M. D., Hummer G., Krijnse Locker J., Beck M. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges // *Science.* – 2020. – Vol. 370, № 6513. – P. 203–208.
300. Shuster A., Pechalieu D., Jackson C. B., Abegg D., Choe H., Adibekian A. Clinical Antiviral Drug Arbidol Inhibits Infection by SARS-CoV-2 and Variants through Direct Binding to the Spike Protein // *ACS Chem. Biol.* – 2021. – Vol. 16, № 12. – P. 2845–2851.
301. Yarovaya O. I., Shcherbakov D. N., **Borisevich S. S.**, Sokolova A. S., Gureev M. A., Khamitov E. M., Rudometova N. B., Zybkina A. V., Mordvinova E. D., Zaykovskaya A. V., Rogachev A. D., Pyankov O. V., Maksyutov R. A., Salakhutdinov N. F. Borneol Ester Derivatives as Entry Inhibitors of a Wide Spectrum of SARS-CoV-2 Viruses // *Viruses* – 2022. – Vol.14. No.6. – P.1295
302. Sokolova A. S., Yarovaya O. I., Semenov M. D., Shtro A. A., Orshanskaya I. R., Zarubaev V. V., Salakhutdinov N. F. Synthesis and in vitro study of novel borneol derivatives as potent inhibitors of the influenza A virus // *Medchemcomm.* – 2017. – Vol. 8, № 5. – P. 960–963.
303. Filimonov A.S., Yarovaya O. I., Zaykovskaya A. V., Rudometova N. B., Shcherbakov D. N., Chirkova V. Yu., **Borisevich S. S.**, Luzina O. A., Pyankov O. V., Maksyutov R. A., Salakhutdinov N. F. (+)-Usnic Acid and Its Derivatives as Inhibitors of a Wide Spectrum of SARS-CoV-2 Viruses // *Viruses* – 2022. – Vol.14. No.10. – P.2154
304. Yarovaya O. I., Filimonov A. S., Baev D. S., **Borisevich S. S.**, Chirkova V. Yu, Zaykovskaya A. V., Mordvinova E. D., Belenkaya S. V., Shcherbakov D. N., Luzina O. A., Pyankov O. V., Salakhutdinov N. F. Usnic acid-based thiazole-hydrazones as multi-targeting inhibitors of a wide spectrum of SARS-CoV-2 viruses // *New J. Chem.* – 2023. – Vol. 47. – P.19865-19879.

305. Sokolov D. N., Zarubaev V. V., Shtro A. A., Polovinka M. P., Luzina O. A., Komarova N. I., Salakhutdinov N. F., Kiselev O. I. Anti-viral activity of (-)- and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009 // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2012. – Vol. 22, № 23. – P. 7060–7064.
306. Shtro A. A., Zarubaev V. V., Luzina O. A., Sokolov D. N., Salakhutdinov N. F. Derivatives of usnic acid inhibit broad range of influenza viruses and protect mice from lethal influenza infection // *Antivir. Chem. Chemother.* – 2015. – Vol. 24, № 3–4. – P. 92–98.
307. Shtro A. A., Zarubaev V. V., Luzina O. A., Sokolov D. N., Kiselev O. I., Salakhutdinov N. F. Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus // *Bioorg. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 22, № 24. – P. 6826–6836.
308. Touret F., Baronti C., Pastorino B., Villarroel P. M. S., Ninove L., Nougairède A., de Lamballerie X. In vitro activity of therapeutic antibodies against SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.2 and BA.5 // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 12609.
309. Ao D., He X., Hong W., Wei X. The rapid rise of SARS-CoV-2 Omicron subvariants with immune evasion properties: XBB.1.5 and BQ.1.1 subvariants // *MedComm.* – 2023. – Vol. 4, № 2. – P. e239.
310. Khomenko T. M., Shtro A. A., Galochkina A. V., Nikolaeva Y. V., Petukhova G. D., **Borisevich S. S.**, Korchagina D. V., Volcho K. P., Salakhutdinov N. F. Monoterpene- Containing Substituted Coumarins as Inhibitors of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Replication // *Molecules* – 2021. – Vol. 26, No. 24. – P. 7493.
311. Khomenko T. M., Shtro A. A., Galochkina A. V., Nikolaeva Yu. V., Garshinina A. V., **Borisevich S. S.**, Korchagina D. V., Volcho K. V., Salakhutdinov N. F. New Inhibitors of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Replication Based on Monoterpene-Substituted Arylcoumarins // *Molecules* – 2023. – Vol. 28. – P. 2673
312. Pajouhesh H., Lenz G. R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs // *NeuroRX.* – 2005. – Vol. 2, № 4. – P. 541–553.
313. **Борисевич С. С.**, Волчо К. П., Салахутдинов Н. Ф. Могут ли методы молекулярной динамики объяснить различную активность стереоизомеров в отношении респираторно-синцитиального вируса? // *Журнал структурной химии.* – 2024. – Vol. 65, № 1. – P. 120491.
314. Yung-Chi C., Prusoff W.H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction // *Biochem. Pharmacol.* – 1973. – Vol. 22, № 23. – P. 3099–3108.
315. Sokolova A. S., Yarovaya O. I., Kuzminykh L. V., Shtro A. A., Klabukov A. M., Galochkina A. V., Nikolaeva Y. V., Petukhova G. D., **Borisevich S. S.**, Khamitov E. M., Salakhutdinov N. F. Discovery of N-Containing (-)-Borneol Esters as Respiratory Syncytial Virus Fusion Inhibitors // *Pharmaceuticals*

– 2022. – Vol.15. No.11. – P.1390

316. Sokolova A. S., Putilova V. P., Yarovaya O. I., Zybkina A. V., Mordvinova E. D., Zaykovskaya A. V., Shcherbakov D. N., Orshanskaya I. R., Sinegubova E. O., Esaulkova I. L., **Borisevich S. S.**, Bormotov N. I., Shishkina L. N., Zarubaev V. V., Pyankov O. V., Maksyutov R. A., Salakhutdinov N. F.: Synthesis and Antiviral Activity of Camphene Derivatives against Different Types of Viruses // *Molecules* – 2021. – Vol. 26, No. 8. – P. 2235
317. Sokolova A.S., Kovaleva K. S., Kuranov S. O., Bormotov N. I., **Borisevich S. S.**, Zhukovets A. A., Yarovaya O. I., Serova O. A., Nawrozkij M. B., Vernigora A. A., Davidenko A. V., Khamitov E. M., Peshkov R. Y., Shishkina L. N., Maksuytov R. A., Salakhutdinov N. F. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of (+)-Camphor- and (–)- Fenchone-Based Derivatives as Potent Orthopoxvirus Inhibitors // *ChemMedChem* – 2022. – Vol. 17. No.12. – e202100771.
318. **Борисевич С. С.**, Горохов Я. В., Архипов С. Г. Место связывания тековиримата – ингибитора мембранного белка р37 ортопоксвирусов // *Журнал структурной химии*. – 2024. – Vol. 65, № 4. – P. 125428.
319. Mazurkov O. Y., Kabanov A. S., Shishkina L. N., Sergeev A. A., Skarnovich M. O., Bormotov N. I., Skarnovich M. A., Ovchinnikova A. S., Titova K. A., Galahova D. O., Bulychev L. E., Sergeev A. A., Taranov O. S., Selivanov B. A., Tikhonov A. Y., Zavjalov E. L., Agafonov A. P., Sergeev A. N. New effective chemically synthesized anti-smallpox compound NIOCH-14 // *J. Gen. Virol.* – 2016. – Vol. 97, № 5. – P. 1229–1239.
320. Hudu S. A., Alshrari A. S., Al Qtaitat A., Imran M. VP37 Protein Inhibitors for Mpox Treatment: Highlights on Recent Advances, Patent Literature, and Future Directions // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11, № 4. – P. 1106.
321. Oleinik G. A., Koval V. V., Usova S. V., Shishkina L. N., Chernonosov A. A. Development and Validation of a Method of Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry for Quantification of ST-246 (Tecovirimat) in Human Plasma // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 11. – P. 3577.
322. Hirt P., Hiller G., Wittek R. Localization and fine structure of a vaccinia virus gene encoding an envelope antigen // *J. Virol.* – 1986. – Vol. 58, № 3. – P. 757–764.
323. Carroll D. S., Emerson G. L., Li Y., Sammons S., Olson V., Frace M., Nakazawa Y., Czerny C.P., Tryland M., Kolodziejek J., Nowotny N., Olsen-Rasmussen M., Khristova M., Govil D., Karem K., Damon I. K., Meyer H. Chasing Jenner’s Vaccine: Revisiting Cowpox Virus Classification // *PLoS One* – 2011. – Vol. 6, № 8. – P. e23086.
324. Mozhaitsev E. S., Suslov E. V., Rastrepava D. A., Yarovaya O. I., **Borisevich S. S.**, Khamitov E.M., Kolybalov D. S., Arkhipov S. G., Bormotov N. I., Shishkina L. N., Serova O. A., Brunilin R. V., Vernigora A. V., Nawrozkij M. B., Agafonov A. P., Maksyutov R. A., Volcho K. P., Salakhutdinov N.

F. Structure-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of the Cage–Amide Derived Orthopox Virus Replication Inhibitors // *Viruses* – 2023. – Vol. 15, No. 1. – P. 29.

325. Cady S. D., Mishanina T. V., Hong M. Structure of Amantadine-Bound M2 Transmembrane Peptide of Influenza A in Lipid Bilayers from Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR: The Role of Ser31 in Amantadine Binding // *J. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 385, № 4. – P. 1127–1141.