

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 МОЛЕКУ-
ЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Специальность 1.4.16. Медицинская химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Уфа - 2024

Работа выполнена в лаборатории химической физики Уфимского института химии УФИЦ РАН

Научные консультанты:

Яровая Ольга Ивановна

доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник НИОХ СО РАН,
г. Новосибирск

Зарубаев Владимир Викторович

доктор биологических наук,
заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Па-
стера, г. Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

Поройков Владимир Васильевич

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, про-
фессор, главный научный сотрудник лаборатории структурно-
функционального конструирования лекарств ИБМХ,
г. Москва

Хлебников Андрей Иванович

доктор химических наук, профессор,
профессор Научно-образовательного центра Н.М. Кижнера,
Инженерной школы новых производственных технологий
Томского политехнического университета, г. Томск

Макаров Вадим Альбертович

доктор фармацевтических наук,
заведующей лабораторией биомедицинской химии
ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образователь-
ное учреждение высшего профессионального образова-
ния «**Московский государственный университет**
им. М.В.Ломоносова», г. Москва

Защита состоится «07» июня 2024 г. в 09:30 часов на заседании Диссертационного со-
вета 24.1.092.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новоси-
бирском институте органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения Россий-
ской академии наук (НИОХ СО РАН) по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика
Лаврентьева, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИОХ СО РАН и на официальном
сайте НИОХ СО РАН: <http://web.nioch.nsc.ru/>. Текст автореферата размещен на официальном
сайте Высшей аттестационной комиссии при министерстве науки и высшего образования Рос-
сийской Федерации по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru/>.

Отзывы об автореферате в двух экземплярах, заверенные гербовой печатью учрежде-
ния, просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева,
д. 9, НИОХ СО РАН, Диссертационный совет 24.1.192.02. e-mail: dissovet@nioch.nsc.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
24.1.092.02
доктор химических наук



Лузина Ольга Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

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.

Цели и задачи

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: гемагглютинаина и протонного M2 канала вируса гриппа, поверхностного S-белка коронавируса SARS-CoV-2, F-белка респираторно-синцитиального вируса (РСВ), 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 гемагглютинаина 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 (гемагглютинаина вируса гриппа, S-белка SARS-CoV-2, F-белка РСВ, гликопротеина вируса Эбола, протонного канала М2 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.

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 гемагглютинаина приводит 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 М2 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 *varicella 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.

Научная новизна

В результате проведенного исследования впервые описан и аннотирован альтернативный сайт связывания ингибиторов гемагглютинаина вируса гриппа – малых молекул, состоящих из жесткого гидрофобного каркаса и полярного заместителя. Сайт связывания расположен в месте пептида слияния гемагглютинаина 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 гемагглютинаина, что позволяет расширить границы применимости подобного теоретического подхода.

Впервые построен и динамически аннотирован полноразмерный протонный М2 канал, геометрические параметры которого могут быть в дальнейшем использованы для разработки и создания новых ингибиторов М2 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 гемагглютинаина 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 гемагглютинаина вируса гриппа. Результаты теоретического анализа позволили предположить, что соединения, подавляющие фузогенную активность гемагглютинаина, 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.

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.

Методология и методы диссертационного исследования

В диссертационной работе использовались методы квантовой химии, молекулярного докинга, молекулярной динамики и метадинамики. Оптимизация геометрических параметров лигандов, а также оценка значений констант кислотности проводилась с использованием квантово-химических расчетов методами DFT, где метод и базисный набор подбирались индивидуально в соответствии с условиями задачи. Молекулярный докинг исследуемых соединений проводился в гибких условиях. В зависимости от задачи, на расположение лиганда могли быть наложены позиционные ограничения. Использовался алгоритм молекулярного докинга – Glide. Оптимальные докинг-позиции выбирались методом визуального фильтрации в совокупности с анализом значений энергетических параметров результатов стыковки. Энергия связывания (ΔG_{bind}) лиганда и белка в лиганд-белковый комплекс оценивалась методами молекулярной механики обобщенной теорией Борна (MM-GBSA) с неявным учетом присутствия воды в качестве растворителя. Поиск и аннотирование сайта связывания осуществлялись на основании

методологии идентификации и характеристики полостей на поверхности белка. Молекулярно-динамические симуляции проводились в течение 100–300 нс (3000–10000 фреймов) в зависимости от задачи, буферная зона выбиралась относительно структурных особенностей белка, виртуальный бокс заполнялся водным раствором 0.15 М NaCl, модель воды TIP3P, использовались термодинамические ансамбли NPT или NPAT, если симуляции проводились в присутствии вирусной мембраны. Все расчеты в рамках молекулярной механики проводились в силовом поле OPLS4. В ряде случаев анализ траектории молекулярно-динамических симуляций включал в себя процедуру кластеризации для получения статистически значимых лиганд-белковых комплексов и последующей оценки энергии связывания лиганда и белка. Методы метадинамики использовались для описания энергетического профиля конформационных переходов гемагглютинирина и описания природы взаимодействия двух стереоизомеров производных фенилкумаринов с сайтом связывания ингибиторов F-белка РСВ. Коллективные переменные выбирались на основании структурных особенностей белка.

Уникальность подхода, используемого в данной работе, заключается в грамотном подборе необходимых инструментов квантовой химии и молекулярного моделирования под конкретные условия каждой отдельной задачи. Подобный подход может обеспечить достоверность получаемых результатов.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в выборе темы диссертационной работы, постановке цели и задач данного исследования, в организации теоретических расчетов, выборе 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 20 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.).

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается наличием взаимосвязи результатов масштабных теоретических расчетов с данными биологических экспериментов, а также экспертной оценки редакционных коллегий высоко цитируемых журналов, в которых были опубликованные результаты диссертационного исследования автора.

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. Отдельно представлен список основных публикаций по теме.

Благодарности

Автор прежде всего глубоко благодарен своим научным консультантам д.х.н. **Ольге Ивановне Яровой** и д.б.н. **Владимиру Викторовичу Зарубаеву** за внимание, постоянную поддержку, помощь и бесценный опыт; своему первому Учителю д.х.н., проф. **Валерию Марсовичу Янборисову** за привитую любовь к вычислительной химии; заведующему лабораторией химической физикой УФИХ РАН д.х.н., проф. **Сергей Леонидовичу Хурсану** за ценные советы и рекомендации; своим коллегам к.х.н. **Э. М. Хамитову** (Уфимский институт химии) и к.х.н. **М. А. Гурееву** (Высшая школа экономики) за помощь в проведении ряда молекулярно-динамических симуляций. Автор выражает искреннюю благодарность коллегам из Новосибирского института органической химии: член-корреспонденту РАН, профессору, д.х.н. **Н. Ф. Салахутдинову**, д.х.н. **К. П. Волчо** и к.х.н. **А. С. Соколовой**, а также всем коллегам и друзьям, кто поддерживал автора во время написания данной работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 представляет собой аналитический обзор научной литературы, в котором систематизированы данные по структурным особенностям и функциям мембранных вирусных белков, а именно, гемагглютини́на вируса гриппа, S-белка коронавируса, F-протеина респираторно-синцитиального вируса, гликопротеина вируса Эбола, протонного M2 канала вируса гриппа и мембранного белка р37 ортопоксви́русов. Описаны предполагаемые сайты связывания ингибиторов мембранных белков, методы молекулярного моделирования, которые используются для исследования биологических систем и оценки биологической активности малых органических молекул. Анализ научной литературы позволил выявить ряд следующих нерешенных проблем: во-первых, достоверно не определены места связывания новых соединений – ингибиторов фузогенной активности HA вируса гриппа и S-белка SARS-CoV-2; во-вторых, в научной литературе практически не рассматривается возможность разработки и создания соединений, которые могли бы одновременно ингибировать поверхностные вирусные белки I типа разных вирусов, и как следствие, проявлять противовирусную активность широкого спектра. В-третьих, в существующих базах данных отсутствует пространственная структура полноразмерного M2 канала вируса гриппа. И, наконец, достоверно не идентифицировано место связывания тековиримата – ингибитора мембранного белка р37, а также новых соединений активных в отношении ортопоксви́русов.

Глава 2 посвящена объектам и методам исследования. Приведен список PDB кодов используемых мембранных белков, если таковые имелись. Описаны алгоритмы молекулярного докинга, способы ранжирования и анализа результатов докинга, используемые протоколы молекулярной динамики и метадинамики. Основные результаты исследования приведены в **главе 3**. Сопроводительный материал представлен в приложениях в **главе 4**.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Объектами исследования являются мембранные вирусные белки, среди которых поверхностные вирусные белки I типа: гемагглютинин (HA) вируса гриппа, спайк (S)-белок

SARS-CoV-2, белок слияния (F-белок) респираторно-синцитиального вируса (РСВ), гликопротеин (GP) вируса Эбола, а также протонный М2 канал вируса гриппа, и консервативный белок р37 ортопоксвирусов. Геометрические параметры поверхностных вирусных белков (в комплексе с ингибиторами, полноразмерные и/или частично) представлены в некоммерческой базе данных Protein Data Bank. Полноразмерные третичные структуры М2 канала и р37 были предсказаны с использованием методологии нейронных сетей и гомологического конструирования. Малые органические молекулы, проявляющие активность в отношении вирусов гриппа, коронавируса SARS-CoV-2, респираторно-синцитиального вируса, вируса Эбола и ортопоксвирусов штаммов *vaccinia virus* (VV) и коровьей оспы (CPXV), были рассмотрены в качестве потенциальных ингибиторов мембранных вирусных белков. Механизм противовирусной активности исследуемых соединений был описан на основании совокупного анализа биологических экспериментов и результатов теоретических расчетов, проведенных в рамках поставленных задач в данной работе.

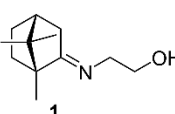
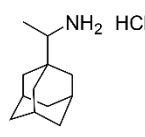
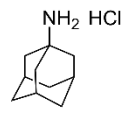
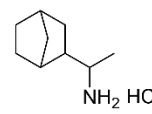
Глава 1. Ингибирующая активность малых молекул в отношении мембранных белков гемагглютиниона вируса гриппа

1.1. Альтернативный сайт связывания ингибиторов гемагглютиниона вируса гриппа

Гемагглютинин (НА) вируса гриппа представляет собой гликопротеин, состоящий из трех идентичных субъединиц. Каждая субъединица включает в себя варибельный глобулярный домен НА₁, роль которого заключается в связывании с клеточным рецептором, и более консервативной стеблевой части НА₂, участвующей в процессе конформационного перехода из префузионной в постфузионную конформацию. Субъединицы НА связаны между собой дисульфидным мостиком в месте протеолиза. На основе филогенетического анализа описаны 18 антигенных подтипов НА, которые собраны в две основные группы. НА двух групп структурно различаются в областях, участвующих в конформационных перестройках при слиянии вирусных и клеточных мембран. Основная функция НА состоит в том, чтобы обеспечить проникновение генома вируса в цитоплазму клетки хозяина. Ингибиторы НА связываются с глобулярной головкой НА₁, препятствуя ее контакту с рецептором и/или в стеблевой части НА₂ в области гептадных повторов, стабилизируя префузионную конформацию белка.

1.1.1. Область связывания камфецина и его аналогов

Соединение **1** или **камфецин** (рисунк 1), синтезированное в НИОХ им. Н. Н. Ворожцова на основе (+)-камфоры¹ содержит природный бициклический фрагмент и полярный заместитель, и проявляет выраженную противовирусную активность против разных штаммов вируса гриппа, в том числе и пандемического штамма A/California/07/09 (H1N1). Индекс селективности составляет 503 единицы, что в 10 раз превышает значение, характерное для соедине-

камфецин	римантадин	амантадин	дейтифорин
			
1			
IC ₅₀ ¹ = 5.1 μM SI = 503	IC ₅₀ = 67.0 μM SI = 5	IC ₅₀ = 64.2 μM SI = 4	IC ₅₀ = 208.6 μM SI = 6

¹ A/California/07/09 (H1N1) pdm09

Рисунок 1. Соединения, проявляющие активность против вируса гриппа.

ний, содержащих схожий жесткий гидрофобный каркас, таких как римантадин, амантадин и дейтифорин. Эксперименты по времени добавления показали, что наибольшую противовирусную активность камфецин проявляет в первые часы заражения, т. е. на ранних стадиях вирусной репликации². Этот результат предполагает, что вероятными биологическими мишенями противовирусного действия камфецина могут быть протонный М2 канал и/или НА вируса гриппа.

¹ Изученные в данной работе низкомолекулярные соединения, проявляющие активность в отношении ряда вирусов, были синтезированы в отделе медицинской химии НИОХ СО РАН

² Изучение противовирусной активности рассматриваемых соединений в отношении вируса гриппа были проведены в ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева и в ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера в группе д.б.н. В. В. Зарубаева

В пользу протонного М2 канала свидетельствует наличие у камфецина жесткого гидрофобного каркаса, схожего с каркасом адамантан-содержащих агентов (рисунки 1), противовирусное действие которых связано с блокированием протонного М2 канала. В пользу НА свидетельствуют результаты биологических экспериментов, согласно которым камфецин подавляет фузогенную активность гемагглютинаина, не препятствуя связыванию с клеточным рецептором. Совокупность подобных рассуждений позволяет рассматривать камфецин в качестве потенциального ингибитора НА с одной стороны и М2 канала с другой. В рамках данной работы были рассмотрены обе мишени.

Камфецин (1) имеет схожие с третбутилгидрохиноном (ТБГХ) фармакофорные и структурные дескрипторы: жесткий гидрофобный каркас и полярную -ОН группу (рисунки 2А). ТБГХ проявляет умеренную активность против вируса гриппа штамма A/Aichi/2/68 (H3N2), за счет ингибирования фузогенной активности НА. Соединение связывается в небольшой полости белка, расположенной в месте пептида слияния (рисунки 2Б) между ключевыми короткой и длинной α -спиралями гептадного повтора. При переходе белка из префузионную в постфузионную конформацию именно эти спирали подвергаются конформационным перегруппировкам. Предполагается, что связывание малой молекулы между двумя α -спиралями может энергетически затруднить данный процесс. Место связывания ТБГХ подтверждено расшифровкой пространственной структуры лиганд-белкового комплекса методом рентгеноструктурного анализа (PDB код 3EYM). Сайт связывания ТБГХ (далее ТБГХ-сайт) был рассмотрен в качестве вероятного места связывания камфецина. Аффинность камфецина к ТБГХ-сайту в гемагглютинаинах разных подтипов (H1, H3 и H5) была оценена методами гибкого молекулярного докинга с использованием QM подхода (геометрические параметры лигандов были оптимизированы DFT методом с учетом взаимного влияния окружающих аминокислотных остатков (а.о.) и лиганда). Анализ результатов докинга позволяет предположить, что камфецин может связываться в ТБГХ-сайте НА трех рассматриваемых подтипов. Связывание в месте пептида слияния НА сопровождается образованием водородной связи между кислородом лиганда и Y594. Энергетические параметры, характеризующие аффинность камфецина соизмеримы с параметрами связывания ТБГХ (рисунки 2В).

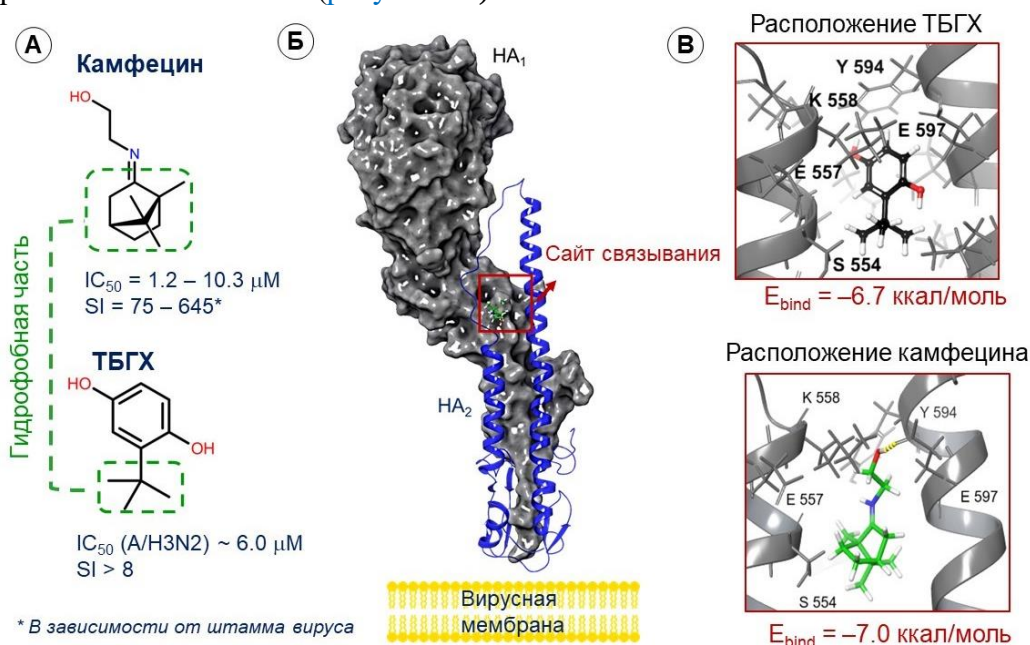


Рисунок 2. Оценка аффинности камфецина к гемагглютинуину (НА): А – структурные параметры камфецина и ТБГХ; Б – показаны две субъединицы одного протомера НА; В – расположение молекул ТБГХ и камфецина в сайте связывания, получена в результате процедуры QM-докинга (E_{bind}). Желтой прерывистой линией показана водородная связь.

Согласно данным *in vitro* тестов камфецин проявляет активность против штаммов вируса гриппа A/H1N1, A/H3N2 и A/H5N2 (таблица 1). Энергетические параметры связывания 1

в ТБГХ-сайте НА разных подтипов в целом соизмеримы. Аффинность камфецина к сайту связывания НА 3-го подтипа хуже, чем к другим подтипам гликопротеина. Объяснить это можно тем, что гемагглютинины разных штаммов соответствуют разным филогенетическим группам. Так НА 1-го (H1) и 5-го (H5) подтипов относятся к первой филогенетической группе, а НА 3-го (H3) ко второй. Несмотря на определенную консервативность второй субъединицы НА₂, а.о. сайты связывания в белках, соответствующих разным штаммам вируса гриппа, незначительно различаются.

Таблица 1. Результаты противовирусной активности камфецина в отношении трех штаммов вируса гриппа и результат молекулярного докинга в ТБГХ-сайт НА разных подтипов.

Штамм	IC ₅₀ , μ M	SI	E _{bind} , ккал/моль	Взаимодействие с а.о. (оптимальная докинг-позиция)
A/PR/8/34 (H1N1)	1.2 $\pm$ 1.2	645	-7.00 $\pm$ 0.19	K ₂ 558 – водородная связь
A/Aichi/2/68 (H3N2)	10.3 $\pm$ 1.1	75	-6.71 $\pm$ 0.34	Y ₂ 594 – водородная связь
A/Mallard/12/00 (H5N2)	8.0 $\pm$ 1.0	97	-6.04 $\pm$ 0.25	K ₂ 558 – водородная связь

Совокупность результатов биологических экспериментов и теоретических расчетов позволяют сделать следующий вывод: камфецин проявляет выраженную противовирусную активность за счет ингибирования НА. Молекула может связываться в небольшой гидрофобной полости, расположенной в месте пептида слияния между двумя короткой и длинной α -спиралями гептадного повтора, и, вероятно, энергетически стабилизировать префузионную конформацию белка. В процессе фузогенного перехода из префузионной в постфузионную конформацию происходит разворот одной субъединицы белка относительно другой. Вероятно, при этом происходит вращение вокруг дисульфидной связи между а.о. C₁₈ и C₂637, связывающих две субъединицы. Предположительно связывание малой молекулы в данной области белка или точнее, в месте протеолиза, может повлиять на этот процесс и в дальнейшем препятствовать конформационным перестройкам.

В результате анализа поверхности гемагглютинаина была обнаружена небольшая полость в месте пептида слияния, удаленная от ТБГХ-сайта на расстоянии около 20Å (рисунок 3А, Б).

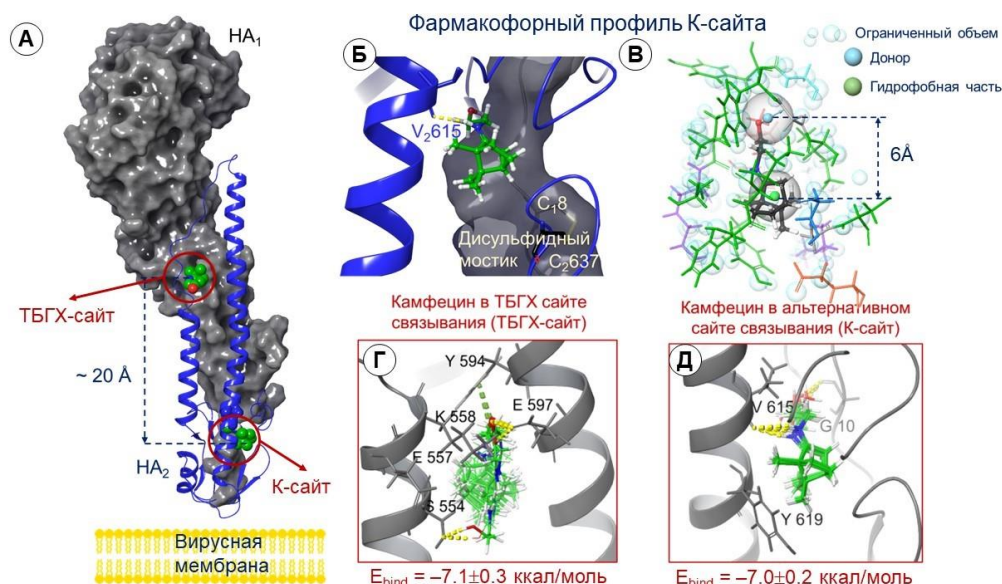


Рисунок 3. Определение альтернативного К-сайта связывания в НА методами молекулярного моделирования: А – расположение сайтов связывания ингибиторов в протомере НА; Б – место протеолиза и расположение камфецина в К-сайте; В – фармакофорный профиль К-сайта; Г, Д – расположение лиганда в ТБГХ- и К-сайтах связывания (наложение геометрических параметров лиганда соответствующим 10 докинг-решений).

Предполагаемый сайт связывания объемом 300Å³, насыщен гидрофобными а.о., такими как лейцин, изолейцин, валин, тирозин. Основными фармакофорными признаками сайта связывания являются гидрофобный фрагмент и донор водородной связи, расположенные на рас-

стоянии около 6Å (рисунок 3В). При связывании камфецина в этой области протеина образуется водородная связь между протонированным атомом азота лиганда и карбонильным атомом кислорода валина в положении 615 (рисунок 3Б). Далее по тексту этот сайт носит название К-сайт. Вполне вероятно, что камфецин может связываться в обеих полостях, ингибируя при этом конформационные перестройки НА. Согласно результатам QM-докинга энергетические параметры, характеризующие аффинность лиганда к ТБГХ- и К-сайтам, примерно одинаковы. В ТБГХ-сайте связывания ориентация камфецина может быть различной (рисунок 3Г). Расположение лиганда характеризуется образованием водородных мостиков между гидроксильной группы лиганда и аминокислотами E₂₅₉₇ или S₂₅₅₄. В некоторых случаях возможно формирование π -катион стекинг взаимодействие между протонированным атомом азота и ароматическим кольцом Y₂₅₉₄ (рисунок 3Г). Расположение камфецина в К-сайте характеризуется более высокой кластеризацией, об этом свидетельствует одинаковое расположение молекул камфецина в каждой анализируемой докинг-позиции. В месте протеолиза камфецин, чаще всего, располагается с образованием водородных связей между протонированным атомом азота и V₂₆₁₅ и гидроксильной группы и G₁₀ (рисунок 3Д).

Аминокислотная последовательность К-сайта (а.о. НА₁ – 8–11; а.о. НА₂ – 571–635) в поверхностных белках разных штаммов вируса высоко консервативна в рамках гемагглютининов одной группы. Замены аминокислот наблюдаются в НА 3-го подтипа. Мутации Y11H в первой субъединице НА₁ и N614E, K616N, N617K, Y619F во второй (НА₂) приводят к изменению фармакофорного профиля сайта связывания. При этом связывание камфецина в месте протеолиза НА 3-го подтипа не происходит. Вероятно, это может объяснить меньшую противовирусную активность камфецина против штамма вируса гриппа А/Н3N2.

Параллельно с молекулярным моделированием проводились широкомасштабные биологические эксперименты. Камфецин-резистентный штамм вируса гриппа был получен в результате пассивирования вируса гриппа штамма А/PR/8/34 (H1N1) в течении 6 пассажей при нарастающей концентрации препарата. Секвенирование гена НА мутантного вируса показало наличие значимой мутации в стеблевой части НА₂. 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 происходит увеличение заместителя боковой цепи аминокислот: изопропил-заместитель валина меняется на изобутил-заместитель лейцина. Размер полости связывания сокращается более, чем на 20Å³ и аффинность камфецина к К-сайту падает. Это отражается на значениях противовирусной активности соединения (IC₅₀) в отношении камфецин-резистентного штамма вируса

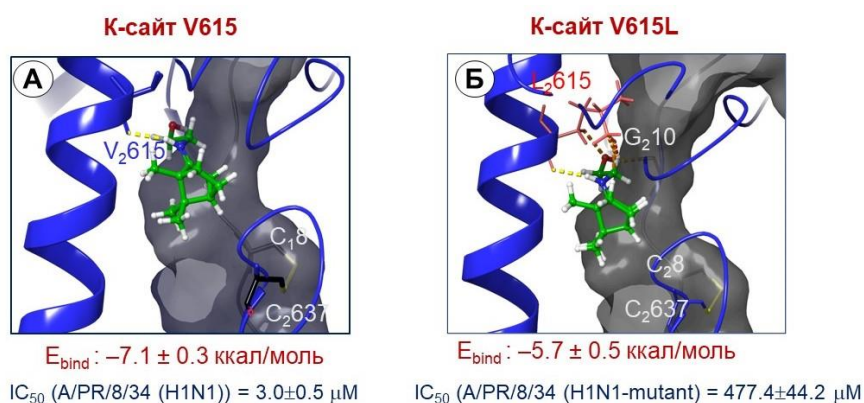


Рисунок 4. Результаты QM-докинга (E_{bind}) камфецина в альтернативный сайт связывания НА дикого (А) и мутантного (Б) типов: водородные связи показаны желтыми прерывистыми линиями, стерические затруднения – оранжевыми.

мутантного НА наблюдаются стерические затруднения, которые на рисунке 4Б показанные в виде оранжевых прерывистых линий.

гриппа (рисунок 4). Связывание камфецина в обоих сайтах схожее. Из ряда различных докинг-позиций самая оптимальная по энергетическим параметрам и схожести расположения лиганда в сайте сопровождается образованием водородных связей между водородами аминокислот и гидроксильной групп лиганда и карбонильными кислородами а.о. (рисунок 4А). При связывании камфецина в сайте связывания

Анализируя результаты теоретических расчетов (анализ поверхности белка, описание фармакофорного профиля альтернативного сайта связывания, процедур гибкого и QM-докинга) и биологических экспериментов (оценка противовирусной активности против разных штаммов вируса гриппа, эксперименты по времени добавления, ингибирования фузогенной активности НА, секвенирование гена НА) можно предположить следующее: наиболее вероятной биологической мишенью действия камфецина является гемагглютинин вируса гриппа. При этом вероятный механизм противовирусной активности агента **1** связан с ингибированием конформационных перестроек гептадных повторов, которые происходят при переходе из префузионной в постфузионную конфигурацию белка. Таким образом можно сделать вывод, что связывание камфецина в обоих сайтах связывания (ТБГХ и К-сайты) равновероятно может повлиять на энергетическую составляющую белка в целом. При связывании в месте пептида слияния малая молекула может зафиксировать положение двух α -спиралей, в месте протеолиза и повлиять на процесс протеолитического расщепления. Все это может привести к ингибированию функций гемагглютинина. Другими словами, камфецин может связываться в обоих сайтах связывания.

Одним из косвенных доказательств в пользу корректности выбранного сайта связывания, может быть, наличие зависимости результатов биологических экспериментов, например значений pIC_{50} от энергетических параметров, характеризующих аффинность соединений-аналогов к выбранному месту связывания. Аналоги камфецина (**2–35**) (рисунк 5) проявляют активность против вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1). Для соединений **2–35** была проведена процедура молекулярного QM-докинга в ТБГХ- и К-сайты связывания. Выбор оптимальной докинг позиции был основан на результатах визуального фильтрования. Были учтены различные конформации лигандов, а также возможность протонирования по атому азота для некоторых соединений.

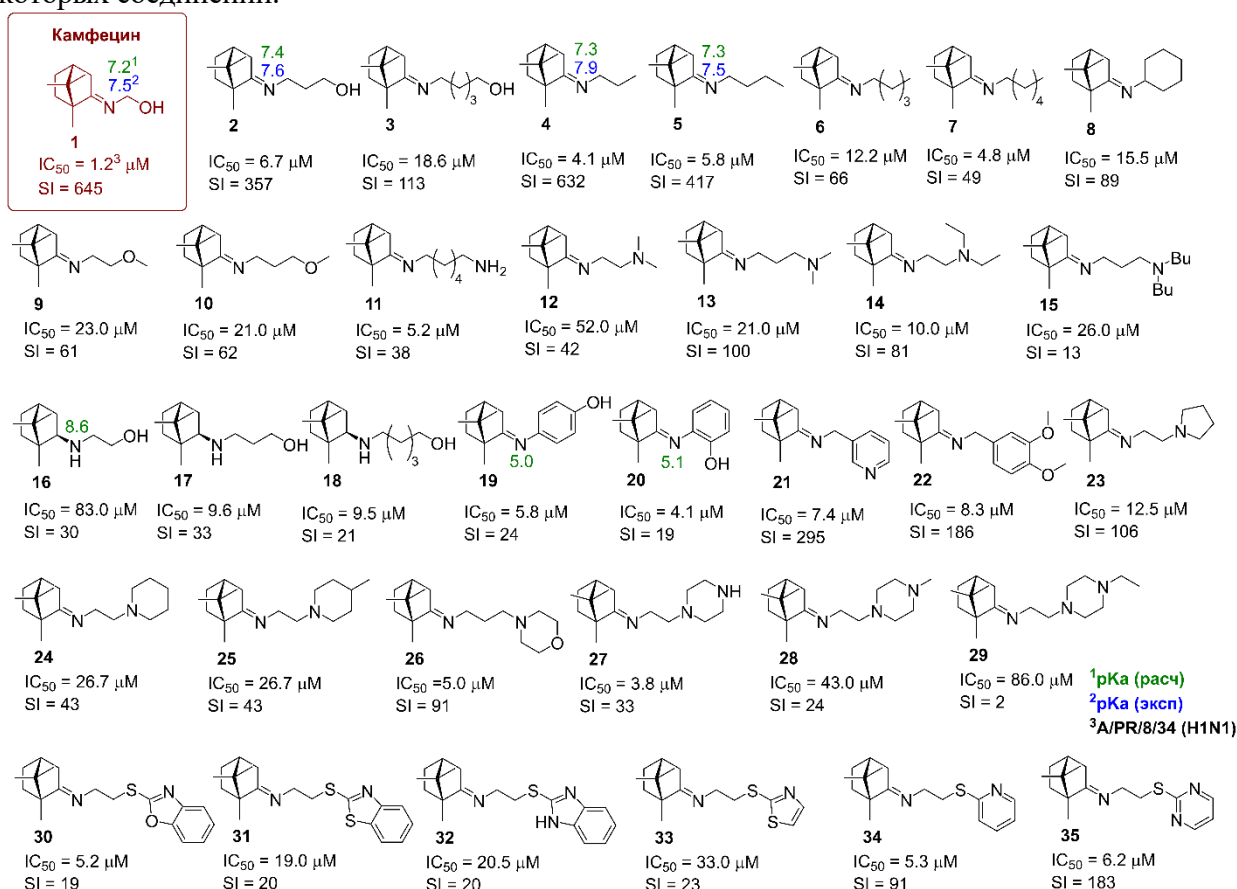


Рисунок 5. Аналоги камфецина активные в отношении вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1).

Анализируя данные теоретического исследования в совокупности с результатами биологических экспериментов, была оценена статистическая значимость данных, характеризую-

щих аффинность лиганда к сайтам связывания гемагглютинаина (рисунок 6А, Б). Анализ графиков позволяет отметить наличие линейной зависимости значений pIC_{50} и энергетических параметров связывания. Значения индекса корреляции при связывании соединений в К-сайте выше (рисунок 6Б), чем в ТБГХ-сайте (рисунок 6А).

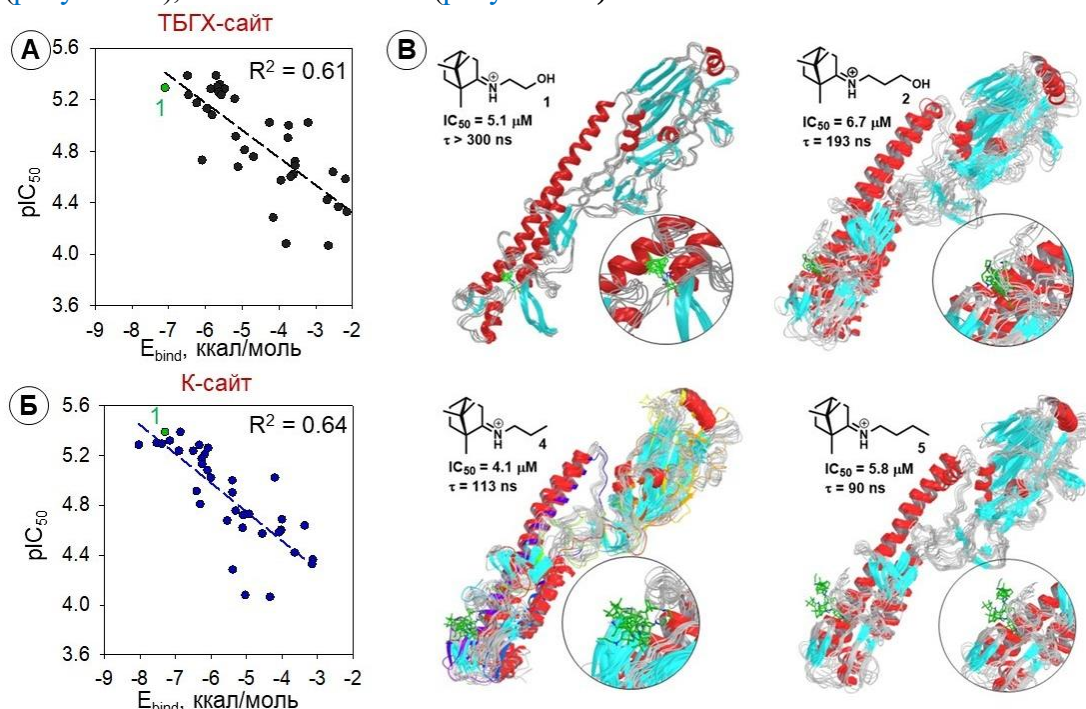


Рисунок 6. Результаты молекулярного моделирования взаимодействия камфецина и его аналогов (2, 4, 5) с сайтами связывания в НА: А, Б – корреляции между энергетическими параметрами ҚМ-докинга (E_{bind}) связывания камфецина и его аналогов в сайте связывания ТБГХ и К-сайте, соответственно; В – визуализация времени «удержания» камфецина и его аналогов в К-сайте.

Геометрические параметры лиганд-белковых комплексов для группы соединений 1, 2, 4, 5 и 16 были выбраны для проведения молекулярно-динамических симуляций. Выбор был обоснован результатами биологических экспериментов: соединения 2, 4 и 5 характеризуются высокими индексами селективности, а соединение 16 было выбрано в качестве отрицательного контроля с одной стороны, и схожести структурных параметров с камфецином (1) 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 (рисунок 6В). 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 2 и 4 удерживаются в К-сайте в течение 193 нс и 113 нс, соответственно, после чего переходят в растворенную фазу. Соединение 5 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 заданных. Анализ траекторий молекулярной динамики НА в комплексе с малоактивным агентом 16 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 амина 16 с гемагглютинином, но ни одно из них не приводит к формированию стабильного лиганд-белкового комплекса. Таким образом, камфецин и его активные аналоги (2, 4, 5) характеризуются более длительным временем удержания в активном сайте. Конформационные перестройки, происходящие с гемагглютинином, протекают в микросекундных интервалах. Неактивное соединение находится в сайте связывания в течение незначительного времени, и вероятнее всего не успевает оказать влияние на данный процесс.

Анализируя результаты биологических экспериментов и теоретических расчетов, можно предположить, что камфецин и его аналоги могут связываться, как минимум, в двух из возможных гидрофобных карманов гемагглютинаина. Анализ поверхности белковой структуры показал, что между субъединицами НА₁ и НА₂ 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. 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 расчетов методами молекулярного моделирования.

1.1.2. Аффинность соединений, содержащий жесткий гидрофобный каркас, к сайтам связывания гемагглютинаина

Результаты молекулярного моделирования, описанные в предыдущем разделе, позволяют предположить, что соединения, содержащие жесткий гидрофобный каркас и полярные заместители могут рассматриваться в качестве потенциальных ингибиторов НА и связываться в ТБГХ- и/или в К-сайте. Четвертичная аммониевая соль на основе (–)-борнеола (**36**) (рисунки 7А) проявляет выраженную противовирусную активность против ряда штаммов вируса гриппа, а именно A/PR/8/34 (H1N1), A/California/07/09 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) (рисунки 7Б). Анализ результатов молекулярного докинга позволяет предположить, что соль **36** может связываться в ТБГХ-сайте всех трех подтипов НА с одинаковыми значениями энергетических характеристик. При этом аффинность агента **36** в целом соизмерима с аффинностью камфецина и ТБГХ (рисунки 2).

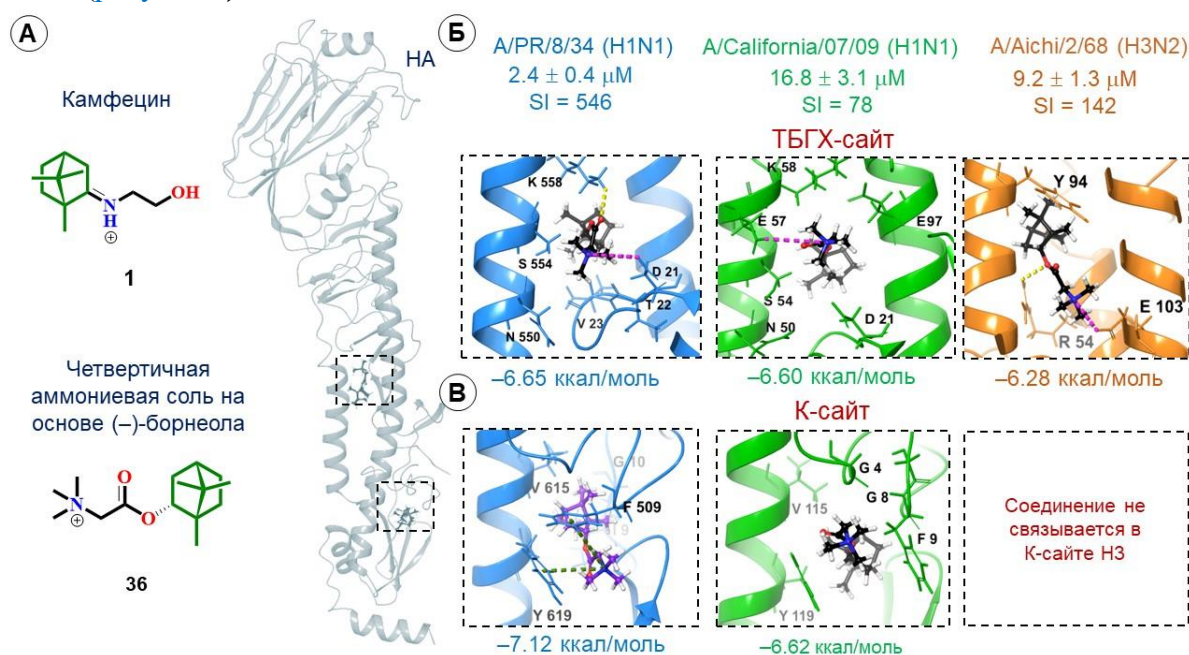


Рисунок 7. Результаты молекулярного докинга соли **36** в сайте связывания НА: А – сравнение структурных особенностей агентов **1** и **36**, в которых жесткий гидрофобный каркас окрашен в зеленый цвет. Б, В – результаты молекулярного докинга соли **36** в ТБГХ- и К-сайты НА разных типов. Водородные связи и солевые мостики показаны желтыми и фиолетовыми прерывистыми линиями соответственно, π-катион стекинг взаимодействие – зеленой прерывистой линией.

Результат молекулярного докинга в К-сайт поверхностных гликопротеинов H1-PR, H1-Call и H3, соответствующих штаммам A/PR/8/34 (H1N1), A/California/07/09 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) показывает, что соединение **36** связывается только в К-сайте НА 1-го подтипа (H1-PR и H1-Call). Докинг агента **36** в К-сайт H3 не увенчался успехом. Как и изученный

ранее камфецин, так и соль **36** не связываются в месте протеолиза НА 3-го подтипа (рисунк 7В). Этим можно объяснить разную противовирусную активность соединения в отношении штаммов А/Н1N1 и А/Н3N2: аминокислотная последовательность К-сайта у гликопротеинов 1-го и Н3-го подтипов различается. При расположении соли **36** в К-сайте Н1-PR регистрируются π -катион стекинг взаимодействия между положительно заряженным центром в лиганде и ароматическими а.о. F₂₅₀₉ и Y₂₆₁₉. Оптимальная докинг-позиция соединения **36** в Н1-CalI сопровождается лишь гидрофобными взаимодействиями. На данном этапе сложно объяснить разницу в ингибирующей активности **36** против штаммов А/PR/8/34 (Н1N1) и А/California/07/09 (Н1N1). Структурные параметры НА данных штаммов схожи и аминокислотных состав К-сайтов практически одинаковый. Поэтому отсутствует какая-либо значимая разница в энергетических параметрах, характеризующих связывание лиганда в ТБГХ- и К-сайте. Здесь различная противовирусная активность **36**, вероятно, должна объясняться другими причинами, которые невозможно пояснить на основании результатов молекулярного моделирования.

Ряд О-ацилированных амидоксимов и замещенных 1,2,4 оксадиазолов (рисунк 8), синтезированных на основе (+)-кетопиновой кислоты проявляют активность против вируса гриппа двух штаммов А/PR/8/34 (Н1N1) и А/Anhui/1/13 (Н7N9). При этом показано, что соединения **38**, **39** и **41** активно подавляют репликацию вируса штамма А/Н1N1, а штамм А/Н7N9 ингибируют в большей концентрации. Агенты **37** и **40** проявляют выраженную активность в отношении штамма вируса А/Н7N9, и менее выраженную в отношении штамма А/Н1N1. На основании биологических экспериментов было показано, что агенты **38–41** ингибируют фузогенную активность НА, а значит могут связываться со стеблевой частью белка. Процедуры молекулярного докинга были проведены для оценки аффинности агентов **37–41** в оба сайта (ТБГХ- и К-сайты) связывания ингибиторов НА.

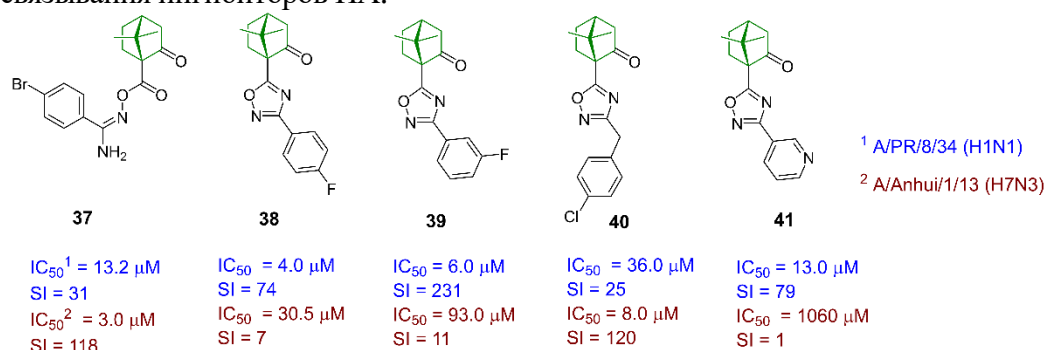


Рисунок 8. Соединения активные в отношении вируса гриппа.

Гемагглютинины 1-го (Н1) и 7-го (Н7) подтипов относятся к разным филогенетическим группам, поэтому размер и аминокислотная последовательность сайтов связывания различается. Площадь ТБГХ-сайта в Н1 немногим больше сайта связывания в Н7: 750–800 Å² и 660–700 Å², соответственно. Фармакофорный профиль а.о. также различается: вместо положительно заряженного гистидина находится отрицательно заряженная глутаминовая кислота Н41Е (рисунк 9А), а вместо ароматического гидрофобного тирозина – положительно заряженный аргинин Y295R. Площадь К-сайта в НА 7-го типа составляет 750–800 Å², что превышает по размеру К-сайт, расположенный в НА 1-го типа. Выравнивание а.о. в К-сайте Н1 и Н7 показывает замены I9L и Y10H в субъединице НА₁; N614W; V615M; K616S и N635T в НА₂. Фармакофорный профиль ряда а.о. меняется: гидрофобный ароматический тирозин на положительно заряженный гистидин, положительно заряженный лизин, на полярный серин (рисунк 9А). На основании результатов молекулярного докинга агентов **37–41** аффинность соединений к сайтам связывания НА разных подтипов различается. Причиной могут быть не только структурные особенности лигандов, но и разный фармакофорный профиль сайтов и длина боковых цепей а.о., обрамляющих полость связывания. Согласно биологическим исследованиям, соединение **37** активно ингибирует вирус штамма А/Н7N9, в то время как агент **38** подавляет репликацию штамма А/Н1N1. Анализ результатов молекулярного моделирования, позволяет

предположить, что соединение **37** лучше связывается в ТБГХ-сайте, а агент **38** – в К-сайте гемагглютинаина. Для объяснения селективной противовирусной активности данных соединений более подробно было изучено связывание агента **37** в ТБГХ-сайте, а агента **38** в К-сайте, с оценкой энергии связывания (ΔG_{bind}) лиганда и белка. Связывание вещества **37** в ТБГХ-сайте Н1 характеризуется стерическими затруднениями, которые визуализируются в виде нежелательных взаимодействий (рисунок 9Б, агент **37**-Н1), в отличие от его расположения в ТБГХ-сайте Н7 (рисунок 9Б, агент **37**-Н7). В обоих случаях наблюдается образование водородных связей между кислородом бицикло[2.2.1]гептанового фрагмента соединения и аспарагином в положениях 595 (для Н1) и 95 (для Н7). Ароматическое кольцо **37** образует π - π стекнинг взаимодействие с F₂₅₀₉ в Н1 и W₂₁₄ в Н7. Энергия взаимодействия лиганда и белка в лиганд-белковом комплексе для системы агент **37**-Н1 на 9.5 кДж/моль выше, чем для системы агент **37**-Н7.

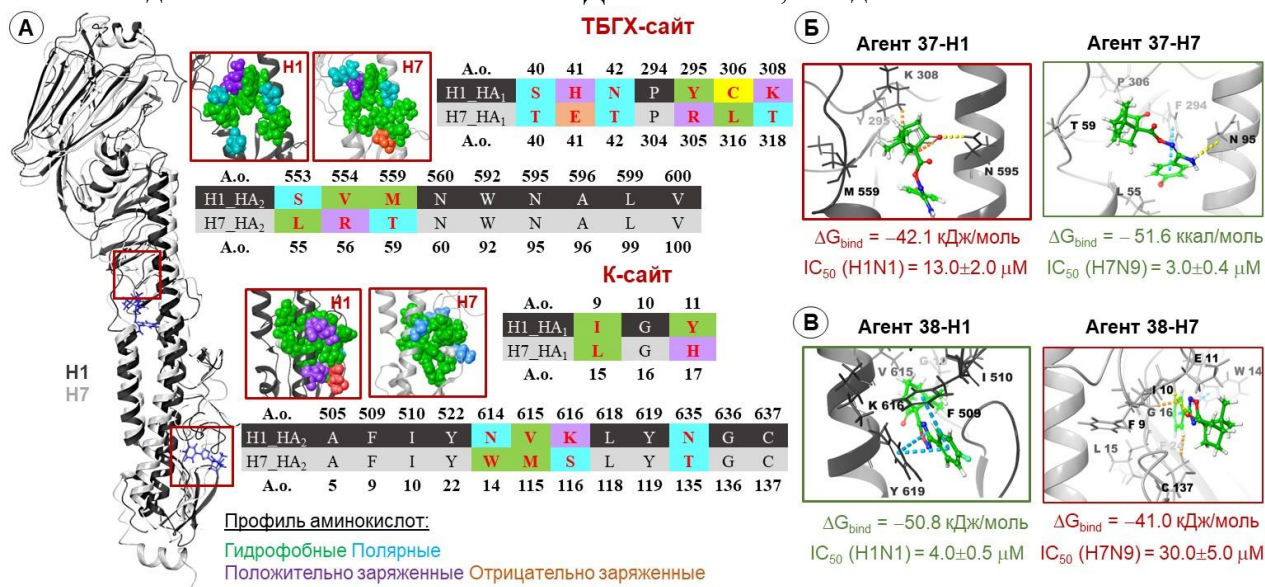


Рисунок 9. Результат молекулярного моделирования: А – выравнивание а.о. сайтов в связывания в НА разных подтипов; Б, В – расчет энергии связывания (ΔG_{bind}) для оптимальных докинг-позиций агента **37** в ТБГХ-сайтах НА 1-го и 7-го подтипов и **38** в К-сайтах НА 1-го и 7-го подтипов.

Расположение соединения **38** в К-сайте Н1 характеризуется низкими значениями энергетических параметров (рисунок 9В, агент **38**-Н1). Триада аминокислотной последовательности NVK в НА 1-го подтипа, среди которых функциональная аминокислота валин в положении 615, в НА 7-го типа представлена в виде триады WMS, где вместо валина находится метионин. Связывание агента **38** в К-сайте гликопротеина Н7 происходит, однако положение лиганда сильно смещено относительно ожидаемого и сопровождается множеством стерических затруднений (рисунок 9В, агент **38**-Н7). Соединение **38** образует π - π стекнинг взаимодействия с F₂₅₀₉ и Y₂₆₁₉ в случае Н1. Лиганд удален от F₁₉ и образует водородную связь с изолейцином (I₁₁₀) в случае Н7. Различное расположение соединений в К-сайтах разных подтипов НА отражается в энергии связывания лиганда с белком (рисунок 9В). Комплекс агент **38**-Н1 на 9,8 кДж/моль более стабилен, чем комплекс агент **38**-Н7. Вероятно, этим можно объяснить избирательную противовирусную активность соединения **38**. Таким образом, аффинность рассматриваемых соединений к сайтам связывания НА разных подтипов (Н1 и Н7) обусловлена различной природой взаимодействия лигандов с а.о. сайтов связывания. Возможно, это объясняет различную противовирусную активность веществ **37** и **38** в отношении разных штаммов вируса, которая наблюдается в тестах *in vitro*. По-видимому, механизм противовирусной активности исследуемых соединений связан с подавлением фузогенной функции гемагглютинаина. При этом соединение **37** комплементарно к ТБГХ-ситу связывания, в то время как агент **38** к К-ситу.

1.1.3. Область связывания каркасных ацетамидов

Ряд каркасных ацетамидов (**42–44**), среди которых гинсамид (**42**) проявляют активность против вируса гриппа. Гинсамид в субмикромольных концентрациях ингибирует штаммы ви-

руса гриппа A/H1N1, в то время как в отношении штаммов A/H3N2 и A/H7N3 проявляет умеренную активность (рисунк 10). Учитывая наличие жесткого гидрофобного скаффолда, как у камфецина, соединения 42–44 могут рассматриваться в качестве ингибиторов НА и связываться в К-сайте. Согласно биологическим экспериментам, гинсамид проявляет выраженную противовирусную активность до двух часов после заражения клеток и подавляет фузогенную активность НА, не влияя на процесс связывания белка с рецептором. Теоретические расчеты (гибкий молекулярный докинг и оценка энергии связывания ΔG_{bind}) показывают, что соединения связываются в К-сайте, значения энергии связывания соизмеримы со значением, характеризующим аффинность камфецина к К-сайту (рисунк 10).

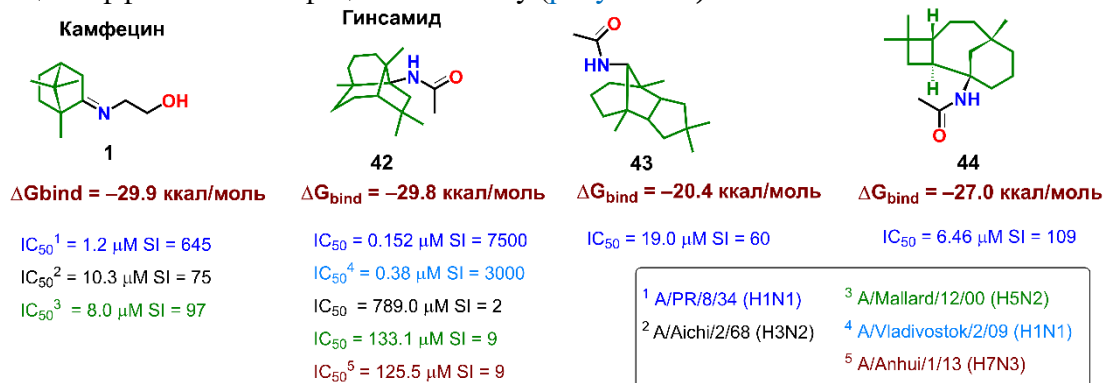


Рисунок 10. Противогриппозные агенты, проявляющие аффинность к К-сайту связывания. Зеленым цветом выделен гидрофобный жесткий каркас соединений.

Сотрудниками Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера получен гинсамид-резистентный штамм вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1). Секвенирование гена НА гинсамид-резистентного штамма с последующим выравниванием аминокислотной последовательности позволило идентифицировать ряд аминокислотных замен, среди которых V615L в стеблевой части НА в месте протеолиза, а точнее в К-сайте. Это та самая функциональная аминокислота, с которой камфецин образует водородную связь при связывании в месте протеолиза. Кроме того, именно эта 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.

1.1.4. Связывание камфецина влияет на патогенность мутантного штамма

Камфецин-резистентный штамм вируса гриппа характеризуется значительным снижением вирулентности и патогенности для мышей. Результаты секвенирования гена гемагглютинаина 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. Можно предположить, что мутация V615L может повлиять на конформационную подвижность белка, ограничивая гибкость протеина, что будет критически сказываться на процессе конформационного перехода из префузионного в постфузионное состояние и последующего НА-опосредованного слияния мембран. Для подтверждения данной теории была оценена степень влияния камфецина на доменные движения гемагглютинаина дикого и мутантного типов (мутация V615L) с помощью серии молекулярно-динамических симуляций³ в течение 300 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 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.

³ Расчеты были выполнены в соавторстве с с.н.с. Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова к.х.н. Гуреевым М. А.

В результате проведенных расчетов были получены значения свободных энергий, описывающих процесс перехода белка в активное конформационное состояние при $\text{pH} = 5$ и $\text{pH} = 7$. 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. 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^0 (таблица 2). Тогда переход системы в активную конформацию (ΔG^1), сопровождается преодолением энергетического барьера ($\Delta \Delta G \uparrow$) и образованием некоего переходного состояния (ΔG^{tr}). Далее происходит релаксация системы, энергия понижается с образованием активной конформации (ΔG^1). Тогда объяснить влияние камфецина на конформационные изменения протеина можно с точки зрения кинетики (обращая внимание на высоту энергетического барьера $\Delta \Delta G \uparrow$) и с точки зрения термодинамики, оценивая разницу в начальных (ΔG^0) и конечных (ΔG^1) энергетических состояниях системы. В системах (#1–2 таблица 2) рассматривается НА (NA_{WT}), соответствующий штамму A/PR/8/34 (H1N1) дикого типа. Результат симуляции МД подтверждает энергетическую выгодность перехода протеина в активную конформацию (ΔG^1) при пониженных значениях pH по сравнению с физиологическими значениями на 2.6 ккал/моль. При этом высота энергетического барьера (ΔG_{tr}) практически одинаковая. Присутствие камфецина в К-сайте связывания (системы #3 и 4 таблица 2) незначительно снижает общую энергию системы. Образующийся, при этом лиганд-белковый комплекс менее стабилен, по сравнению с $\text{NA}_{\text{WT-1}}$ с точки зрения термодинамики. Высота энергетического барьера ($\Delta \Delta G \uparrow$) комплекса К-НА_{WT} на 3.7 или на 2.6 ккал/моль выше (первая цифра соответствует $\text{pH} = 5$, вторая – $\text{pH} = 7$), чем $\Delta \Delta G \uparrow$, 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 pH среды. Другими словами, связывание камфецина в НА приводит к энергетическим осложнениям перехода в активную конформацию, связанных с высотой энергетического барьера и образованием нестабильного комплекса К₁-НА_{WT}, независимо от pH среды. Замена V615L приводит к заметному понижению свободной энергии (ΔG_0) системы (#5 и 6, таблица 2) более, чем на 10 ккал/моль по сравнению с НА_{WT}.

Таблица 2. Значения свободных энергий взаимодействия НА с камфецином.

#	Система	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	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

При $\text{pH} = 5$ высота энергетического барьера ($\Delta \Delta G \uparrow$) выше, по сравнению со значением, характерным для системы НА_{WT}. Так как активация НА происходит именно при пониженных значениях pH , данный результат можно рассматривать в качестве косвенного подтверждения снижения вирулентности мутантного вируса гриппа. Для перехода в активное состояние, которое, вероятно, предшествует конформационным перестройкам протеина, системе требуется большее количество энергии. Связывание камфецина в НА_{V615L} так же сопровождается незначительным общим снижением полной энергии системы (#5 и 7, #6 и 8 таблица 2). 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. Т. е. наличие камфецина в сайтах связывания НА не осложняет конформационный переход к активной форме, несмотря

на существенные различия в показателях энергий перехода. Известно, что противовирусное действие камфецина на мутантный, камфецин-устойчивый штамм вируса гриппа существенно меньше, чем его воздействие на дикий тип.

На основании данных молекулярно-динамической симуляции 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, гемагглютинину 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 гемагглютинин становится более стабильной структурой. Согласно данным МД симуляции для начала перехода системе требуется большее количество энергии, однако, когда процесс уже запущен, переход к активной конформации облегчается. Анализ результатов молекулярного моделирования позволяет связать этот процесс 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 расположение 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, доменным движениям белка, при переходе в активную конформацию, этот процесс не мешает.

1.2. Камфецин и гинсамид – потенциальные ингибиторы M2 протонного 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 (Е-белок), респираторно-синцитиального вируса (SH-протеин), ВИЧ (Vpr-белок) и, вируса гриппа типов А-D (M2). M2 белки участвуют в нескольких этапах репликации вируса, таких как проникновение, репликация генома, морфогенез и высвобождение из инфицированной клетки. M2 белок, длиной 97 а.о., состоит из четырех протомеров, содержит трансмембранный домен (ТМД), амфилипатические спирали и ряд неструктурных частей, обращенных во внешнюю и внутреннюю часть вириона.

Многочисленные теоретические расчеты в совокупности с экспериментальными данными не оставляют сомнений в том, что гемагглютинин вируса гриппа является биологической мишенью камфецина и гинсамида. Механизм их противовирусного действия связан с подавлением фузогенной активности НА. Однако фармакофорный профиль молекул **1** и **42** (рисунки 11А) с одной стороны, и непосредственное влияние M2 канала на активацию НА с другой, позволяет предположить альтернативный механизм противовирусной активности камфецина и гинсамида.

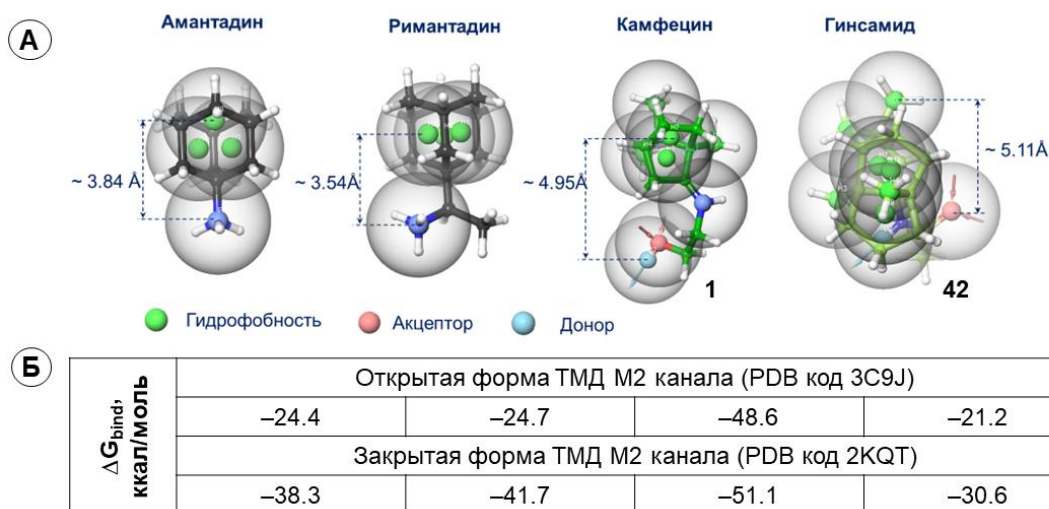


Рисунок 11. Ингибиторы протонного M2 канала: А – фармакофорный профиль известных ингибиторов M2 канала, камфецина и гинсамида; Б – энергии связывания ингибиторов в ТМД.

Вероятно, что противовирусные агенты могут связываться внутри поры протонного канала с образованием ряда межмолекулярных взаимодействий. Используя геометрические параметры закрытой и открытой форм ТМД М2 канала вируса гриппа (PDB коды 3C9J и 2KQT), были проведены процедуры молекулярного докинга камфецина и гинсамида во внутриканальный сайт связывания. В качестве соединения референса был рассмотрен амантадин. Были введены позиционные ограничения по расположению лигандов относительно соединения-референса. Оптимальные докинг-позиции были выбраны на основании минимального значения среднеквадратичного отклонения положений атомов (RMSD), для оценки значений энергии связывания (ΔG_{bind}) (рисунк 11Б). Значения энергии связывания ингибиторов внутри закрытой формы М2 канала оказались ниже, чем открытой, что согласуется с литературными данными. Энергии связывания амантадина, римантадина и гинсамида в открытой форме канала были практически равными. Энергия связывания (ΔG_{bind}) камфецина в обеих конформациях канала заметно ниже, чем энергии связывания амантадина и римантадина. 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 М2, канала, аналогично известным ингибиторам амантадину и римантадину. При этом связывание камфецина предпочтительнее остальных с точки зрения значений свободной энергии связывания.

Для процедуры молекулярного докинга были рассмотрены геометрические параметры протонного канала, советуемого штаммам A/Hong Kong/156/97 (H5N1) (открытая форма) и A/Udm/307/72 (H3N2) (закрытая форма). Аминокислотные последовательности ТМД консервативны. В положении 31 находится серин. Между тем, ингибирующая активность камфецина и гинсамида против штаммов вируса гриппа различается (рисунк 10). Гомологичные последовательности ТМ доменов протонного М2 канала штаммов A/H1N1 и A/H3N2 различаются: V27A, V28I, S31N и I39T. Тогда можно предположить, что различная противовирусная активность камфецина и гинсамида по отношению к разным штаммам вируса может зависеть от аминокислотной последовательности М2 протонного канала. При этом механизм ингибирующей активности камфецина и гинсамида может быть связан не только с влиянием на фузогенную активность НА, но и с возможностью закупоривания поры канала. Для проверки данной гипотезы необходимо проведение молекулярно-динамических симуляций полноразмерного протонного М2 канала в комплексах с камфецином и гинсамидом.

В некоммерческой базе данных Protein Data Bank представлены геометрические параметры белковых структур протонного М2 канала, в том числе в комплексе с лигандами, полученными экспериментальными (ЯМР высокого разрешения или рентгеноструктурным анализом) методами. Во всех случаях это α -спирали трансмембранного домена. Полноразмерная структура М2 канал вируса гриппа, включая штамм A/PR/8/34 (H1N1), в базе данных отсутствует. По этой причине было принято решение построить полноразмерный белок, используя пакет программ ColabFold. На первом этапе исследования была предпринята попытка предсказания структуры тетрамера, путем введения в блокнот а.о. четырех цепей. Результат расчета получился неудовлетворительным. Оценка pLDDT показывает, что только трансмембранная часть канала (выделена голубым цветом на рисунке 12А) 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, ТМД был предсказан с точностью, приближенной к экспериментальной (рисунк 12А). Тем не менее в предсказанной структуре протомера гибкая петля также представлена как продолжение спирали ТМД (на рисунке 12А 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 успешна предсказана. Далее полноразмерный канал был собран, минимизирован и помещен в мембрану и снова минимизирован методами сило-

вого поля (рисунок 12Б). В полноразмерной структуре канала был аннотирован сайт связывания. Сайт связывания расположен ближе к N-концу канала и представляет собой гидрофобную полость, размером 193 узловых точки и высоким балансом гидрофобности (11.3 единицы). Гидрофобная полость благоприятна для связывания соединений с гидрофобными фармакоформными признаками размером от 64 до 97 атомов. Место связывания полностью согласуется с определенными экспериментально местом связывания ингибиторов M2 канала.

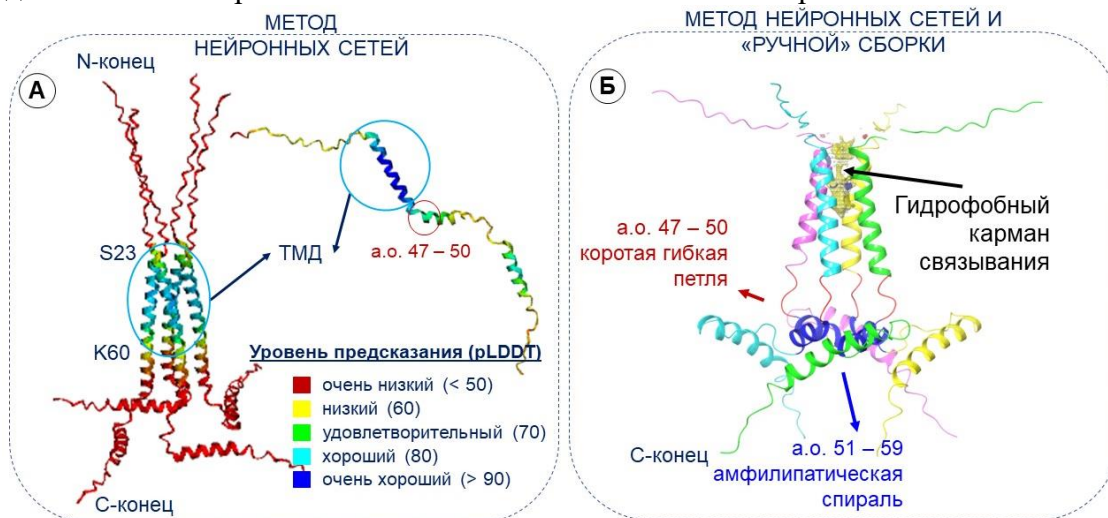


Рисунок 12. Результаты предсказания и сборки мембранного M2 канала: А – использование метода нейронных сетей Colab; Б – совокупный подход методов Colab и ручной сборки.

Процедура гибкого молекулярного докинга камфецина и гинсамида в M2 канал позволила получить стартовые модельные системы для молекулярно-динамических симуляций. Регистрируемое время симуляции составило 200 нс. Анализ изменения среднеквадратичного отклонения положений атомов (RMSD) белка и лигандов свидетельствует от том, что обе системы уравнились к концу симуляции. Камфецин и гинсамид располагаются в гидрофобном кармане. Продолжительное время камфецин образует водородную связь с A30 (более 40% времени симуляции) и π -катион стекинг с H37 (более 25%) (рисунок 13А). 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. Гинсамид взаимодействует с меньшим количеством а.о. при нахождении в поре канала, в отличие от камфецина. Наиболее продолжительным контактом является водородная связь с A30 (рисунок 13Б). Предположительно гинсамид плотно «застревает» в поре, с образованием гидрофобных контактов.

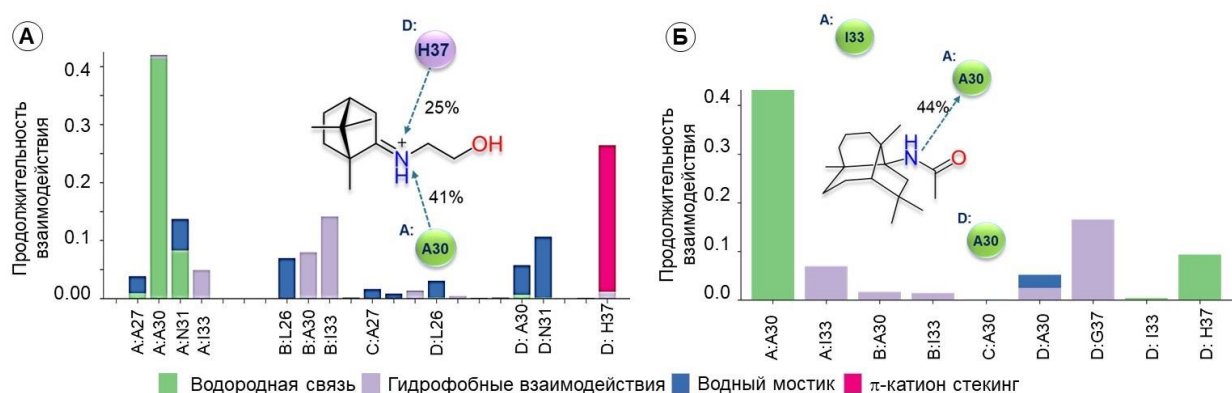


Рисунок 13. Результат молекулярно-динамических симуляций: А, Б – продолжительность межмолекулярных контактов, образующихся между атомами лигандов: камфецина (А) и гинсамида (Б) и атомами а.о. M2 канала. Продолжительность взаимодействий соответствует доли времени молекулярно-динамических симуляций, где значение 0.4 соответствует 40% времени, в течение которого регистрируются межмолекулярные взаимодействия.

Исходя из результатов проведенных расчетов подтверждается гипотеза о возможном взаимодействии камфецина и гинсамида с ТМД М2 канала за счёт липофильных контактов. При связывании агентов **1** и **42** происходит формирование энергетически выгодного лиганд-белкового комплекса, который не способен выполнять свои нативные функции. Данный факт можно рассматривать как элемент мультитаргетной схемы подавления механизма входа вирусных частиц (в данном случае – вируса гриппа), дополняющий целевую активность, направленную на подавление фузогенной активности гемагглютинаина. 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. Описанный в данном разделе подход может быть использован для предсказания виропооринов других вирусных белков, в том числе и патогенных коронавирусов.

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

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 С-концевым сегментом, обращенным внутрь вириона. S-белок 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. Структурное моделирование белковых мономеров коронавируса S показывает, что субъединицы S₁ и S₂ образуют луковичную головку и область стебля. Субъединица S₁ содержит два субдомена, N-терминальный домен (НТД) и С-терминальный домен (СТД). Трансмембранное звено S₂ содержит домены, участвующие в слиянии вирусной и клеточной мембран. К ним относят слитый пептид и два гептадных повтора HR₁ и HR₂. Домены HR состоят из α -спиралей и, как правило, их положение и аминокислотная последовательность для всего семейства коронавирусов консервативна. 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. Ингибиторы S-белка SARS-CoV-2 могут связываться в области рецептор-связывающего домена (РСД) и/или в стеблевой части в области гептадных повторов. В первом случае связывание малых молекул может привести к блокированию места связывания РСД с ангиотензин превращающим ферментом 2 (АПФ2), в другом случае препятствовать конформационным перестройкам в гептадных повторах и влияет на процесс слияния вирусных и клеточных мембран.

2.1. Поиск места связывания ингибиторов S-белка на примере умифеновира

В начале пандемии COVID-19 противогриппозный препарат умифеновир или арбидол рассматривался в качестве кандидата на лекарственный препарат против вирусной инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2. Умифеновир ингибирует вирус SARS-CoV-2 в тестах *in vitro*. Согласно ранее опубликованным данным, значения IC₅₀ и CC₅₀ составляют 4.11–10 μ M и 31.79–100 μ M, соответственно. Максимальную противовирусную активность умифеновир проявляет на первых стадиях заражения. Активность умифеновира исследовалась против псевдовирусных частиц, несущих на своей поверхности гликопротеин вируса SARS-CoV-2⁴. В условиях данного эксперимента умифеновир проявляет свою активность в дозе IC₅₀ = 8.32 $\pm$ 3.06 μ M и обладает цитотоксичностью на клетках HEK293T в дозе CC₅₀ = 30.99 $\pm$ 3.85 μ M (рис. 14А). Результаты данного эксперимента подтверждают, что умифеновир обладает актив-

⁴ Биологические эксперименты по оценке противовирусной активности в отношении коронавирусов проводились в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» в группе в.н.с. к.б.н. Щербакова Д. Н.

ностью в отношении вируса SARS-CoV-2, однако терапевтический индекс, отвечающий за эффективность этого агента не высокий. Вероятно, что основной биологической мишенью умифеновира является именно поверхностный S-белок коронавируса SARS-CoV-2. Однако его место связывания в поверхностном белке до сих пор является спорным вопросом.

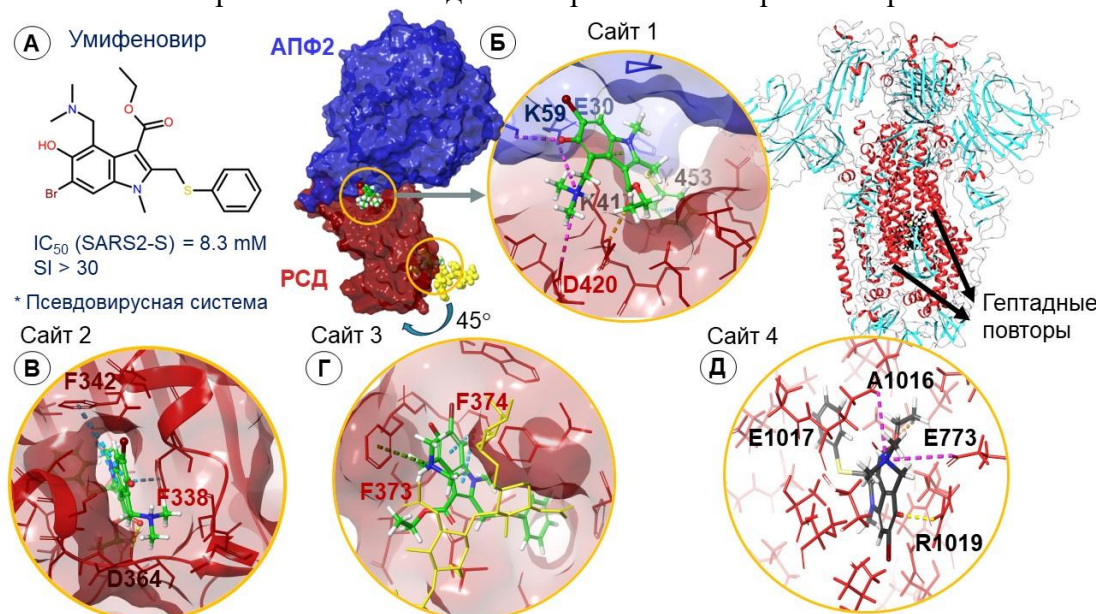


Рисунок 14. Сайты связывания Умифеновира в S-протеине SARS-CoV-2: А – сайт, описанный в интерфейсе связывания РСД и АПФ2; Б, В – сайты в области гликозилирования домена; Г – сайт в области гептадных повторов S₂.

В рамках данной работы были использованы широкомасштабные методы молекулярного моделирования, сочетающие в себе молекулярно-динамические симуляции, процедуры гибкого молекулярного докинга с оценкой энергии связывания лиганда и белка⁵. При этом «шаблонный» подход, используемый в подобных теоретических исследованиях, был изменен. В большинстве случаев методы молекулярной динамики используют после процедур молекулярного докинга. Такой подход работает, если достоверно определена не только потенциальная биологическая мишень, но и место связывания, рассматриваемого лиганда. В случае описания механизма противовирусного действия умифеновира место связывания последнего достоверно не определено. Используя методы молекулярной динамики, была создана модель взаимодействия нескольких молекул умифеновира с рецептор-связывающим доменом и с комплексом РСД-АПФ2. Было рассмотрено поведение нескольких молекул умифеновира (от 1 до 20 молекул с шагом 5) и их совокупное влияние на поверхность протеина. Кластерный анализ траекторий молекулярной динамики позволил рассмотреть вероятные области контакта умифеновира с поверхностью белка. Были определены статистически значимые сайты связывания, расположенные в интерфейсе контакта РСД и АПФ2, в полостях домена (при отдельном его рассмотрении) и в области гептадных повторов в стеблевой части S-белка.

Сайт 1 расположен в контактной зоне РСД и АПФ2 (рисунок 14Б) рядом с ключевыми а.о. со стороны домена K₁₄₁₇, Y₁₄₅₃, Q₁₄₉₃ и Y₁₄₄₉ и фермента: H3, K26, E30, Q35 и D38. Сайт 2 представляет собой гидрофобную полость рядом с гликозилированным а.о. N₁₃₄₃ (рисунок 14В); сайт 3 (рисунок 14Г) фактически является тем же местом связывания, что и сайт 2. Отличие составляет наличие углеводного остатка при N₁₃₄₃. Предполагается, что углеводный остаток может повлиять на связывание умифеновира в данной полости белка. И, наконец, сайт 4 расположен в области гептадных повторов второй S₂ субъединицы белка (рисунок 14Д). Анализ траекторий молекулярно-динамических симуляций позволил получить геометрические пара-

⁵ Расчеты проводились совместно с с.н.с. Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова к.х.н. Гуреевым М. А и с.н.с. лаборатории физико-химических методов анализа УФИХ УФИЦ РАН к.х.н. Хамитовым Э. М.

метры статистически значимых комплексов, приведенных на [рисунке 14Б-Д](#) и оценить энергию связывания (ΔG_{bind}). Связывание умифеновира в интерфейсе контакта (сайт 1) домена и фермента характеризуется самой высокой энергией ([таблица 3](#)). При этом минимальная энергия связывания характерна для расположения лиганда в области гептадных повторов S₂ (сайт 4). Энергия связывания Умифеновира в области гликозилирования не зависит от присутствия углеводного остатка при N₁₃₄₃ (сайты 2 и 3), однако расположение лиганда в сайте связывания различается.

С одной стороны, анализ результатов молекулярно-динамических симуляций не исключает возможность связывания умифеновира в области РСД и/или в интерфейсе контакта домена и АПФ2. Связывание лиганда в полости поверхностного S-белка SARS-CoV-2 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.

Таблица 3. Оценка энергии связывания Умифеновира в вероятных сайтах связывания.

Сайт связывания	Место расположения	ΔG_{bind} , ккал/моль	Взаимодействия с а.о.	
			Водородные связи	Другие виды
Сайт 1	Интерфейс связывания домена и фермента	-48.7	АПФ2: K26 РСД: K1417	ACE-2: Q96 – галоген-связь K26, E30 – солевые мостики RBD: K1417 – π -катион стекинг Y453 – π - π стекинг
Сайт 2	Область гликозилирования N ₁₃₄₃	-69.8	D ₁₃₆₄	F ₁₃₃₈ , F ₁₃₄₂ π - π стекинг
Сайт 3	Область гликозилирования N ₁₃₄₃	-69.5	NAG	F ₁₃₇₃ π -катион стекинг F ₁₃₇₄ π - π стекинг
Сайт 4	Область гептадных повторов, пептид слияния	-71.2	R ₂₁₀₁₉	E ₂₇₈₀ – солевой мостик L ₂₇₂₇ , V ₂₁₀₄₀ , F ₂₁₀₄₂ , L ₂₁₀₂₄ – гидрофобные

Расположение умифеновира в стеблевой части гемагглютинина (НА) вируса гриппа 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 связи и солевые мостики ([рисунк 15А](#)). В стеблевой части НА 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 15Б](#)). Таким образом, 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 умифеновиром⁶.

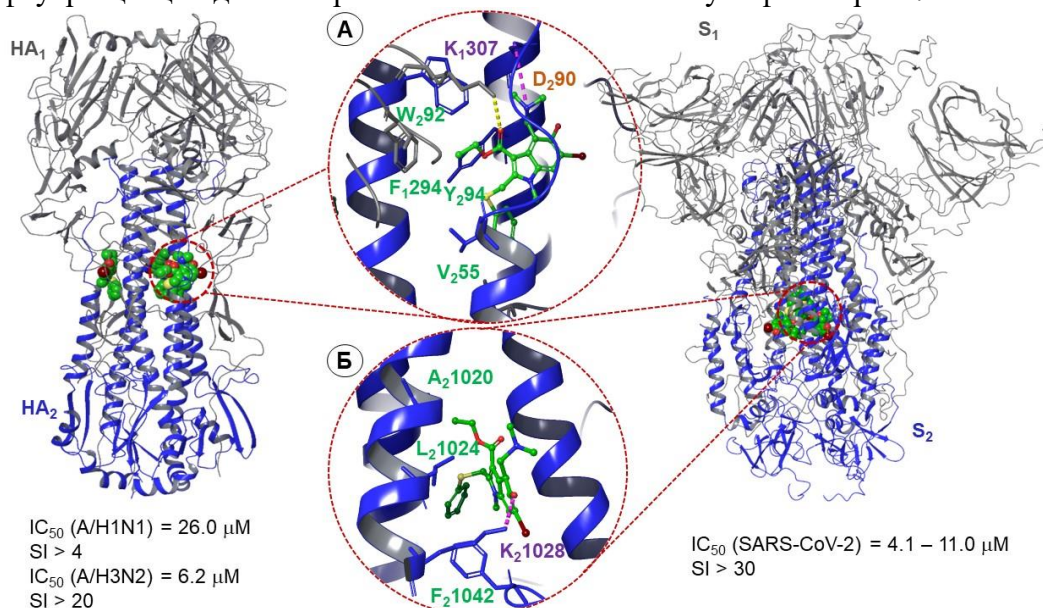


Рисунок 15. Сайты связывания Умифеновира в HA вируса гриппа и S-белке SARS-CoV-2: А – расположение лиганда в ТБГХ-сайте HA; Б – расположение лиганда в области гептадных повторов S-белка.

Совокупный анализ биологических экспериментов и результатов молекулярного моделирования позволяют утверждать, что умифеновир связывается в области гептадных повторов S₂ субъединицы поверхностного белка SARS-CoV-2. Умифеновир ингибирует фузогенную активность S-белка SARS-CoV-2, не препятствуя связыванию РСД с АПФ2, что было показано в дополнительных биологических экспериментах с помощью иммуоферментного анализа.

2.2. Описание механизма противовирусного действия производных эфиров (–)-борнеола

На основании результатов ряда биологических экспериментов ряда производных эфиров (–)-борнеола выбрали два соединения-лидера **45** и **46** (рисунок 16), проявляющие выраженную противовирусную активность против инфекционного 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).

Активны в отношении SARS-CoV-2			
Wuhan Lineages B	Delta Lineage B.1.617.2	Omicron Lineage B.1.1.529	
IC ₅₀ = 9.6 μM	SI = 32	IC ₅₀ = 4.7 μM	SI = 71
IC ₅₀ = 17.6 μM	SI = 17	IC ₅₀ = 3.5 μM	SI = 96
IC ₅₀ = 7.7 μM	SI = 40	IC ₅₀ = 3.3 μM	SI = 102
Ингибируют HA			
IC ₅₀ (A/H1N1) = 34 μM	IC ₅₀ (A/H1N1) = 7.4 μM	IC ₅₀ (A/H1N1) = 5.1 μM	IC ₅₀ (A/H1N1) = 2.4 μM
Активны в отношении A/H1N1/PR/8/34			

Рисунок 16. Соединения, проявляющие активность против вируса гриппа (**1**, **36**, **45**, **46**) и против разных штаммов вируса SARS-CoV-2 (**45**, **46**).

Примечательно, что активность соединений против разных штаммов вируса соизмерима. Молекулы имеют общий с камфецином (**1**) и четвертичной аммонийной солью на основе (–)-борнеола (**36**) гидрофобный жесткий скаффолд и донорно-акцепторные центры, включая

⁶ Эксперименты проводились в лаборатории химической физики УФИХ УФИЦ РАН под руководством с.н.с., к.х.н. С. С. Остахова.

протонированный атом азота. В ранее опубликованных данных показано⁷, что **45** и **46** проявляют умеренную активность против вируса гриппа, а соединения **1** и **36** ингибируют фузогенную активность гемагглютинаина (рисунок 16). Вероятно, что противогриппозная активность **45** и **46** также связана с ингибированием НА. Можно предположить, что соединения могут связываться в стеблевой части белка в ТБГХ- и/или К-сайтах стабилизируя префузионную конформацию. Вероятно, рассматриваемые производные эфиров (–)-борнеола также могут связываться и в стеблевой части S-белка SARS-CoV-2. Другими словами, соединения **45** и **46** теоретически могут ингибировать фузогенную активность обоих поверхностных вирусных белков: гемагглютинаина вируса гриппа и S-белка коронавируса, аналогично умифеновиру. Можно предположить, что соединения **45** и **46** могут связываться в области гептадных повторов S-белка, в месте связывания умифеновира (рисунок 15Б). Необходимо еще раз подчеркнуть, что противовирусная активность эфиров **45** и **46** в отношении трех разных штаммов SARS-CoV-2 практически одинаковая.

Хорошо известно, что в течение продолжающейся пандемии коронавирусной инфекции происходит адаптация вируса к клетке человека-хозяина, в результате мутаций аминокислотных последовательностей именно в поверхностном S-белке (рисунок 17А). Множественные мутации встречаются в первой субъединице S₁ в N-терминальном и рецептор-связывающих доменах (рисунок 17А), в то время как во второй субъединице S₂ они носят точечный характер. Другими словами, исследуемые соединения, вероятно, связываются в стеблевой части белка в области гептадных повторов, где мутации практически не наблюдаются.

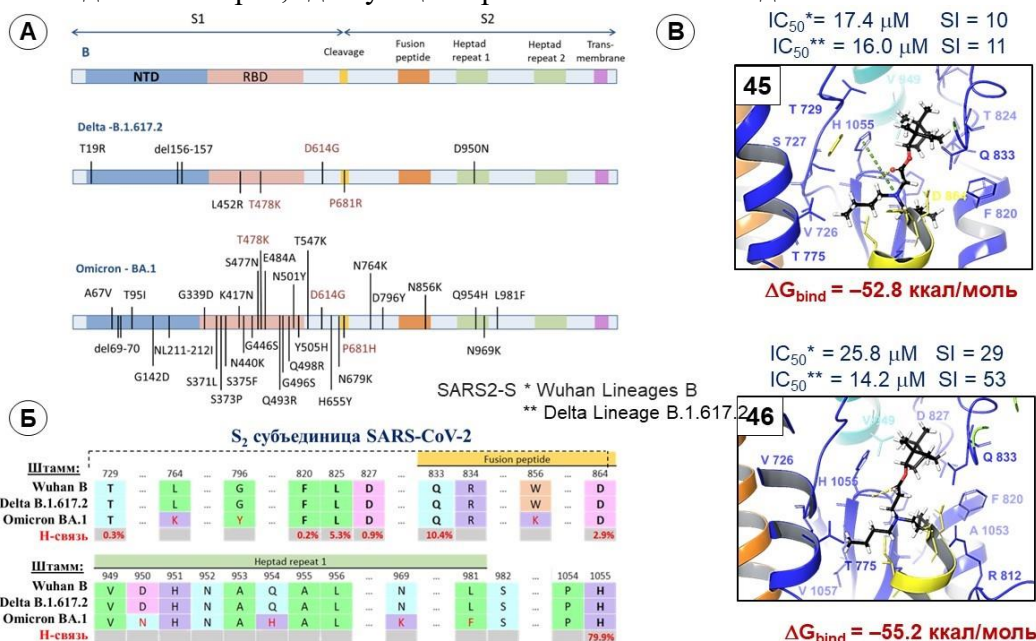


Рисунок 17. Молекулярное моделирование S-белка SARS-CoV-2: А – показаны мутации в а.о. S-белка SARS-CoV-2 трех штаммов; Б – выравнивание аминокислотных последовательностей участка связывания в S₂ субъединицы: точечные мутации показаны красным шрифтом. Продолжительность водородной связи между атомами лиганда и а.о. показана в % и указывает процент от всего времени симуляции. В – расположение соединений **45** и **46** в сайте связывания: водородные связи показаны желтой прерывистой линией, π -катион взаимодействие – зеленой прерывистой линией. Значения IC_{50} иллюстрируют противовирусную активность против двух типов псевдовиральной системы, содержащей S-белки разных штаммов вируса SARS-CoV-2.

С этой точки зрения сайт связывания умифеновира кажется наиболее подходящим. Тогда была проведена процедура молекулярного докинга исследуемых соединений в данный сайт связывания. Геометрические параметры оптимальных докинг позиций были использованы для последующих молекулярно-динамических симуляций в течение 100 нс. Анализ траекторий позволил оценить значимые межмолекулярные контакты между атомами лигандов и окружа-

⁷ MedChemComm, 2017. Vol. 8 (5). P. 960-963. 10.1039/C6MD00657D

ющих а.о. Показано (рисунк 17Б), что водородные связи регистрируются между атомами лигандов и консервативными аминокислотами. Этот результат находится в согласии с результатами биологического эксперимента. Этот факт можно рассматривать в качестве дополнительного доказательства обоснованного выбора места связывания. Сайт связывания исследуемых соединений расположен во второй субъединице S₂ S-белка в области центральных (CHR) и гептадных повторов (HR1) ближе к пептиду слияния. Сайт насыщен алифатическими гидрофобными а.о., такими как аланин, лейцин, валин и пролин. Соединения **45** и **46** располагаются в сайте связывания преимущественно с образованием водородной связи с H₂1055 (рисунк 17Б, В). Это самый продолжительный контакт между атомами лигандов и а.о. сайта связывания, регистрируемый в течение всего времени симуляции, кроме липофильных контактов с гидрофобными аминокислотами. Процедура кластеризации (анализа фреймов молекулярной динамики) позволила определить статистически значимые лиганд-белковые комплексы, для которых была оценена энергия связывания (ΔG_{bind}). Расположение эфира **45** в области центральных и гептадных повторов сопровождается образованием π -катион стекинг взаимодействием между протонированным атомом азота лиганда и ароматическим кольцом H₁1055 (рисунк 17В). Связывание обеих молекул сопровождается гидрофобными взаимодействиями между липофильными частями ингибиторов (камфорный фрагмент и бутильные заместители) и гидрофобными аминокислотами. Энергии связывания (ΔG_{bind}) обоих лигандов соизмеримы, как и значения их противовирусной активности. Дополнительные биологические эксперименты подтвердили, что исследуемые соединения **45** и **46** нейтрализуют псевдовирусную систему, несущую на поверхности вириона S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2 в концентрации не более 18 μM и 26 μM , соответственно (рисунк 17В). При этом вещества не препятствуют связыванию РСД с АПФ2, что было показано в тестах ИФА.

Таким образом, описанный в данном разделе масштабный теоретический эксперимент в совокупности с данными биологического эксперимента позволяет утверждать, что механизм противовирусного действия эфиров **45** и **46** вероятно, связан с их влиянием на S-белок SARS-CoV-2. Соединения связываются в гидрофобных пространствах белка между α -спиралями S₂ субъединицы гликопротеина, подавляя тем самым его фузогенную активность.

2.3. Механизм противовирусной активности производных усниновой кислоты

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). Соединения нейтрализуют псевдовирусную систему, несущую на своей поверхности S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2. При этом в тестах ИФА они не препятствуют связыванию рецептор-связывающего домена с клеточным рецептом. Анализ результатов биологических экспериментов позволил выбрать три соединения-лидера **47–49** (рисунк 18), механизм противовирусного действия которых исследовался методами молекулярного моделирования.

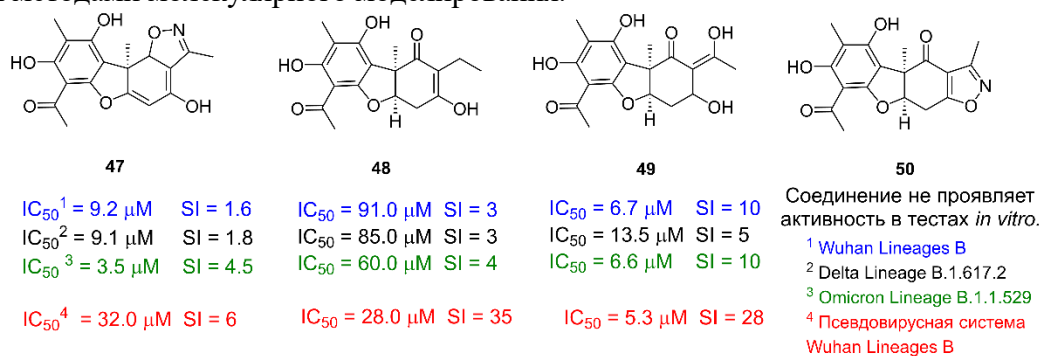


Рисунок 18. Производные (+)-усниновой кислоты, проявляющие активность в отношении SARS-CoV-2.

Соединение **50** рассматривалась в качестве отрицательного контроля. В качестве потенциальной биологической мишени рассмотрели поверхностный вирусный S-белок SARS-CoV-2. Место связывания лигандов искали по соответствию фармакофорного профиля соединений

фармакофорному профилю полостей в поверхности белка благоприятных для расположения исследуемых лигандов. Для моделирования были рассмотрены три вероятных сайта: сайт связывания биливердина ([рисунок 19А](#)) (геометрические параметры лиганд-белкового комплекса расшифрованы методом рентгеноструктурного анализа соответствуют PDB коду 7B62); сайт связывания нельфинавира ([рисунок 19Б](#)), расположенный в полости между двумя субъединицами S-белка (сайт определен на основании молекулярного моделирования в совокупности с биологическими экспериментами и описан в научной литературе); место связывания умифеновира ([рисунок 19В](#)), расположенное в области гептадных повторов S₂ (сайт связывания определен и описан в [разделе 2.1](#) данной работы).

Анализ результатов молекулярного докинга (энергетические параметры, визуализация межмолекулярных контактов и соответствие фармакофорному профилю потенциального лиганда) позволяет предположить, что место связывания биливердина можно рассматривать в качестве вероятного сайта связывания производных усниновой кислоты. Необходимые фармакофорные признаки у лигандов наблюдаются во всех соединениях (от 3 до 4 среди 7 возможных). Расположение активных соединений (**48**, **49**) в сайте связывания биливердина ([рисунок 19А](#)) не сопровождается стерическими затруднениями. Связывание соединения-лидера **49** отличается самым низким значением энергетического параметра (docking score), характеризующего стыковку молекулы с полостью белка, в то время как неактивное соединение **50** – самым высоким. Производное **49** образует водородные связи с аминокислотами I₁₀₁, N₁₂₁ и S₁₉₄ и π-катион стекинг с R₁₉₀.

Фармакофорные признаки лигандов **47–50** хуже подходят к фармакофорному профилю сайта связывания нельфинавира ([рисунок 19Б](#)). Только в соединении **47** количество подходящих фармакофорных признаков составляет более 2 из 6 возможных. Этот сайт связывания более объемный, о чем свидетельствуют расстояния между фармакофорными признаками. Энергетические параметры связывания агентов **47–50**, характеризующие аффинность лигандов к сайту связывания нельфинавира, выше, чем к сайту связывания биливердина. Расположение соединения **49** сопровождается образованием водородной связи с Q₂₁₀₈₀.

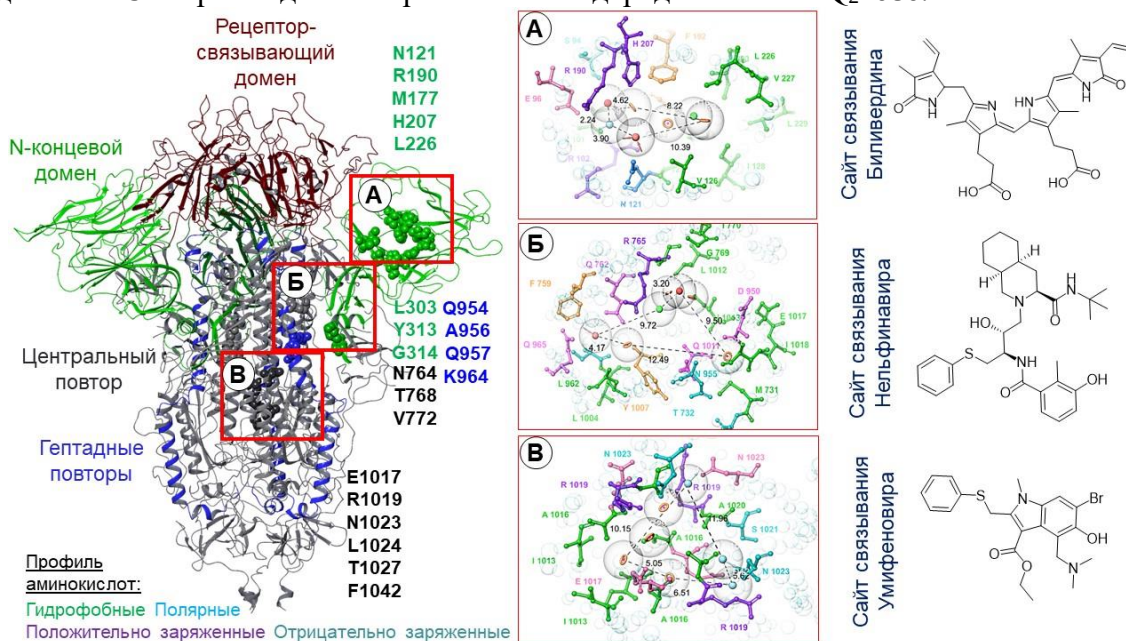


Рисунок 19. Вторичная структура поверхностного белка SARS-CoV-2: N-терминальный домен (а.о. с 14–330) показана зеленым цветом, рецептор-связывающего домена (а.о. с 330–528) показана темно-красным цветом, гептадных повторов (а.о. с 910–985) – синим цветом. А-В – фармакофорный профиль сайтов связывания 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 заряженная группа. Расстояния между фармакофорными признаками указаны в Å. Аминокислоты показаны в радиусе 4Å от вероятного расположения лиганда.

Сайт связывания умифеновира ([рисунки 19В](#)) не подходит для расположения исследуемых лигандов. Об этом свидетельствует фармакофорный профиль сайта и высокие значения энергетического параметра стыковки. Кроме того, результаты молекулярного докинга лигандов в сайт связывания умифеновира не коррелируют с экспериментальными данными. Таким образом, результаты молекулярного докинга в совокупности с результатами биологических экспериментов позволяют предположить, что производные усниновой кислоты могут связываться в N-терминальном домене S₁ субъединицы поверхностного белка. Связывание лигандов **47–50** не будет препятствовать контакту рецептор-связывающего домена с клеточным ферментом, однако блокирование N-терминального домена может повлиять на реактивность S-белка.

Вышеописанные результаты позволяют предположить, что механизм противовирусного действия тиазол-гидрозон производных **51–53** на основе (+)-усниновой кислоты ([рисунки 20](#)) и производного **54** на основе (–)-усниновой кислоты также может быть связан с блокированием N-терминального домена.

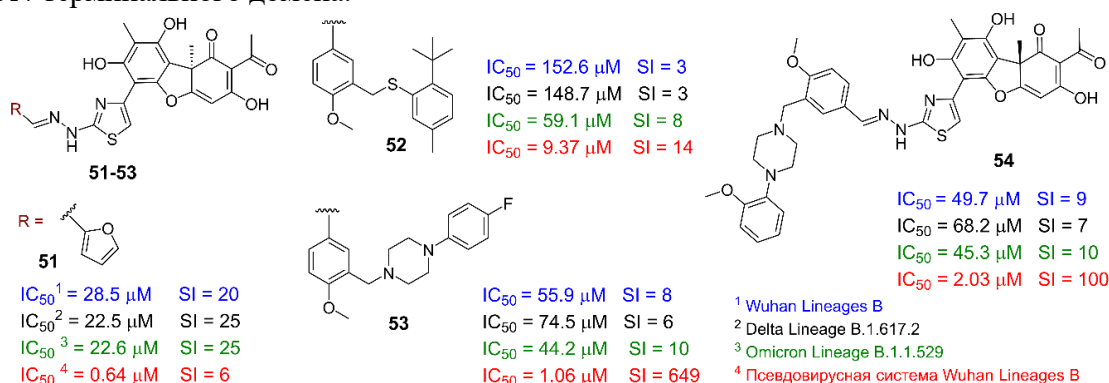


Рисунок 20. Тиазол-гидразол производные на основе (+)-усниновой кислоты (**51–53**) и на основе (–)-усниновой кислоты (**54**) активные в отношении SARS-CoV-2.

Соединения **51–54** нейтрализуют ряд патогенных штаммов инфекционного вируса SARS-CoV-2 в микромолярных концентрациях, а также ингибируют псевдовиральную систему, несущую на своей поверхности S-гликопротеин. При этом в тестах ИФА производное **51** также может ингибировать связывание РСД с АПФ2, но в очень высоких, порядка 250 μM, концентрациях. Функция N-терминального домена связана с раскрытием РСД для обнажения мотива связывания с АПФ2. Связывание соединений **51–54** в N-терминальном домене может оказать влияние на вторичную структуру домена и подвижность РСД. Значения противовирусной активности соединений этой группы в отношении указанных штаммов в целом соизмеримы. При этом аминокислотная последовательность N-ТД разных штаммов вируса различается ([рисунки 21А](#)).

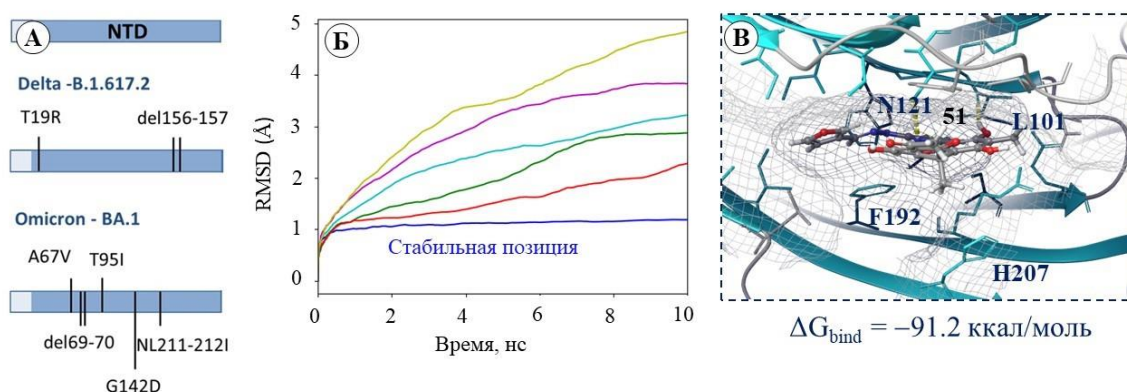


Рисунок 21. Анализ результатов молекулярного моделирования: А – выравнивание аминокислотных последовательностей N-терминального домена трех штаммов вируса SARS-CoV-2; Б – изменение значений RMSD для рассматриваемых докинг-позиций соединения **51** в течение МД; В – расположение лиганда в сайте связывания.

Однако анализ поверхности гликопротеина показывает, что мутлирующие а.о. удалены от сайта связывания на расстоянии более 10 Å. Тогда была проведена процедура молекулярного

докинга соединений **51–54** в сайт связывания биливердина ([рисунок 21А](#)). В качестве биологической мишени использовали геометрические параметры N-терминального домена SARS-CoV-2 штамма Wuhan Lineages B. Оптимальную докинг-позицию выбрали такую, которая соответствовала стабильному лиганд-белковому комплексу. Выбор основывался на анализе траекторий молекулярной метадинамики ([рисунок 21Б](#)). Лиганды, на примере соединения-лидера **51**, связываются в сайте связывания биливердина с образованием ряда межмолекулярных взаимодействий ([рисунок 21В](#)). Связывание агента **51** происходит с формированием водородных связей с N₁121 и L₁101. Расположение других соединений дополнительно характеризуется образованием π - π стекинг взаимодействий с ароматическими а.о. При этом лиганды образуют межмолекулярные контакты с консервативными аминокислотами.

Результаты расчета находятся в согласии с экспериментальными данными, что свидетельствует о адекватном выборе биологической мишени. Противовирусная активность производных усниновой кислоты, вероятно, связана с влиянием на функции N-терминального домена первой S₁ субъединицы SARS-CoV-2.

Глава 3. Ингибирующая активность малых молекул в отношении поверхностного F-белка респираторно-синцитиального вируса

F-протеин, один из двух основных гликопротеинов респираторно-синцитиального вируса (PCV), расположен на поверхности вириона и контролирует начальные фазы инфекции, вызывая слияние вирусных и клеточных мембран. Гликопротеин состоит из 574 а.о., общей молекулярной массы около 70 кДа. Белок существует в виде тримера протомеров, свернутых до слияния в компактную конформацию. Три ковалентно связанные дисульфидным мостиком субъединицы F₂/F₁ образуют конусообразную структуру с шаровидной головкой и удлинённым стеблем. В центральной части тримера расположена полость DS-Cav1 благоприятная для связывания ингибиторов F-белка. Ключевыми а.о. (с точки зрения связывания лигандов) являются F137, L138, F140 и F141 со стороны пептида слияния, и E487, F488 и D489 со стороны гептадного повтора. 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. Объем сайта связывания более 500 Å³ подходит для связывания молекул, состоящий из атомов количеством до 101, и содержащих более одного ароматического фрагмента, донорную и акцепторную группу и минимум один гидрофобный фрагмент.

3.1. Описание механизма противовирусного действия замещенных фенилкумаринов

Замещенные кумарины проявляют противовирусную активность в отношении PCV типа А и В ([рисунок 22А](#))⁸. Согласно результатам эксперимента по времени добавления, соединение-лидер **55** активен в отношении вируса на первых стадиях его жизненного цикла. Тогда в качестве вероятных биологических мишеней могут быть рассмотрены поверхностные вирусные F- и/или G-белки.

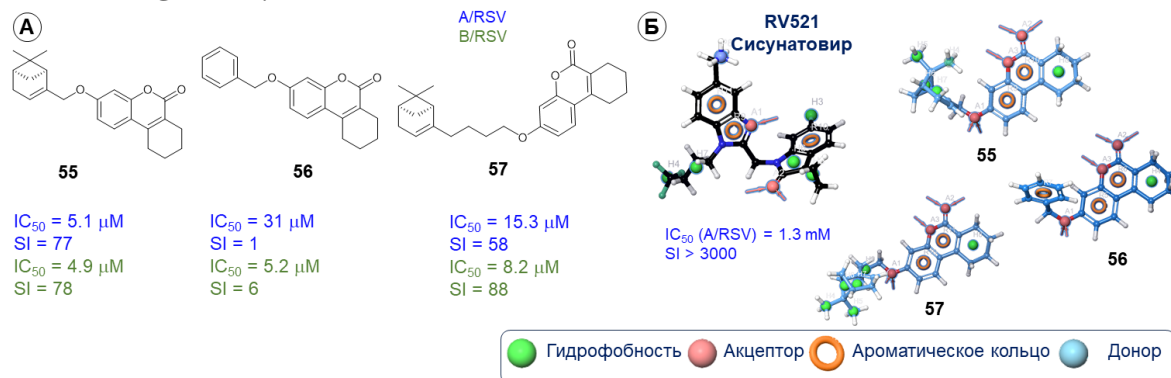


Рисунок 22. Замещенные кумарины активные в отношении PCV: А – структурные формулы; Б – фармакофорный профиль ингибитора F-белка PCV сисунатовира и замещенных кумаринов.

⁸ Биологические эксперименты по оценке противовирусной активности соединений в отношении PCV проводились в НИИ Гриппа имени А. А. Смородинцева в группе к.б.н. А.А. Штро

При этом активность агентов **55–57** 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. Кроме того, показано ([рисунок 22Б](#)), что фармакофорный профиль соединений **55–57** и известного ингибитора **RV521** (сисунатовир) содержит схожие признаки, такие как ароматические кольца, акцепторы водородных связей и гидрофобные группы ([рисунок 22Б](#)). Все вышесказанное позволяет рассматривать F-белок, в качестве биологической мишени противовирусного действия производных кумаринов.

Пространственная структура лиганд-белкового комплекса **RV521** в F-белке (**RV521-F**) расшифрована методом рентгеноструктурного анализа только для мономера F-белка. Для корректной процедуры молекулярного докинга была проведена сборка полноразмерного тримера белка, в полости связывания DS-Cav1 которой расположена одна молекула соединения-референса. Молекулярный докинг производных кумаринов **55–57** в сайт связывания ингибиторов F-белка был проведен с использованием принудительного (гибкого) протокола докинга. Анализ энергетических параметров и визуализация расположения молекул в полости связывания позволяют сделать вывод, что противовирусная активность исследуемых соединений может быть связана с влиянием на функционирование F-белка РСВ. Геометрические параметры лиганд-белкового комплекса **55-F** были использованы для построения модельной системы для молекулярно-динамических симуляций. Основная цель расчета заключалась в оценке поведения соединения **55** в полости белка и анализе ключевых межмолекулярных взаимодействий между атомами лиганда и а.о. сайта связывания. Модельная система была построена таким образом, чтобы трансмембранный домен белка (а.о. 525–550) был погружен в вирусную мембрану. В течение всего времени симуляции лиганд располагается внутри симметричного сайта связывания и не диффундирует в растворитель. Располагаясь в сайте связывания, лиганд **55** образует в основном гидрофобные взаимодействия с симметричным набором а.о. сайта связывания ([рисунок 23А](#)).

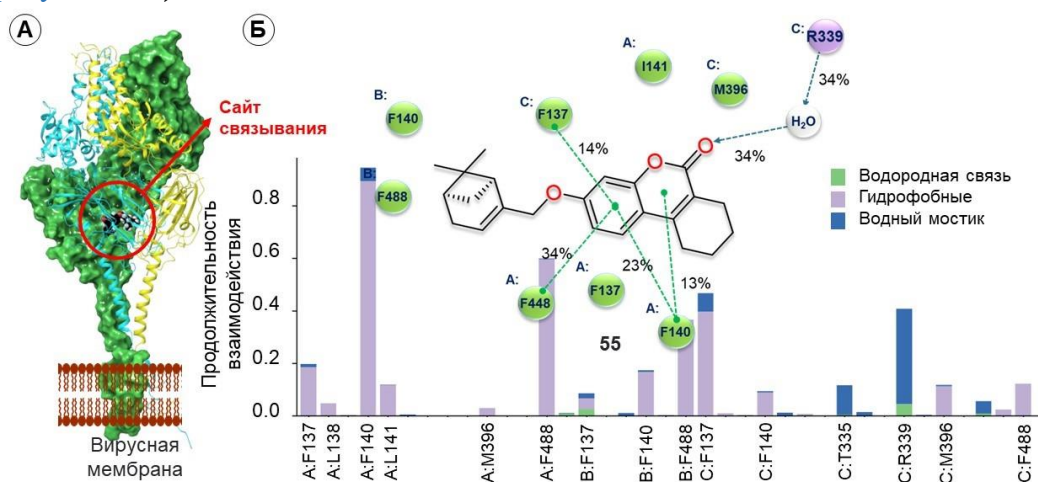


Рисунок 23. Визуализация результатов молекулярной динамики: А – положение лиганда **56** в сайте связывания; Б – статистический анализ межмолекулярных взаимодействий между атомами лиганда **56** и а.о. сайта связывания.

Лиганд контактирует с а.о. трех протомеров. В основном регистрируются гидрофобные π - π катион стекинговые взаимодействия с фенилаланинами (F137, F140) петли слияния и с F488 гептадного повтора ([рисунок 23Б](#)). Подобные контакты фиксируются в течение 80% времени симуляции. Дополнительно регистрируются, непродолжительные по времени, водородные связи и контакты, опосредованные водой. Самым продолжительным из указанных контактов является взаимодействие с R339. Анализ результатов молекулярного моделирования позволяет отметить следующее: соединение **55** 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 взаимо-

действий 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.

Исходя из описанных выше результатов, было выдвинуто предположение, что механизм противовирусного действия в отношении РСВ ряда других производных фенилкумаринов (рисунки 24) может быть также связан с влиянием на фузогенную активность F-белка.

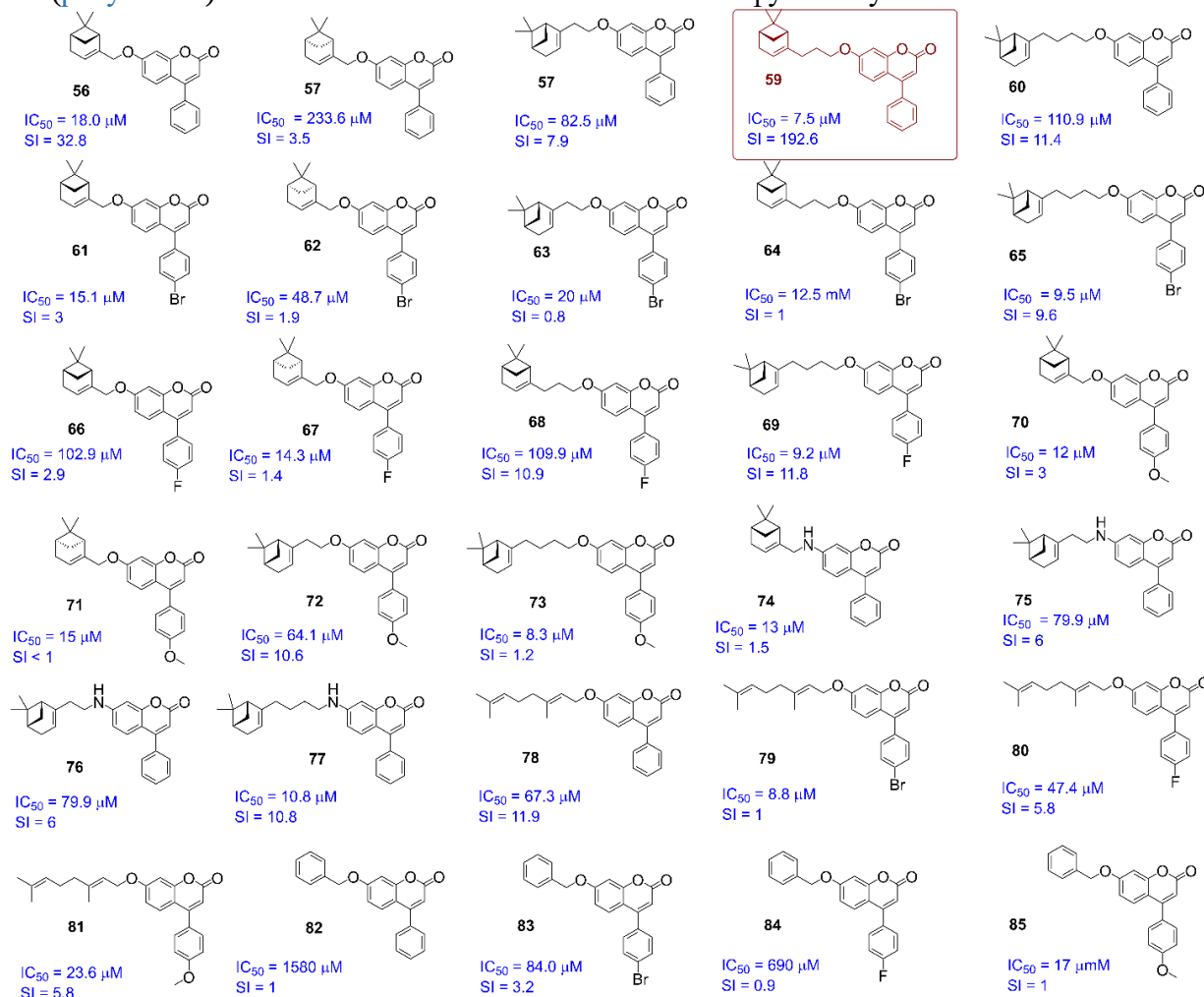


Рисунок 24. Производные фенилкумаринов активные в отношении РСВ типа А.

Соединения **58–86** были подвержены процедуре молекулярного докинга в сайт связывания ингибитора F-белка **RV521**. Согласно результатам расчета, агенты **55–85** проявляют аффинность к сайту связывания. Ароматические кольца лигандов, в основном, образуют π - π стекинг взаимодействия с ключевыми а.о.: F137, F140, F488. На основании анализа результатов молекулярного докинга были выбраны оптимальные докинг-позиции для оценки энергии связывания лигандов с F-белком. В целом значения ΔG_{bind} коррелируют со значениями pIC_{50} (рисунки 25А). Однако точка, соответствующая агенту **57** «выпадает». При исключении ее из графика индекс корреляции возрастает с 0.51 до 0.68 единиц. Соединения **56** и **57** являются стереоизомерами, и, вероятно, их разная противовирусная активность может быть связана с их различным расположением в сайте связывания. Для лиганд-белкового комплекса (**59-F**, где **59** – соединение лидер) были проведены молекулярно-динамические симуляции в течение 100 нс. Трансмембранный домен полноразмерного F-белка был погружен в мембрану. В течение всего времени симуляции лиганд располагается внутри симметричного сайта связывания и не диффундирует в растворитель. Агент **59** образует в основном гидрофобные взаимодействия с симметричным набором а.о. сайта связывания: пептида слияния (а.о. 137–141) и гептадного повтора (а.о. 335, 396–400, 487, 488) (рисунки 25Б). Более 80% времени симуляции сохраняется

водородная связь между карбонильным кислородом и F140, более 50% времени – гидрофобный контакт с F488. Дополнительно регистрируются, непродолжительные по времени, контакты, опосредованные водой.

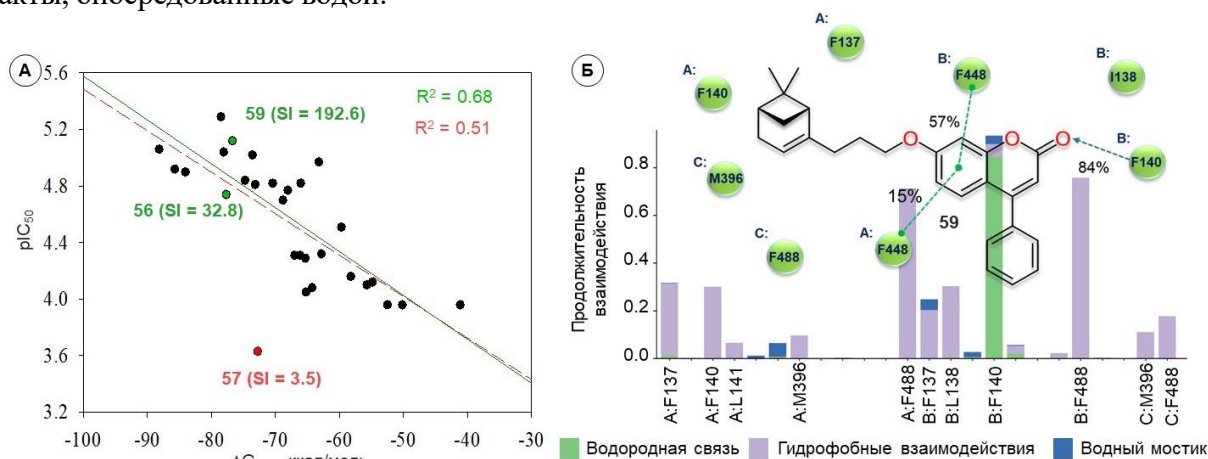


Рисунок 25. Анализ результатов молекулярного моделирования: А – корреляция результатов молекулярного моделирования и биологических тестов (*in vitro*), Б – анализ траектории молекулярно-динамической симуляции лиганд-белкового комплекса **59-F**-белок.

Дополнительно для лиганд-белковых комплексов **56-F** и **57-F** провели молекулярно-динамические симуляции (100 нс) с целью описания природы взаимодействия двух стереоизомеров с а.о. сайта связывания. Модельные системы также включали в себя вирусную мембрану. Анализ траекторий молекулярно-динамических симуляций показывает, что оба лиганда прочно удерживаются в сайте связывания и не диффундируют в растворитель. Между тем, характер межмолекулярных взаимодействий, регистрируемых в течение всего времени симуляции, различается (рисунок 26А).

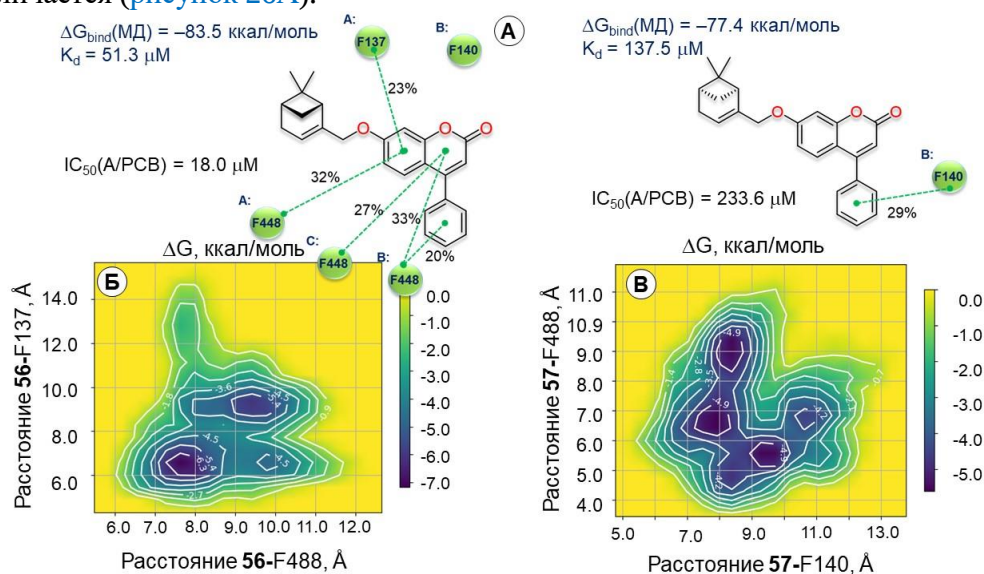


Рисунок 26. Молекулярно-динамические симуляции комплексов **56-F** и **57-F**: А – анализ траектории молекулярно-динамических симуляций; Б, В – результаты метадинамики.

Более активное соединение **56** образует ряд продолжительных (более 30% времени симуляции) π - π стекинг взаимодействий с рядом ароматических а.о. сайта связывания. Его менее активный стереоизомер **57** контактирует только с F140 одного протомера. Процедура кластеризации фреймов позволила получить геометрические параметры статистически значимых комплексов и оценить энергии связывания, а также константы диссоциации комплексов **56-F** и **57-F** (рисунок 26А). Соединение **56** образует более прочный комплекс с белком, в отличие от его стереоизомера **57**. Последние фреймы молекулярно-динамических симуляций были использованы для процедур метадинамики в течение 50 нс. В качестве коллективных переменных были заданы расстояния от центра масс лигандов до а.о., с которыми соединения **56** и **57**

образуют продолжительные по времени межмолекулярные взаимодействия: в случае комплекса **56-F** выбрали расстояние от молекулы **56** до F137 протомера А и до F488 протомера В, а в случае комплекса **57-F** – расстояния от соединения **57** до F488 протомера А и до F140 протомера В (рисунок 26Б, В). В результате расчета были получены срезы поверхности свободной энергии. Анализ энергетических бассейнов позволяет отметить, что минимальные расстояния между соединением **56** и заданными а.о. соответствуют минимуму энергии. Для системы **57-F** минимальные расстояния между атомами лиганда и а.о. не соответствуют минимуму энергии. Различная противовирусная активность стереоизомеров **56** и **57** может зависеть от расположения лигандов в сайте связывания. Результаты молекулярного моделирования согласуются с результатами экспериментов.

Совокупные результаты молекулярного моделирования и биологических экспериментов позволили обнаружить ингибитор F-белка РСВ среди производных фенил-кумаринов. Расположение трех фармакофорных признаков соединения-лидера **59** (гидрофобная группы и два ароматических кольца) соответствует фармакофорным признакам сайта связывания. Энергия связывания лиганда и белка минимальная, что коррелирует со значением pIC_{50} . Соединение **59** располагается в сайте связывания с образованием ряда π - π стекинг взаимодействий с функциональными а.о. Тем не менее, анализ молекулярно-динамических симуляций показывает, что расположение лиганда в сайте достаточно свободное. Количество контактов, сохраняющихся более 50% времени симуляции только два. Можно сделать предположение о необходимости структурной модификации соединения. Как минимум введение одной группы – донора водородной связи, например, формалинового фрагмента или аминогруппы. Подобные заместители встречаются в структурах известных ингибиторов F-белка и проводят к образованию дополнительного солевого мостика между положительно-заряженными фрагментами лиганда и отрицательно заряженными аминокислотами D486 и E487.

3.2. Описание механизма противовирусной активности соединений на основе эфиров (–)-борнеола.

Как было описано ранее (в разделе 2.2.) ряд соединений на основе эфиров (–)-борнеола проявляют противовирусную активность в отношении штамма вируса гриппа A/H1N1/PR/8/34 и некоторых патогенных штаммов SARS-CoV-2 (рисунок 16). Кроме того, биологические исследования показывают, что N-содержащие эфиры (–)-борнеола (рисунок 27) проявляют активность против РСВ типа А. Индекс селективности двух соединений-лидеров **87** и **92** 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. Тогда использовали методы молекулярного моделирования для описания механизма противовирусного действия N-содержащих эфиров (–)-борнеола, для чего было необходимо подтвердить выбор биологической мишени. Deskriptорные и фармакофорные признаки соединений-лидеров **87**, **92** заметно отличаются от признаков производного фенил-кумаринов соединения-лидера **59** и соединения референса **RV521**. Рассматриваемые лиганды характеризуются меньшим размером и количеством атомов, а также отсутствием ароматических колец (рисунок 27). Соединения содержат гидрофобный норборнанный фрагмент, который ожидаемо может образовывать межмолекулярные гидрофобные контакты с гидрофобными а.о. сайта связывания. Ряд рассматриваемых структур (**116–124**) содержат ароматический фрагмент и ингибируют РСВ типа А в концентрациях, не превышающих 15 μ M. Ранее в разделе 3.1 было выдвинуто предположение, что присутствие ароматических колец в ингибиторах F-белка необходимо, для формирования π - π стекинг взаимодействий с функциональными а.о. сайта связывания. Результаты биологического эксперимента еще раз подтверждают это предположение. Однако соединения **116–124**

характеризуются высокой токсичностью и, как следствие, низкими значениями индекса селективности. К сожалению, методами молекулярного моделирования невозможно предсказать цитотоксичность соединений.

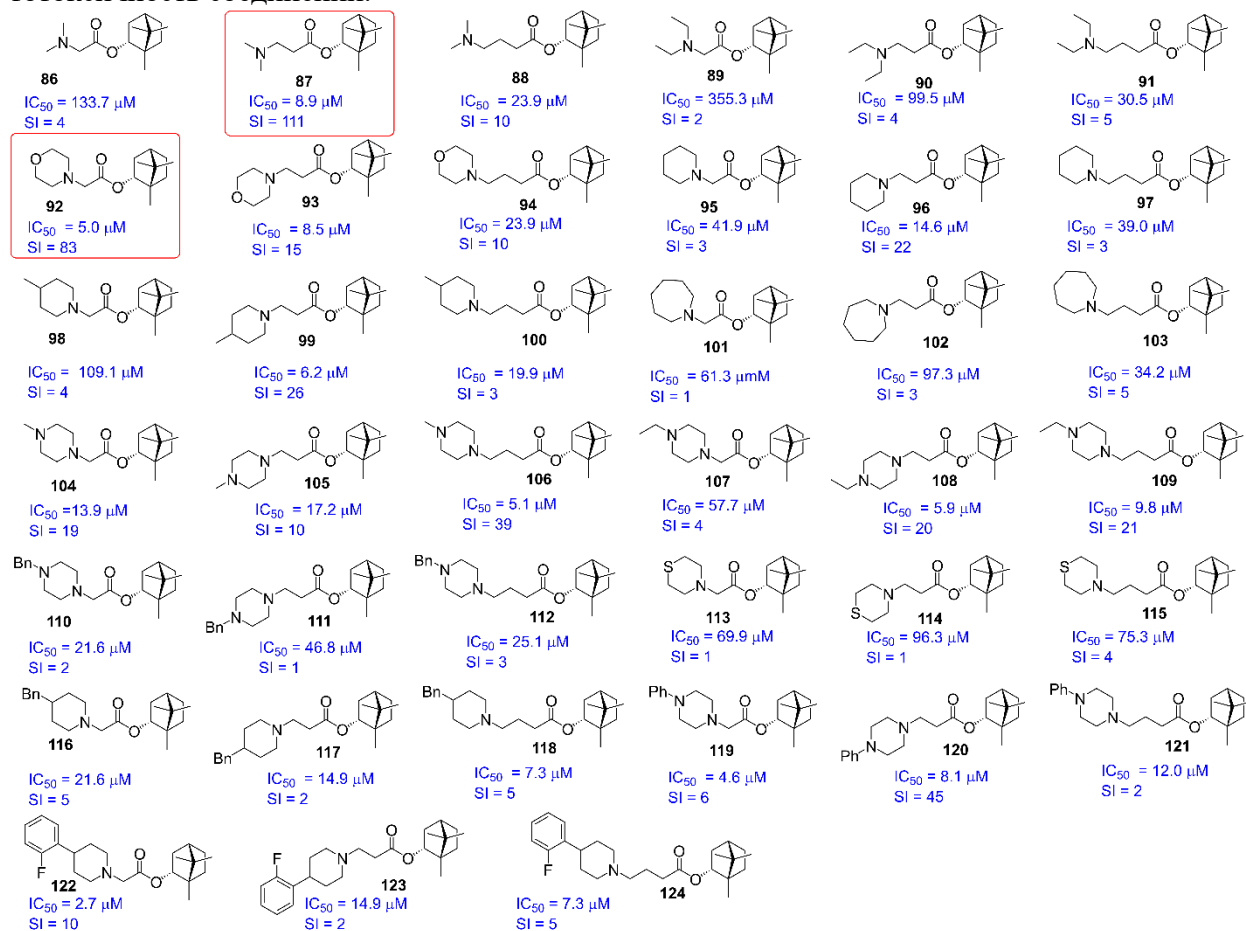


Рисунок 27. *N*-содержащие эфиры (–)-борнеола активные в отношении РСВ типа А

N-содержащие эфиры (–)-борнеола **86–124** были подвержены процедуре гибкого молекулярного докинга в полость тримера F-белка. 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 окружающими боковыми цепями а.о. Вклад протонированных и непротонированных молекул при процедуре молекулярного докинга учитывали на основании значений констант кислотности (pK_a) и уравнения Гендерсона-Хассельбаха. Например, значения pK_a для лигандов **87** и **92** составляют 8.98 и 7.05 единиц, соответственно. В отличие от НА вируса гриппа, иницирование конформационных перестроек в F-белке не зависят от pH среды. А значит соотношение $[B]:[BH^+]$ оценивается при pH равном 7.0. Тогда для соединения **87** это соотношение будет смещено в сторону протонированных (1:100) форм, а для эфира **92** будет примерно равным (~9:10). Для оценки зависимости результатов биологических экспериментов и теоретических расчетов выбирали докинг-позицию, которая соответствует энергетическому минимуму, и в которой отсутствуют стерические затруднения между атомами лиганда и атомами а.о. сайта связывания.

Соединение-лидер **87** располагается в сайте гидрофобной частью молекулы в гидрофобной полости сайта рядом с *N*-концом F₁-субъединицы (рисунок 28А). Положительно заряженный заместитель находится в донорно-акцепторной области сайта, рядом с отрицательно заряженными а.о. E487 и D486. Гидрофобный камфорный фрагмент **87** окружен фенилаланинами. Молекула **87** меньше по размеру референса **RV521**, по этой причине занимает не все пространство сайта связывания (рисунок 28Б).

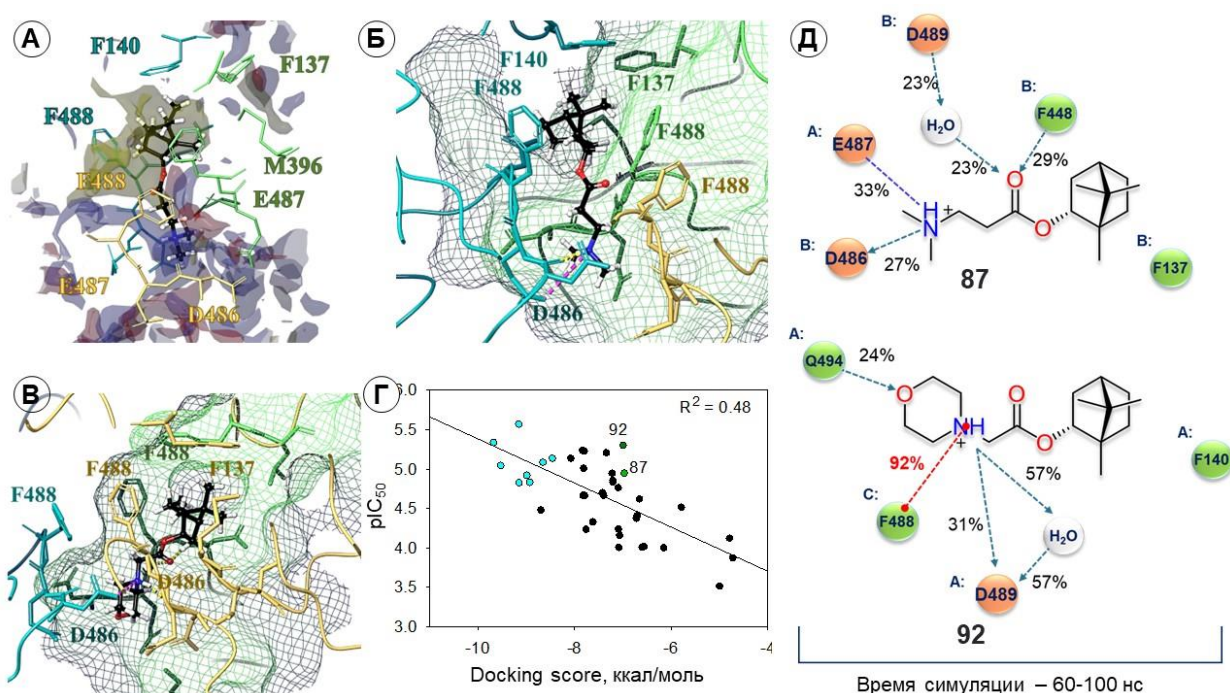


Рисунок 28. Результаты молекулярного моделирования: А – картирование сайта связывания **89** в лиганд-белковом комплексе (гидрофобные полости показаны желтым цветом, донорно-акцепторные голубым и красным соответственно); Б, В – расположение соединений **87** и **92** в сайте связывания F-белка (водородные связи показаны желтыми прерывистыми линиями, солевые мостики – фиолетовыми); Г – корреляция экспериментальных и расчетных данных (точки, соответствующие соединениям с ароматическими группами, окрашены в голубой цвет); Д – продолжительность межмолекулярных контактов между атомами лигандов и боковыми цепями а.о. сайта связывания в течение последних 40 нс симуляции.

Протонированная $-\text{NH}_3^+$ группа располагается в донорно-акцепторной области сайта и образует солевой мостик с D486. Ключевыми взаимодействиями агента **87** является водородная связь с D486 и солевой мостик с E487. Расположение в сайте связывания эфира **92** характеризуется, прежде всего, образованием гидрофобных взаимодействий: норборнанный фрагмент окружен фенилаланинами F488 каждого протомера, протонированный атом азота морфолинового фрагмента образует солевые мостики с двумя D486 соседних протомеров (рисунки 28В). Карбонильный кислород лиганда формирует водородные связи с F488, D486. Большинство исследуемых соединений **86–124** имеют тенденцию к образованию либо водородных связей, либо солевых мостиков с атомами боковых цепей а.о. гептадного повтора, ввиду наличия карбонильного кислорода и/или протонированного азота. Солевые мостики образуются с отрицательно заряженными а.о., чаще всего с аспарагиновой и/или глутаминовой. Аффинность соединений, содержащих ароматический фрагмент (**116–124**), к сайту связывания ингибиторов F-белка более выражена, по сравнению с соединениями-лидерами **87** и **92** (рисунки 28Г). Энергетические характеристики расположения эфиров **116–124** располагаются в интервале от -9.7 до -8.4 ккал/моль, в то время как значения стыковки (docking score) для соединений **87** и **92** составляют -6.5 и -7.0 ккал/моль, соответственно. Эти наблюдения находятся в согласии с результатами биологического эксперимента: противовирусные агенты **116–124** ингибируют вирус А/РСВ в концентрациях не превышающих 15 μM . Результаты расчетов коррелируют с экспериментальными данными: соединения, ингибирующие вирусную инфекцию в минимальных концентрациях характеризуются повышенной аффинностью к сайту связывания. И наоборот: неактивные соединения хуже связываются в полости тримера.

Геометрические параметры оптимальных докинг позиций лигандов **87** и **92** были использованы для молекулярно-динамических симуляций. Трансmemбранный домен белка в комплексе с лигандами был погружен в вирусную мембрану. Общее время симуляции составило 100 нс. Системы уравнились к 60 нс симуляции, лиганды располагаются в полости тримера белка и не диффундируют в растворитель. На рисунке 28Д изображен статистический анализ

траектории лигандов в сайте связывания начиная с момента уравнивания атомно-молекулярных систем. В обоих случаях гидрофобная часть молекул располагается в непосредственной близости к пептиду слияния, рядом с аминокислотой F137 в случае эфира **87** и F140 в случае соединения **92**. Положительно заряженные части молекулы образуют водородные связи с отрицательно заряженными а.о. Более 10 нс (из 40 рассматриваемых нс) протонированный атом азота эфира **87** образует водородную связь с D486 и солевой мостик с E487. Карбонильный кислород формирует водородные связи с D489 и F488, в первом случае опосредованный водой. Подобные контакты образуют известные ингибиторы F-белка, среди которых сисунатовир (**RV521**).

На основании совокупных данных результатов биологических экспериментов и теоретических расчетов, можно предположить, что противовирусная активность *N*-содержащих эфиров (–)-борнеола в отношении РСВ связана с их влиянием на фузогенную активность поверхностного F-белка.

Глава 4. Ингибирующая активность малых молекул в отношении вируса Эбола

Гликопротеин (GP) вируса Эбола (EBOV GP) представляет собой тример, состоящий из двух основных субъединиц GP₁ и GP₂, связанных между собой дисульфидным мостиком между C₁₅₃ и C₂₆₀₉. 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). Часть GP₁, ближе N-концу, образует «зажим», который стабилизирует метастабильную конформацию GP₂. 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, за которым следует набор гептадных повторов, трансмембранная область и цитоплазматический хвост. Внутренняя петля слияния содержит серию гидрофобных остатков L₂₅₂₉, W₂₅₃₁, L₂₅₃₂, P₂₅₃₃, Y₂₅₃₄, F₂₅₃₅ и P₂₅₃₇. Сайт связывания представляет собой гидрофобный карман, расположенный на границе раздела GP₁ и GP₂ и содержит а.о. пептида слияния и GP₁. Анализ сайта показывает, что а.о. N₂₆₉, L₂₇₀, L₂₁₈₄, L₂₁₈₅, L₂₁₈₆, K₂₁₉₀ и K₂₁₉₁ являются ключевыми при связывании ингибиторов GP-белка.

Производные камфена (**125–138**) проявляют активность против вируса гриппа штамма A/H1N1 (рисунок 29).

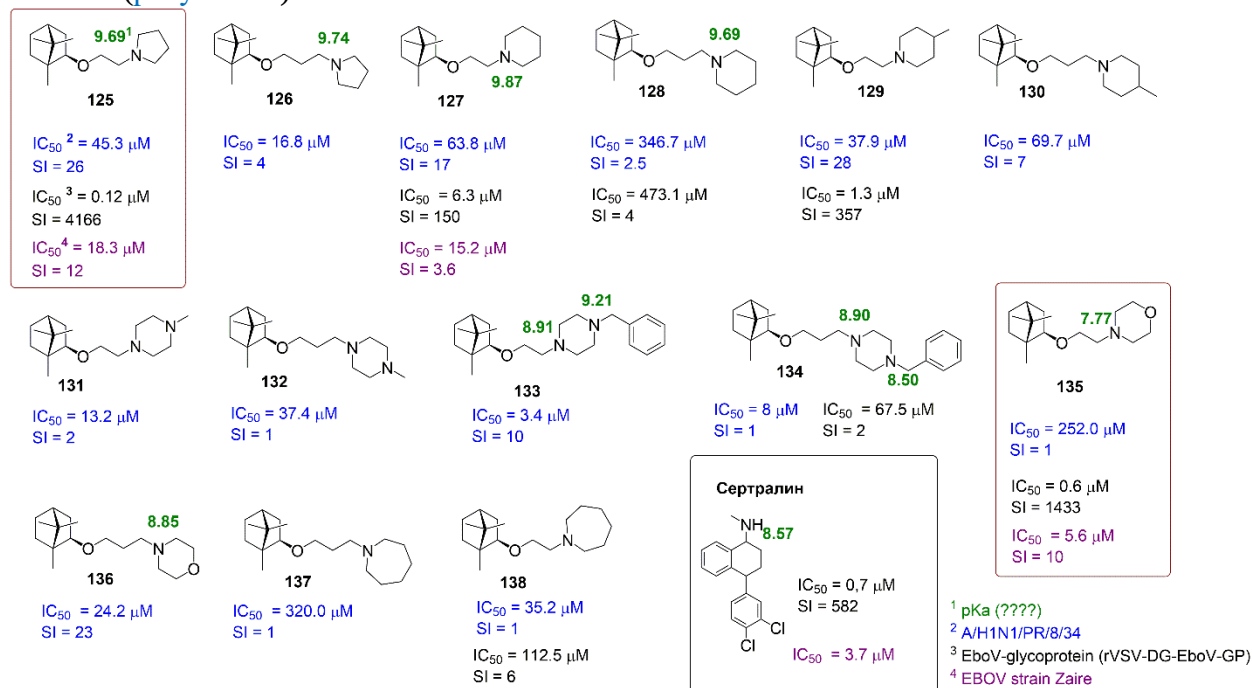


Рисунок 29. Соединения, проявляющие активность в отношении вируса Эбола и вируса гриппа.

Ряд соединений, а именно, **125**, **127–129**, **134**, **135**, **138** ингибируют псевдовирс с гликопротеином (GP) вируса Эбола. Значения IC₅₀ (EboV-GP) для агентов **125** и **135** соизмеримы со значением IC₅₀ (EboV-GP) характерным для известного ингибитора гликопротеина вируса

Эбола сертралина. Индекс селективности производных камфена выше в 7 раз для соединения **125** и в 2.5 раза для агента **135**, чем значение SI соответствующее сертралину. Соединения **125**, **127** и **135** ингибируют инфекционный вирус Эбола штамма Zaire (рисунок 29) в микромолярных концентрациях. Рассматриваемые молекулы имеют общий с камфецином жесткий гидрофобный скаффолд, что позволяет предположить, что противовирусная активность агентов **125–138** в отношении вируса гриппа может быть связана с ингибированием гемагглютинаина. Анализ результатов биологических экспериментов свидетельствует от том, что исследуемые соединения ингибируют гликопротеин вируса Эбола. Оба вирусных белка (НА и GP) относятся к поверхностным вирусным белкам I типа, конформационные перестройки которых начинаются при пониженной pH среды. Тогда был проведен молекулярный докинг соединений **125–138** в сайты связывания НА вируса гриппа и GP вируса Эбола. Была учтена возможность протонирования соединений по атому азота. На лиганды были наложены позиционные ограничения относительно положения референсных соединений (ТБГХ, камфецина и сертралина). Для оптимальных докинг-позиций была оценена энергия связывания (ΔG_{bind}) и были построены корреляционные зависимости (рисунок 30А, Б). Согласно анализу результатов молекулярного моделирования, аффинность производных камфена к ТБГХ-сайту связывания выше, чем к К-сайту. Об этом свидетельствуют значения индексов корреляции (рисунок 30А).

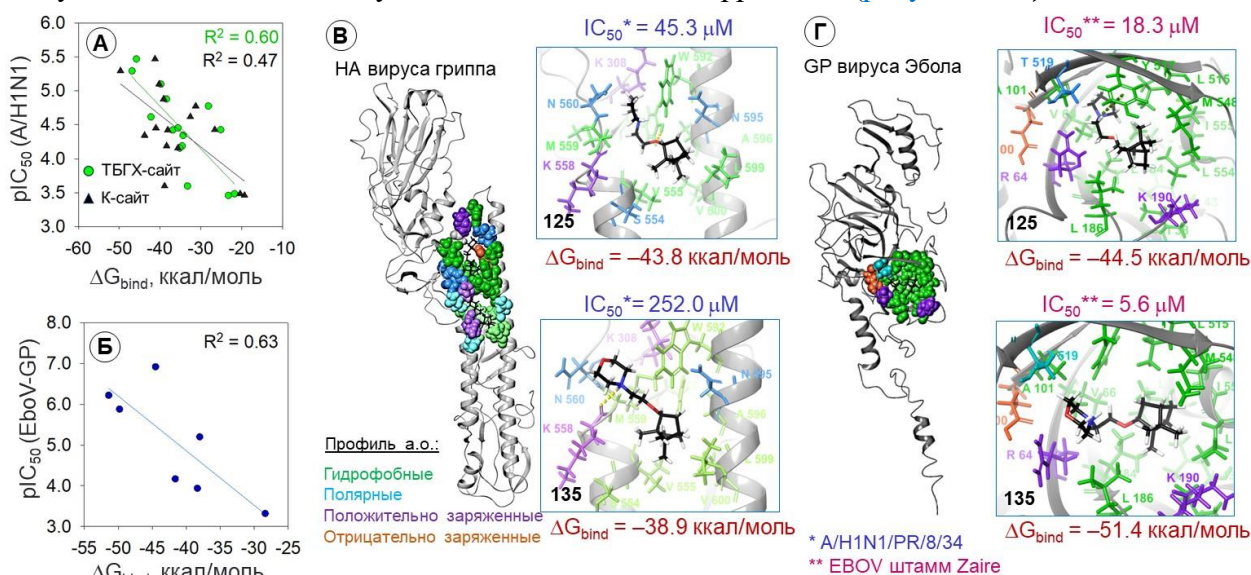


Рисунок 30. Результаты молекулярного моделирования: А, Б – взаимосвязь между значениями pIC_{50} и ΔG_{bind} молекулярного докинга в ТБГХ- и К-сайты НА и в сайт связывания ингибиторов GP; В, Г – расположение соединений-лидеров в сайтах связывания НА вируса гриппа (ТБГХ-сайт) и GP вируса Эбола (гидрофобный туннель), соответственно.

Результаты оценки энергии связывания агентов **125**, **127–129**, **134** и **138** находятся в согласии со значениями IC_{50} , характеризующих их активность в отношении псевдовиральной системы EboV-GP (рисунок 30Б). Связывание агентов **125–138** в ТБГХ-сайте сопровождается преимущественно гидрофобными взаимодействиями. Располагаясь в месте пептида слияния, агент **125** формирует водородную связь с Y₂₅₉₄, а соединение **135** – с K₂₅₅₈ (рисунок 30В). Расположение лигандов **125–138** в сайте связывания GP вируса Эбола также сопровождается гидрофобными взаимодействиями. Протонированные атомы азота могут образовывать водородные связи и солевые мостики с окружающими а.о. Активные производные камфена (**125** и **135**) связываются в гидрофобном кармане белка таким образом, что жесткий гидрофобный фрагмент взаимодействует с набором гидрофобных а.о. GP₁ (V₁₆₆, L₁₆₈, A₁₀₁, L₁₈₄, L₁₈₆) и GP₂ (L₂₅₁₅, M₂₅₄₈, L₂₅₅₈). Вероятно также образование π-катион стекинг взаимодействий между протонированным атомом азота и ароматическим кольцом Y₂₅₁₇.

Анализ результатов расчетов в совокупности с экспериментальными данными позволяет предположить, что связывание лигандов в сайтах связывания НА вируса гриппа и GP ви-

руса Эбола приводит к стабилизации префузионной конформации белков, препятствуя тем самым слиянию вирусных и клеточных мембран. Бициклический каркас производных камфена обеспечивает эффективное связывание в гидрофобных полостях описанных сайтов. Активация НА и GP происходит при пониженных значениях pH среды. Протонирование соединений по атому азота приводит к образованию дополнительного реакционного центра в молекуле, обеспечивающего образование электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными а.о. или ароматическими кольцами тирозина, который присутствует в обоих сайтах. Дальнейший поиск новых аналогов может привести к открытию нового ингибитора, нацеленного на стадию слияния мембран и обладающего широким спектром противовирусной активности.

Глава 5. Фармакофорный профиль ингибиторов поверхностных вирусных белков I типа

Совокупный анализ биологических экспериментов и результатов молекулярного моделирования позволил среди большого количества исследуемых соединений (**1–138**) – 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 31](#)).

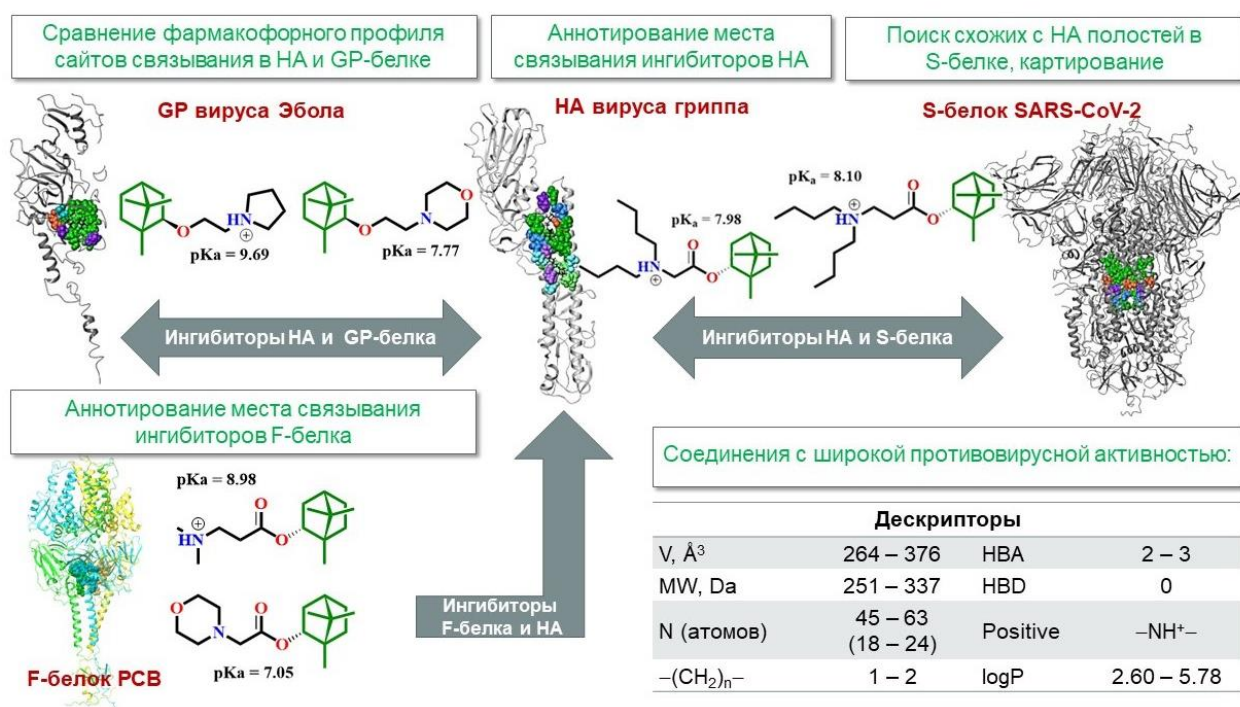


Рисунок 31. Поиск соединения, обладающего активностью против ряда вирусов.

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 [рисунке 31](#) 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 присутствует 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 аромати-

ческие 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 (1–44) встречаются соединения с ароматической группой, значение IC₅₀ которых соизмеримо с таковым для камфецина (например, агенты 30 и 34). Однако значение SI у них заметно ниже. Схожая ситуация наблюдается для *N*-производных эфиров (–)-борнеолов – ингибиторов F-белка РСВ (85–124): значения IC₅₀, соответствующие соединениям с ароматическими фрагментами (110–124), 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 (45, 46) и GP-белка вируса Эбола (125–138) соединения, содержащие ароматические группы, не встречаются. Тем не менее среди известных ингибиторов всех четырех поверхностных белков присутствуют ароматические фрагменты: 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.

Глава 6. Ингибирующая активность малых молекул против ортопоксвирусов

Высококонсервативный белок периферической мембраны р37 принимает участие в образовании оболочки внутриклеточного зрелого ортопоксвируса. Полипептид состоит из 372 а.о., массой 41.8 кДа, экспрессируется на поздних стадиях инфекции и направлен на вирусные мембраны, происходящие из аппарата Гольджи. Два остатка цистеина в положениях 185 и 186 погружены в мембрану, что является ключевым моментом для правильного внутриклеточного нацеливания и функционирования белка. Последовательность р37 содержит фрагмент мотива N_xK_{xxxx}D (Н – гистидин, К – лизин, D – аспарагиновая кислота, x – любая аминокислота), характерный для фосфолипаз и состоящий из аспарагина (N) вместо гистидина (H), лизина и аспарагиновой кислоты. Белок проявляет фосфолипазную активность. Мутагенез цистеиновых остатков и/или аминокислот в мотиве N_xK_{xxxx}D изменяет внутриклеточное распределение белка и ингибирует процесс образования оболочки внутриклеточного зрелого вируса.

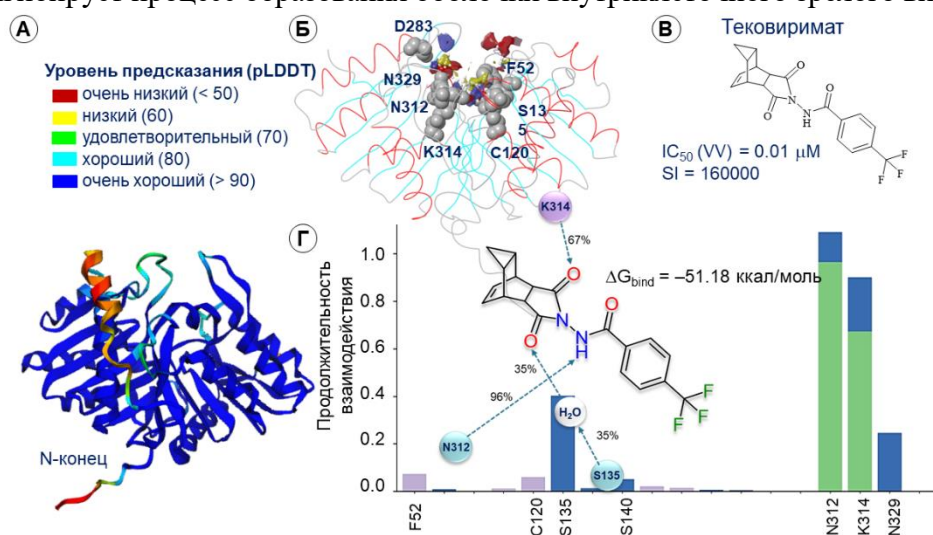


Рисунок 32. Молекулярное моделирование мембранного белка р37: А – результат предсказания третичной структуры р37; Б – аннотирование сайта связывания ингибиторов р37; В – структура тековиримата – ингибитора р37; Г – результат молекулярно-динамических симуляций лиганд-белкового комплекса тековиримат-р37 в течение 150 нс симуляции. VV – *vaccinia virus*.

Третичная структура белка р37 была предсказана с использованием платформы Colab Google. В качестве первичной оценки адекватности полученной модели белка был оценен тест разности локальных расстояний (pLDDT). Доверительная вероятность для большинства элементов вторичной структуры белка превышает 90% (рисунок 32А). Геометрические параметры

белка были минимизированы методами молекулярной динамики в течение 100 нс. Сайт связывания представляет собой небольшую полость, содержащую аминокислоты F52, S135, C120, N329, включая а.о. фрагмента фосфолипидного домена N312 и K314 (рисунки 32А, 32Б). Полость благоприятна для связывания небольших молекул, содержащих гидрофобные и донорно-акцепторные группы, таких как тековиримат. В настоящее время тековиримат (рисунки 32А, 32Б) одним из наиболее эффективных препаратов против ряда ортопоксвирусов, подавляющий репликацию вируса с индексом селективности более 160 000. Согласно анализу научной литературы и результатов молекулярно-динамических симуляций, проведенных в рамках данной работы, предполагается, что тековиримат связывается в описанном сайте связывания с образованием ряда продолжительных межмолекулярных взаимодействий с а.о. фосфолипидного домена N312 и K314 (рисунки 32Г, 32Д).

6.1. Описание механизма противовирусной активности производных (+)-камфоры и (-)-фенхона

Ряд производных (+)-камфоры и (-)-фенхона проявляют противовирусную активность в отношении вируса осповакцины (VV) и коровьей оспы (CPXV)⁹ (рисунки 33, 34).

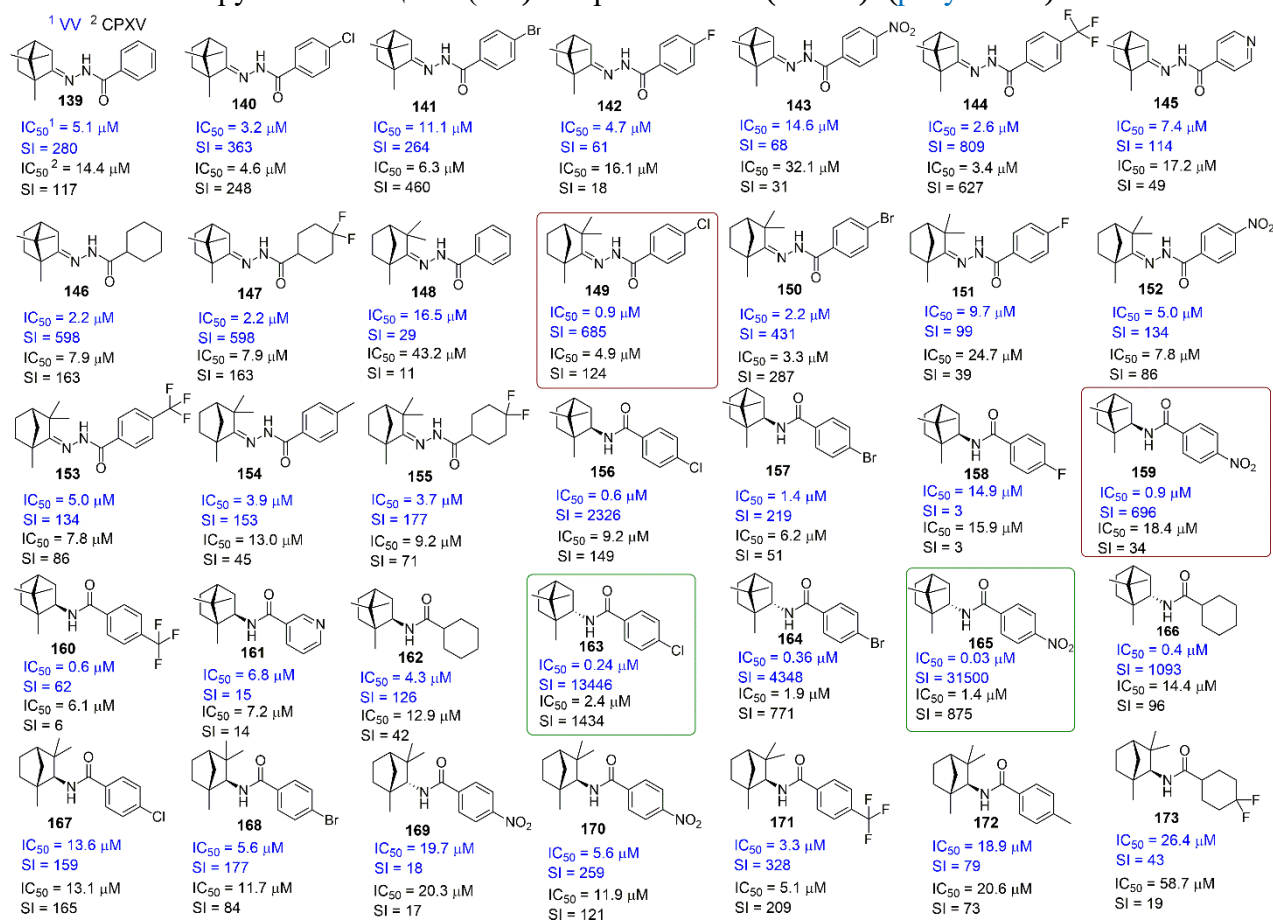


Рисунок 33. Соединения активные в отношении ортопоксвирусов.

Малые молекулы содержат схожий с тековириматом набор фармакофорных признаков и последовательность их расположения: жесткий гидрофобный каркас (-)-фенхона или (+)-камфоры, донорно-акцепторную область и ароматическое кольцо. Согласно данным эксперимента по времени добавления, наиболее выраженную активность против вируса соединения 149 и 159 проявляют на последних стадиях жизненного цикла. Все вышесказанное, позволяет рассматривать р37 в качестве потенциальной биологической мишени.

⁹ Оценка противовирусной активности соединений в отношении ортопоксвирусов проводилась в ФБУН ГНЦ «Вектор» в группе зав. отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций д.б.н. Л. Н. Шишкиной

Процедура гибкого молекулярного докинга соединений **139–173** была проведена в сайт связывания тековиримата. На лиганды было наложено позиционные ограничения относительно положения соединения-референса (тековиримата). Оптимальные докинг-позиции были выбраны на основании визуального фильтрации: совокупность минимальных значений энергетических параметров связывания, отсутствия стерического затруднения при расположении лигандов, а также наличия межмолекулярных взаимодействий между атомами лигандов и а.о. S135, N312 и K314. Для отобранных докинг-решений были рассчитаны энергии связывания лиганда и белка (ΔG_{bind}) для определения взаимосвязи со значениями pIC_{50} , характеризующими противовирусную активность соединений в отношении ортопоксвирусов. Коэффициенты линейной регрессии между парами данных $\text{pIC}_{50} (\text{VV}) - \Delta G_{\text{bind}}$ и $\text{pIC}_{50} (\text{CPXV}) - \Delta G_{\text{bind}}$ составляют 0.69 (рисунок 34А) и 0.46 (рисунок 34Б), соответственно. Геометрические позиции лиганд-белковых комплексов **149-p37** и **159-p37** были использованы для построения стартовых моделей молекулярно-динамических симуляций. Анализ поведения агента **149** в комплексе с белком p37 показывает образование продолжительных по времени водородных связей между карбонильным кислородом и S135, S140 и N312. Соединение **159** контактирует с большим количеством аминокислотных остатков, что может свидетельствовать о более свободном расположении лиганда в сайте связывания (рисунок 34В). Самый продолжительный контакт (около 80% всего времени симуляции) регистрируется между карбонильным кислородом лиганда и F52 (опосредованная водой водородная связь). Более 50% времени расчета сохраняется межмолекулярный контакт с C53, около 30% времени с S135 и с K314 (рисунок 34Г). Кроме того, расположение лиганда **159** в сайте связывания характеризуется образованием межмолекулярных взаимодействий ионной природы между атомами нитрогруппы лиганда и R89, K281.

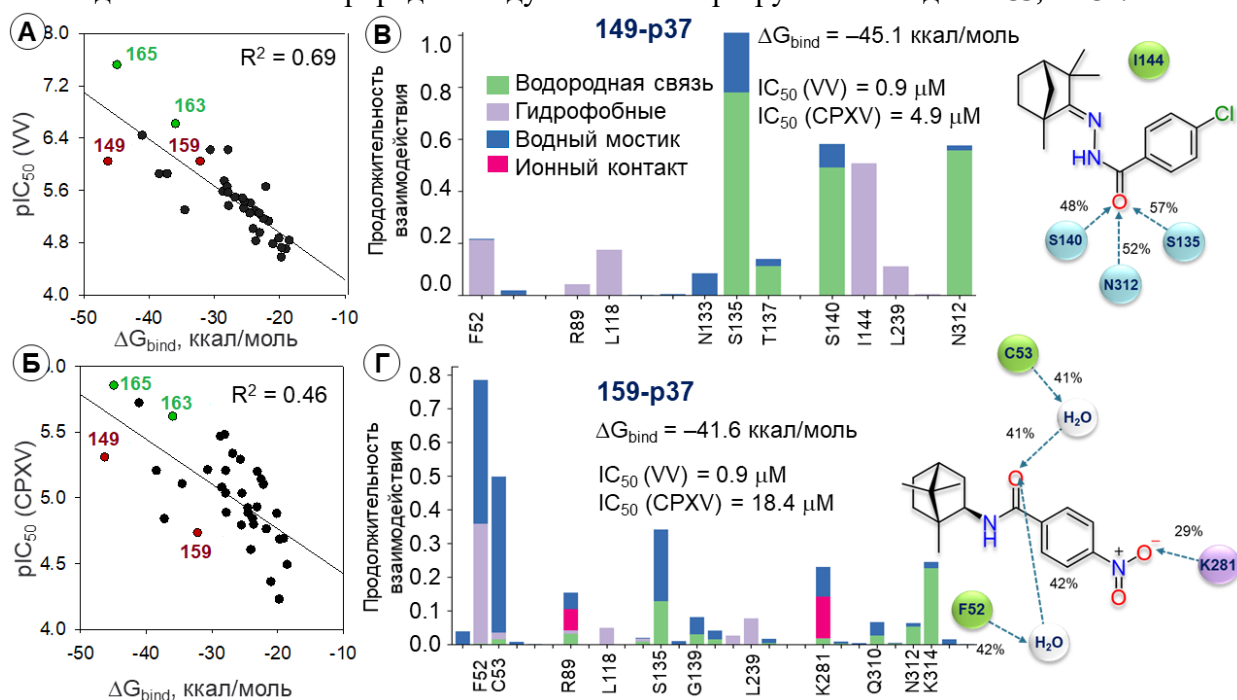


Рисунок 34 Результаты молекулярного моделирования: А, Б – зависимость значений pIC_{50} , полученных в тестах *in vitro* и значений ΔG_{bind} , оцененных на основании результатов молекулярного докинга, В, Г – анализ траекторий молекулярно-динамических симуляций комплексов **149-p37** и **159-p37**, соответственно.

Процедура кластеризации фреймов молекулярно-динамических симуляций позволила определить статистически значимые комплексы, для которых были оценены энергии связывания лиганда и белка. Согласно значениям ΔG_{bind} (рисунок 34В, Г), комплекс **149-p37** незначительно стабильнее комплекса **159-p37**. Этот результат согласуется с экспериментальными данными. Таким образом, производные (+)-камфоры и (–)-фенхона проявляют противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов за счет вероятного ингибирования мембранного вирусного белка p37.

6.2. Описание противовирусной активности производных адамантана

Согласно анализу, литературных данных, соединения, содержащие адамантановый фрагмент и фармакофорный профиль, соответствующий профилю тековиримата (гидрофобная «клетка», донорно-акцепторный фрагмент, ароматическое кольцо и заместитель), могут быть активны в отношении ортопоксвирусов. Соединения **174–187** (рисунок 35) и иммунотропный препарат – бромантан (**188**) были подвержены процедуре молекулярного докинга в сайт связывания ингибиторов р37 с последующей оценкой энергии связывания лиганда и белка. Оптимальная докинг-позиция была выбрана на основании анализа значений энергетических параметров, расположения лигандов в сайте связывания с учетом межмолекулярных взаимодействий с ключевыми а.о. и отсутствием стерических затруднений. Все лиганды, кроме **182**, связываются в сайте связывания. Активные производные адамантана **186** и **187** характеризуются низкими энергетическими параметрами аффинности, в то время как неактивные – высокими. Большинство лигандов образуют водородную связь с а.о. фосфолипазного домена, и гидрофобные взаимодействия с гидрофобными а.о. F52, C120, L118, A134 со стороны углеводородной «клетки».

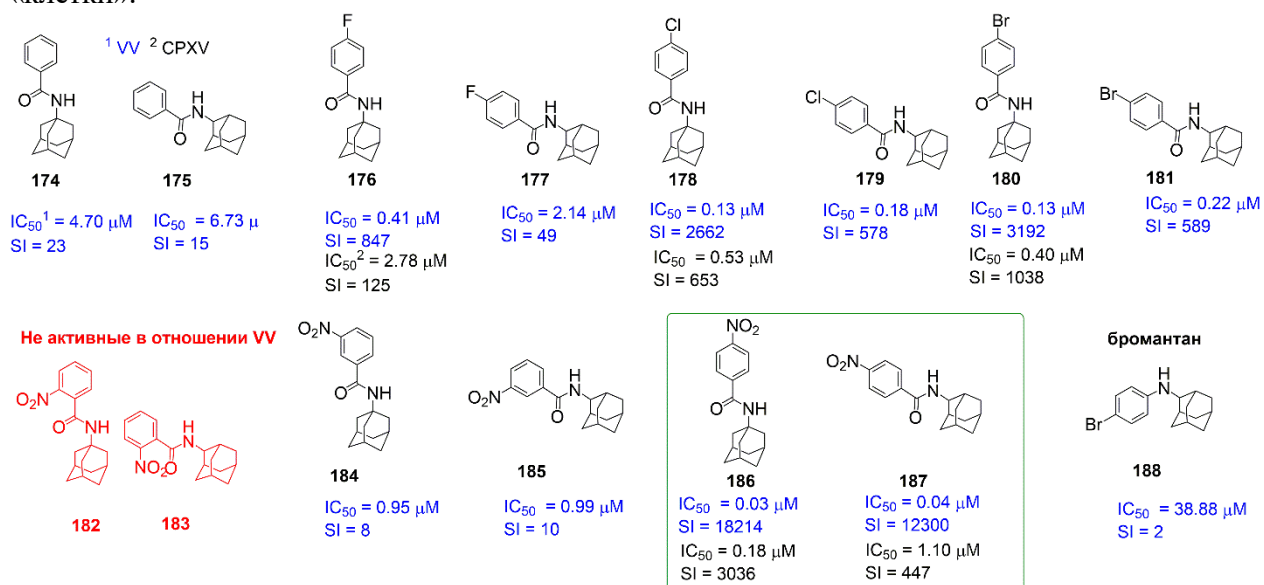


Рисунок 35. Производные адамантана, проявляющие активность в отношении ортопоксвирусов.

Расположение молекул соответствует положению тековиримата в полости связывания белка р37. На примере агента **186** (соединения-лидера с индексом селективности более 18000) жесткий адамантановый каркас молекулы расположен в полости сайта, содержащей гидрофобные а.о., такие как A134, F52, L118 (рисунок 36А).

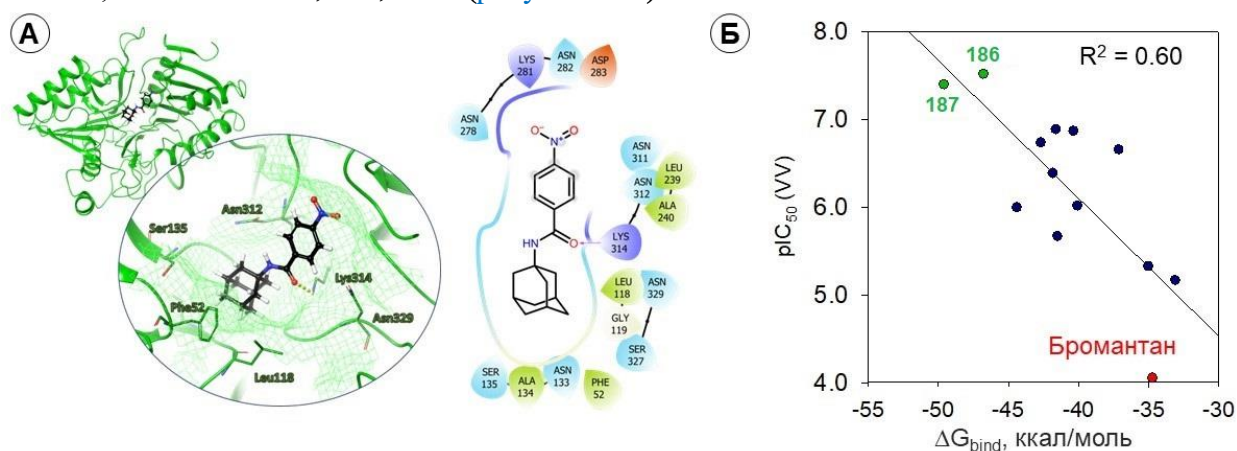


Рисунок 36. Результаты молекулярного моделирования: А – расположение в сайте связывания соединения-лидера **186**; Б – взаимосвязь значений pIC_{50} , полученных в тестах *in vitro* и значений ΔG_{bind} , оцененных на основании результатов молекулярного докинга.

Донорно-акцепторный фрагмент --NH--C(O)-- расположен в непосредственной близости к аминокислотам фосфолипазного домена. Между карбонильным атомом кислорода и K314 наблюдается образование водородной связи. Нитрогруппа погружена в сайт связывания и расположена рядом с заряженным а.о. K281 и D283, с которыми лиганд может образовать солевые мостики и/или водородные связи. Результаты теоретического расчета находятся в согласии с экспериментальными данными (рисунок 36Б). Совокупный анализ результатов биологических экспериментов и теоретических расчетов позволяет рассматривать в качестве потенциальной биологической мишени, объясняющей противовирусную активность производных адамантана в отношении ортопоксвирусов, мембранный высококонсервативный вирусный белок р37.

6.3. 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 адамантана¹⁰. Для тщательно отобранных оптимальных докинг-позиций была оценена энергия связывания лиганда и белка. Полученные данные объединили с результатами молекулярного моделирования соединений **174–187** и бромантана. Была построена зависимость значений ΔG_{bind} от pIC_{50} , полученных в тестах *in vitro* (рисунок 37А). Индекс корреляции составляет более 70%. Полученная прогностическая модель была использована для предсказания значений IC_{50} четырех известных производных адамантана. Для соединений (рисунок 37Б) была проведена процедура гибкого молекулярного докинга, были отобраны 2–4 позиции, для которых была рассчитана энергия связывания. Используя коэффициенты, полученные в математической модели (рисунок 37А), был оценен доверительный интервал значений IC_{50} .

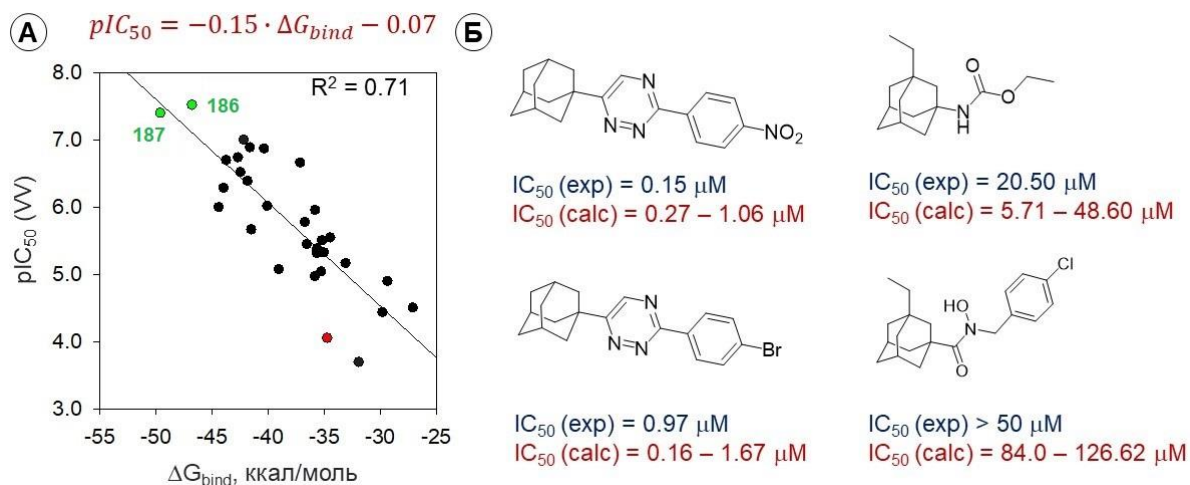


Рисунок 37. Построение прогностической модели: А – взаимосвязь данных *in vitro* тестов с результатами теоретического расчета; Б – проверка адекватности математической модели.

Анализ результатов, представленных на рисунке 37, позволяют предположить, что модель удовлетворительна. Во всех случаях экспериментальное значение IC_{50} попадает в доверительный интервал. При этом необходимо отметить, что как правило, экспериментальные значения ингибирующей активности также представляют собой некоторый доверительный интервал. Представленный подход оценки IC_{50} имеет ряд ограничений. Во-первых, для создания адекватной математической модели требуется максимально большое количество соединений со схожим фармакофорным профилем и достоверными значениями ингибирующей активности, определенными *in vitro*. В идеальном варианте это значение должно соответствовать ингибированию конкретной биологической мишени, что в рамках противовирусных задач редко

¹⁰ Eur. J. Med. Chem. 2021. 221, 113485.

реализуемо. Во-вторых, требуется четкое обоснование выбора биологической мишени. В-третьих, крайне важно подобрать корректный протокол молекулярного докинга. Референсная позиция должна быть минимизирована методами молекулярной динамики. Наконец выбор оптимальной позиции должен быть основан на положении лиганда в сайте связывания, характере взаимодействий с ключевыми аминокислотами в совокупности с минимальными значениями энергетических параметров. Строить модель зависимости pIC_{50} от значения балла стыковки можно, но использование ее в предсказательных целях сомнительно. Необходимы дополнительные расчеты энергии связывания при определенных настройках алгоритма расчета. Результатом предсказания является доверительный интервал значений противовирусной (или другой) активности.

ВЫВОДЫ

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 Å³ 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 гемагглютанина вируса гриппа, S-белка SARS-CoV-2, F-белка респираторно-синцитиального вируса и гликопротеина GP 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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **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**. – Т. 65, No 4. – С. 120491.
2. **Борисевич С. С.**, Горохов Я. В., Архипов С. Г. Место связывания тековиримата – ингибитора мембранного белка p37 ортопоксвирусов // Журнал структурной химии – **2024**. – Т. 65, No 1. – С. 125428.
3. Shtro A. A., Klabukov A. M., Garshina A. V., Galochkina A. V., Nikolaeva Yu. V., Khomenko T. M., Bobkov D. E., Lozhkov A. A., Sivak K. V., Yakovlev K. S., Komissarov A. B., **Borisevich S. S.**, Volcho K. P., Salakhutdinov N. F. Identification and Study of the Action Mechanism of Small Compound That Inhibits Replication of Respiratory Syncytial Virus // Int. J. Mol. Sci. – **2023**. – Vol.24. – P. 12933 (Q1).
4. 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 (Q2).
5. Khomenko T. M., Shtro A. A., Galochkina A. V., Nikolaeva Yu. V., Garshina 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 (Q2).
6. **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 (Q1).
7. **Борисевич С. С.**, Гуреев М. А. Камфецин и гинсамид: динамика потенциальных взаимодействий с каналом M2 вируса гриппа // Известия АН. Серия химическая – **2023**. – Т. 72, No 10. – С. 2548–2558.

8. 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 (**Q1**).
9. 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 (**Q1**).
10. 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 (**Q1**).
11. Yarovaya O. I., Shcherbakov D. N., **Borisevich S. S.**, Sokolova A. S., Gureev M. A., Khamitov E. M., Rudometova N. B., Zybina 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 (**Q1**).
12. **Borisevich S. S.**, Khamitov E. M., Gureev M. A., Yarovaya O. I., Rudometova N. B., Zybina 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 (**Q1**).
13. **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 (**Q1**).
14. 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 (**Q2**).
15. 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.
16. 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., Maksyutov 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 (**Q2**).
17. 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 (**Q2**).
18. 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 (**Q2**).
19. 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**).

20. Sokolova A. S., Putilova V. P., Yarovaya O. I., Zybina 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 (**Q2**).
21. 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 (**Q2**).
22. 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.
23. 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. Newtype of anti-influenza agents based on benzo[d][1,3]dithiol core // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – **2020**. – Vol. 30, No. 24. – P. 127653. (**Q2**)
24. 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.
25. 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. (**Q2**)
26. 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 camphene results in loss of pathogenicity // *Virology* – **2018**. – Vol. 524. – P. 69-77. (**Q2**)