

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 51-76:577.322:539.19
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-5-000-000>

Поступило в редакцию 14.08.2019
Received 14.08.2019

**А. М. Андрианов¹, Г. И. Николаев², Ю. В. Корноушенко¹, А. Д. Карпенко²,
Дж. Хуанг³, Ш. Дзян³, член-корреспондент А. В. Тузиков²**

¹*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

²*Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

³*Key Laboratory of Medical Molecular Virology (MOE/NHC/CAMS), School of Basic Medical Sciences,
Fudan University, Shanghai, China*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МИМЕТИКОВ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИ-ВИЧ АНТИТЕЛА N6 МЕТОДАМИ ВИРТУАЛЬНОГО СКРИНИНГА И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Аннотация. С помощью комплексного подхода, включающего методы виртуального скрининга, высокопроизводительного докинга и молекулярной динамики, обнаружены три химических соединения – функциональных миметика нейтрализующего анти-ВИЧ антитела N6. Методами молекулярного докинга предсказано, что идентифицированные соединения способны блокировать три ключевых области белка gp120 ВИЧ-1 путем образования широкой сети межмолекулярных контактов с остатками гликопротеина, критическими для связывания вируса с первичным рецептором CD4. Показано, что комплексы этих соединений с белком gp120 характеризуются низкими значениями констант диссоциации и свободной энергии Гиббса, что подтверждает высокую эффективность межмолекулярных взаимодействий, стабилизирующих эти надмолекулярные структуры. На основании полученных результатов сделан вывод о том, что идентифицированные соединения формируют перспективные базовые структуры для разработки новых эффективных лекарственных препаратов против ВИЧ-1 широкого спектра действия, имитирующих структурно-функциональные свойства кросс-реактивного нейтрализующего антитела N6.

Ключевые слова: ВИЧ-1, белок gp120, нейтрализующее антитело N6, ингибиторы проникновения ВИЧ-1, виртуальный скрининг, молекулярный докинг, молекулярная динамика, лекарственные препараты против ВИЧ

Для цитирования: Идентификация функциональных миметиков нейтрализующего анти-ВИЧ антитела N6 методами виртуального скрининга и молекулярного моделирования / А. М. Андрианов [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 5. – С. 561–571. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-5-561-571>

**Alexander M. Andrianov¹, Grigory I. Nikolaev², Yuri V. Kornoushenko¹, Anna D. Karpenko², Jinghe Huang³,
Shibo Jiang³, Corresponding Member Alexander V. Tuzikov²**

¹*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

³*Key Laboratory of Medical Molecular Virology (MOE/NHC/CAMS), School of Basic Medical Sciences, Fudan University,
Shanghai, China*

IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL MIMETICS OF ANTI-HIV ANTIBODY N6 BY METHODS OF VIRTUAL SCREENING AND MOLECULAR MODELING

Abstract. Three chemical compounds presenting functional mimetics of neutralizing anti-HIV-1 antibody N6 were identified by an integrated approach including virtual screening, high-throughput docking and molecular dynamics. Using molecular docking, the identified compounds are predicted to be able to block three key regions of the HIV-1 gp120 protein by formation of a wide network of intermolecular contacts with the glycoprotein residues critical for the virus binding to primary receptor CD4. It is shown that the complexes of these compounds with gp120 exhibit low values of dissociation constant and Gibbs free energy, which validates a high efficacy of intermolecular interactions stabilizing these supramolecular structures. Based on the data obtained, the identified compounds are assumed to form promising basic structures for the development of novel, potent and broad anti-HIV-1 drugs mimicking structural and functional properties of the cross-reactive neutralizing antibody N6.

Keywords: HIV-1, gp120 protein, neutralizing antibody N6, HIV-1 entry inhibitors, virtual screening, molecular docking, molecular dynamics, anti-HIV drugs

For citation: Andrianov A. M., Nikolaev G. I., Kornoushenko Yu. V., Karpenko A. D., Huang J., Jiang S., Tuzikov A. V. Identification of functional mimetics of anti-HIV antibody N6 by methods of virtual screening and molecular modeling. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 5, pp. 561–571 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-5-561-571>

Введение. Инфекционные заболевания, такие как синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), туберкулез, малярия и забытые тропические болезни, являются бедствием для миллионов людей в Юго-Восточной Азии, где проживает четверть населения мира [1]. Несмотря на то что в настоящее время достигнут значительный прогресс в изучении механизма репликации ВИЧ-1, ведущей к патогенезу и передаче резистентных штаммов, эффективные противовирусные препараты или защитная вакцина до сих пор не разработаны [2; 3]. Применяемая в клинической практике с 1996 г. антиретровирусная терапия (АРТ) значительно снизила заболеваемость СПИДом и улучшила качество жизни ВИЧ-положительных пациентов [3]. Однако АРТ обладает ограниченными возможностями и не позволяет вмешиваться в латентные резервуары вируса, что создает существенные препятствия на пути решения проблемы [1–3]. ВИЧ-1 по-прежнему является одной из основных проблем здравоохранения не только в Юго-Восточной Азии, но и во всем мире. По данным Программы Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДу (<http://www.unaids.org>), в 2018 г. глобальная распространенность ВИЧ среди взрослого населения составила 0,8 %, а в 2016 г. более 35 млн человек (включая около 1,8 млн детей) живут с ВИЧ-инфекцией [2]. Несмотря на эффективность АРТ-препаратов, пациенты, инфицированные ВИЧ, должны применять антиретровирусную терапию в течение всей жизни, так как их использование не способно полностью устранить инфекцию [1–3]. Это связано с тем, что противовирусные препараты в первую очередь нейтрализуют циркулирующие в кровотоке вирусы и в значительной степени не могут получить доступ к тем вирусным частицам, которые остаются неактивными в вирусных резервуарах в форме провируса. Следовательно, хотя применение антиретровирусной терапии необходимо для уменьшения числа случаев смертности от причин, связанных со СПИДом, одного этого недостаточно для комплексного снижения заболеваемости ВИЧ-1 и функционального лечения.

Обнаружение с помощью новых клеточных технологий в сыворотках некоторых ВИЧ-1-инфицированных людей высокоэффективных ВИЧ-1-специфических моноклональных антител с широким спектром действия (*broadly neutralizing antibodies*, bNAbs) резко активизировало исследования в этой области [4]. На сегодняшний день в результате этих исследований были идентифицированы около 40 bNAbs, способных нейтрализовать до или более 90 % первичных изолятов ВИЧ-1 путем специфического связывания с различными функционально консервативными эпитопами вируса [4]. Эти антитела отличаются от предшественников рядом особенностей, а именно высоким уровнем соматических мутаций и необычно протяженными вариабельными петлями, что обеспечивает им возможность связываться с консервативными, но малодоступными районами оболочки ВИЧ-1. В настоящее время некоторые из обнаруженных анти-ВИЧ антител с широкой нейтрализацией проходят клинические испытания [4] для исследования эффективности использования bNAbs в качестве дополнительного компонента АРТ в комплексном лечении ВИЧ-инфекции, а также с целью оценки перспектив их применения в работах по разработке универсальной противовирусной вакцины. В отличие от схем приема лекарств, которые используются в АРТ, bNAbs могут получить доступ к латентно инфицированным активированным Т-клеткам с помощью нового подхода «шокируй и убивай», использующего изменяющие латентность агенты, которые активируют латентный резервуар ВИЧ-1, позволяя стандартной АРТ нейтрализовать эти вирусные частицы в дополнение к вирионам, циркулирующим в кровотоке. Однако несмотря на эти обнадеживающие открытия, существует ряд проблем, которые необходимо решить, прежде чем допускать перспективные bNAbs к клиническим испытаниям. Во-первых, bNAbs может не обеспечивать *in vivo* нейтрализующий потенциал против ВИЧ, наблюдаемый в условиях *in vitro* [4]. Следовательно, важно оценить степень эффективности и спектр действия bNAbs на вирусных частицах, выращенных в физиологически значимых клетках, например, мононуклеарных клетках периферической крови (или CD4⁺ Т-клетках). Кроме того, некоторые bNAbs, если их назначить в качестве монотерапии, могут оказаться неэффективными по сравнению с другими компонентами АРТ, что, очевидно, существенно повлияет на результаты лечения. Понимание этих явлений поможет выбрать комбинации bNAbs, которые бы преодолели существующие проблемы и обеспечили лучший терапевтический эффект.

Среди анти-ВИЧ bNAbs следует особо выделить моноклональное антитело (МКА) N6, которое нейтрализует *in vitro* 98 % протестированных изолятов ВИЧ-1, включая 16 из 20 штаммов, устойчивых к предшественнику bNAbs N6 – антителу VRC01, которое способно нейтрализовать до 90 % различных штаммов ВИЧ-1, предотвращая присоединение вируса к клеткам иммунной системы [5]. Как и VRC01, МКА N6 блокирует инфекцию, связываясь с частью оболочки ВИЧ-1, ответственной за связывание вируса с первичным рецептором CD4. Результаты работы [5] показали, что антитело N6 выработало уникальный способ связывания с ВИЧ-1, который практически не зависит от вариабельной области оболочки вируса, известной как домен V5 белка gp120, и преимущественно взаимодействует с консервативными областями этого гликопротеина, а именно с Phe⁴³-полостью и петлей D, входящими в состав CD4-связывающего сайта ВИЧ. Такой способ связывания позволяет N6 проявлять устойчивость к изменениям, происходящим в оболочке ВИЧ, включая гликозилирование области V5, являющееся основным механизмом, посредством которого ВИЧ-1 развивает устойчивость к другим антителам класса VRC01 [5]. Чрезвычайно широкий спектр действия и эффективность МКА N6 делают его одним из первоочередных кандидатов для проведения дальнейших экспериментальных исследований по созданию новых противовирусных препаратов для терапии и профилактики ВИЧ-инфекции. По данным биохимических исследований *in vitro*, МКА N6 обладает рядом преимуществ по сравнению с антителом VRC01, которое в настоящее время находится на стадии клинических испытаний, проводимых с целью оценки его эффективности при внутривенных инъекциях. В связи с этим предполагается, что вследствие большей анти-ВИЧ активности и широты спектра действия по сравнению с bNAbs VRC01-класса МКА N6 может оказаться эффективным в профилактике и лечении ВИЧ-инфекции и при подкожных инъекциях.

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в технологиях получения моноклональных анти-ВИЧ bNAbs, изучении их структурно-функциональных свойств и механизмов связывания с молекулярными мишенями, на сегодняшний день не удалось создать иммуноген, индуцирующий антитела против ВИЧ-1 с широкой вирусной нейтрализацией. Поэтому представляют значительный интерес работы по молекулярному дизайну химических соединений, которые обладают фармакофорными свойствами кросс-реактивных нейтрализующих анти-ВИЧ антител, блокирующих разные функционально консервативные эпитопы оболочки вируса. Настоящая работа продолжает начатые нами ранее исследования [6], в которых методами виртуального скрининга и молекулярного моделирования были идентифицированы 6 потенциальных пептидомиметиков МКА N6, имитирующих критические взаимодействия этого антитела с Phe⁴³-полостью белка gp120 ВИЧ-1. Однако, согласно данным работы [5], важную роль в процессе связывания МКА N6 с gp120 играют также взаимодействия антитела с петлей D CD4-связывающего сайта ВИЧ-1, обеспечивающие большую анти-ВИЧ активность и широту спектра действия этого иммуноглобулина по сравнению с bNAbs VRC01-класса. В данном исследовании нами осуществлен виртуальный скрининг химических соединений – функциональных миметиков МКА N6, способных блокировать не только Phe⁴³-полость, но и петлю D белка gp120, и проведена оценка их потенциальной анти-ВИЧ активности методами молекулярного моделирования.

Материалы и методы исследования. Скрининг потенциальных пептидомиметиков МКА N6 выполняли с помощью вычислительного протокола, использованного в [6] для *in silico* идентификации низкомолекулярных химических соединений, имитирующих ключевые взаимодействия антитела с Phe⁴³-полостью белка gp120 ВИЧ-1. Используемый в расчетах вычислительный протокол включал следующие этапы исследований:

1. Построение модели фармакофора, описывающей совокупность структурно-функциональных свойств МКА N6, которые обеспечивают специфические взаимодействия антитела с CD4-связывающим сайтом белка gp120;

2. Виртуальный скрининг молекулярных библиотек веб-сервера «Pharmit» (<http://pharmit.csb.pitt.edu>), направленный на поиск потенциальных структур-кандидатов, удовлетворяющих заданной фармакофорной модели;

3. Молекулярный докинг найденных в базах данных химических соединений с белком gp120;

4. Молекулярную динамику (МД) комплексов лиганд/gp120 и расчет свободной энергии их образования;

5. Отбор молекул, перспективных для синтеза и тестирования на анти-ВИЧ активность.

Построение фармакофорной модели МКА N6 и виртуальный скрининг. Согласно данным рентгеноструктурного анализа [5], антитело N6 взаимодействует с тремя областями CD4-связывающего сайта белка gp120 ВИЧ-1: с гидрофобной Phe⁴³-полостью гликопротеина, а также с его варибельными доменами D и V5. При этом взаимодействия с двумя первыми областями gp120 являются критическими для образования стабильного комплекса N6–gp120. Так, с Phe⁴³-полостью белка gp120 связываются остатки Tyr-54 и Arg-71 тяжелой цепи N6, на долю которых приходится наибольшее число межмолекулярных контактов, реализующихся в интерфейсе комплекса N6–gp120, а с петлей D – остатки Gln-96 легкой цепи и Trp-100с тяжелой цепи антитела, обеспечивающие нейтрализацию ряда штаммов ВИЧ-1, резистентных к другим антителам VRC01-класса [5]. Приведенные экспериментальные данные были использованы для построения фармакофорной модели МКА N6 на основе этих четырех ключевых остатков антитела.

Построение фармакофорной модели МКА N6 (табл. 1) осуществляли с помощью программного обеспечения веб-сервера Pharmit (<http://pharmit.csb.pitt.edu>), который использовал в качестве входных данных структуру комплекса N6–gp120 в кристалле (Банк данных белков; код 5TE7; <https://www.rcsb.org>) [5].

Т а б л и ц а 1. Фармакофорная модель, построенная на основе остатков Tyr-54, Arg-71, Trp-100с и Gln-96 МКА N6, использованная для виртуального скрининга молекулярных библиотек веб-сервера Pharmit

Table 1. Pharmacophore model generated based on the N6 residues Tyr-54, Arg-71, Trp-100c and Gln-96 and used for virtual screening of the molecular libraries of the web server Pharmit

Тип фармакофора Pharmacophore type	Координаты фармакофора X, Y, Z (Å) Pharmacophore coordinates X, Y, Z (Å)			Радиус фармакофора (Å) Pharmacophore radius (Å)
	X	Y	Z	
Донор водородной связи	52,34	50,01	48,89	R = 0,5
Донор водородной связи	52,9	47,94	49,56	R = 0,5
Донор водородной связи	48,78	40,76	51,17	R = 0,5
Акцептор водородной связи	50,3	48,65	52,32	R = 0,5
Гидрофобный	49,7	43,18	52,07	R = 0,5
Положительно заряженный ион	53,18	49,2	49,47	R = 0,75
Донор водородной связи	60,06	51,28	67,07	R = 0,5
Акцептор водородной связи	58,58	56,08	69,74	R = 0,5

Для обнаружения химических соединений со структурно-функциональными свойствами, согласующимися с заданной моделью фармакофора (табл. 1), проводили виртуальный скрининг шести молекулярных библиотек веб-сервера Pharmit, содержащих структуры более 1 млрд 200 млн конформеров для 96 млн химических соединений (<http://pharmit.csb.pitt.edu>). В результате проведенного скрининга потенциальные пептидомиметики МКА N6 обнаружены не были. Однако виртуальный скрининг с различными фармакофорными моделями, полученными на основе исходной модели путем последовательного отключения одного из фармакофоров, позволил идентифицировать 698 соединений, имитирующих основные функциональные особенности остатков Tyr-54, Arg-71, Trp-100с и Gln-96, которые обуславливают биологическую активность МКА N6 по отношению к белку gp120 ВИЧ [5].

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг 698 идентифицированных соединений с белком gp120 осуществляли с помощью программы QuickVina 2 [7] в приближении жесткого рецептора и гибких лигандов. Трехмерную структуру gp120 выделяли из комплекса этого гликопротеина с клеточным рецептором CD4 и нейтрализующим анти-ВИЧ антителом 17b в кристалле (файл PDB 1GC1; <http://www.rcsb.org/pdb/>) [5]. Перед проведением докинга с помощью программного пакета OpenBabel к структурам лигандов и белка gp120 добавляли атомы водорода и проводили их оптимизацию в силовом поле UFF (http://openbabel.org/wiki/Main_Page). Ячейка для до-

кинга включала Phe⁴³-полость, петлю D и вариабельную область V5 CD4-связывающего сайта белка gp120 ВИЧ-1. Для каждого лиганда отбирали комплексы с лучшими значениями оценочной функции QuickVina 2, а затем исследовали их конформационную стабильность методами молекулярной динамики.

Молекулярная динамика. Классическую динамику комплексов лиганд/gp120 проводили с применением программного пакета Amber 16 в силовом поле Amber ff10 [8]. Парциальные заряды атомов системы определяли с помощью модуля ANTECHAMBER пакета Amber 16 [8]. Для подготовки параметров силового поля использовали обобщенное силовое поле GAFF AMBER [8]. Атомы водорода к структуре белка gp120 присоединяли с привлечением модуля tleap пакета AMBER 16 [8]. Первоначально каждый из комплексов лиганд/gp120 помещали в восьмигранник с периодическими граничными условиями.

Кроме комплекса лиганд/gp120 ячейка для моделирования динамики включала воду (модель TIP3P) в качестве явного растворителя, а также ионы Na⁺ и Cl⁻, обеспечивающие общую концентрацию соли 0,15 М [8]. После подготовки системы была выполнена минимизация энергии с использованием 500 шагов алгоритма наискорейшего спуска и 1000 шагов метода сопряженных градиентов. Затем атомы системы фиксировали дополнительным гармоническим потенциалом с силовой константой 1,0 ккал/моль и подвергали фазе уравнивания. Уравнивание системы проводили в три последовательных этапа, включавших: 1) нагрев системы от 0 до 310 К в течение 1 нс в ансамбле NVT с использованием термостата Ланжевена с частотой столкновений 2,0 пс⁻¹ (<http://ambermd.org/changelog.html>) [8]; 2) уравнивание давления в течение 1 нс при давлении 1,0 атм в ансамбле NPT с использованием баростата Берендсена с характерным временем 2,0 пс (<http://ambermd.org/changelog.html>) [8]; 3) снятие ограничений на атомы системы и ее уравнивание при температуре $T = 310$ К в течение 2 нс при постоянном объеме. После достижения уравнивания проводили МД расчеты в ансамбле NPT при температуре $T = 310$ К и давлении $P = 1,0$ атм. МД моделирование выполняли в два этапа. На первом этапе для комплексов белка gp120 с 698 потенциальными миметиками МКА №6, идентифицированными веб-сервером Pharmit, генерировали МД траектории длительностью 1 нс и методом MM/GBSA (<http://ambermd.org/changelog.html>) рассчитывали энтальпийные составляющие свободной энергии образования этих надмолекулярных структур. В результате анализа полученных данных были отобраны 15 соединений, лучших по величине энтальпии связывания и имеющих хорошую растворимость в воде (LogP – коэффициент распределения вещества на границе вода/октанол < 5). На втором этапе для отобранных 15 комплексов выполняли расчет МД траекторий длительностью 30 нс в изобарно-изотермических условиях при температуре $T = 310$ К и давлении $P = 1,0$ атм. Интегрирование уравнений движения Ньютона осуществляли с помощью алгоритма “leap-frog” (<http://ambermd.org/doc10/>) с шагом интегрирования 2,0 фс. Для фиксации длин всех связей, в образовании которых участвуют атомы водорода, применяли алгоритм SHAKE (<http://ambermd.org/changelog.html>). Максимальное расстояние, на котором учитывали невалентные взаимодействия, задавали равным 8,0 Å. Для расчета энергии электростатических взаимодействий использовали метод Эвальда (<http://ambermd.org/changelog.html>).

Средние значения свободной энергии образования комплексов вычисляли с помощью метода MM/GBSA, реализованного в программном пакете AMBER 16 ([8]). При оценке свободной энергии первые 5 нс МД моделирования отводили на релаксацию системы и не учитывали в расчетах. Энтальпийную составляющую свободной энергии связывания вычисляли для 500 комплексов МД траектории, разделенных 50 пс. Энтропийную компоненту рассчитывали для 50 комплексов с шагом 500 пс. Для расчета полярной составляющей энергии сольватации использовали континуальную модель растворителя Пуассона–Больцмана с ионной силой 0,1. неполярные компоненты свободной энергии гидратации вычисляли на основе расчетов площади поверхности, доступной растворителю [8]. Энтропийный член свободной энергии связывания определяли с помощью модуля Nmode в программном пакете Amber 16 [8].

Результаты и их обсуждение. Анализ методом MM/GBSA молекулярно-динамических траекторий длительностью 30 нс, построенных для 15 потенциальных миметиков МКА №6 в комплексе с белком gp120 ВИЧ-1, позволил идентифицировать 3 соединения, характеризующихся

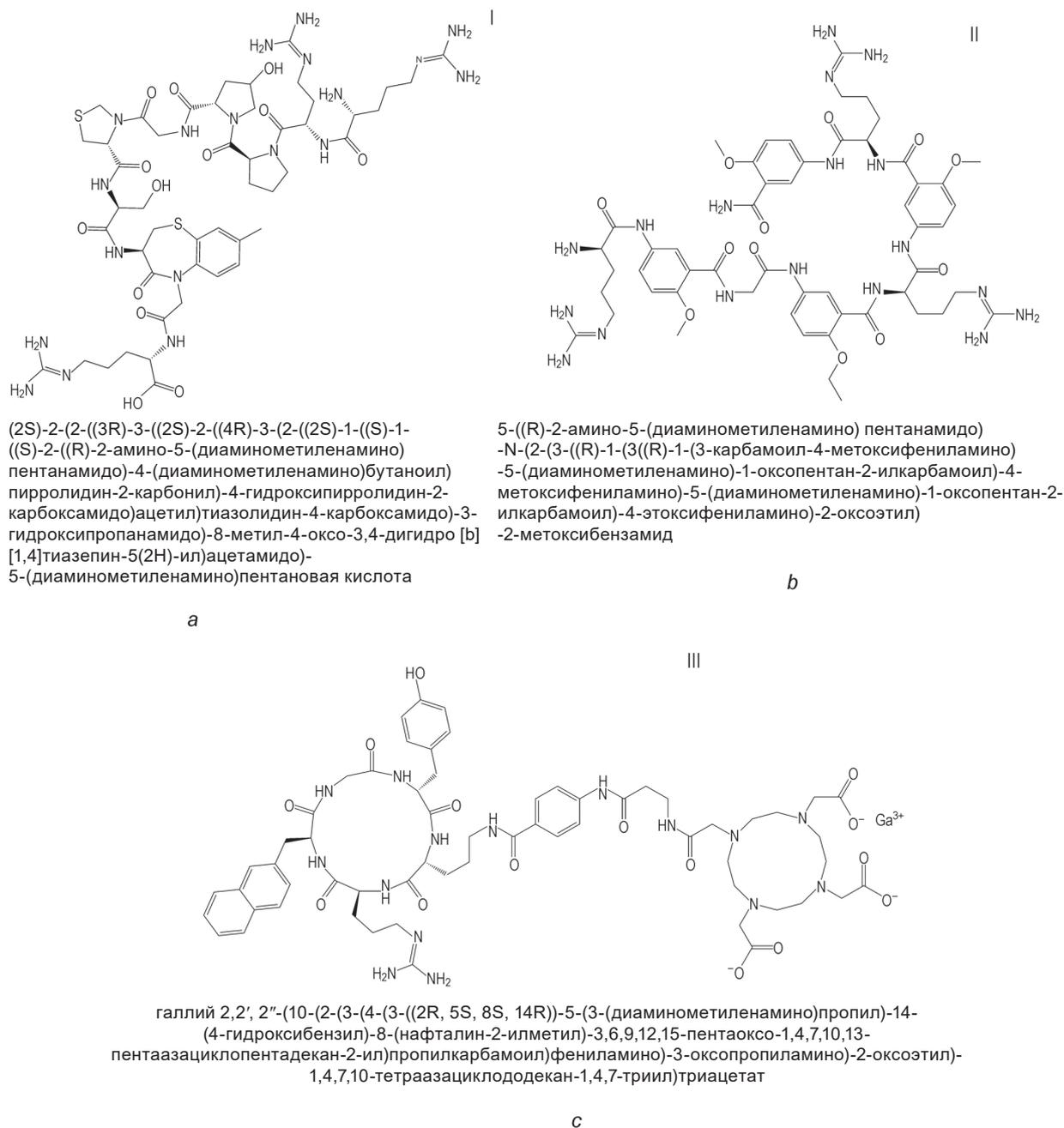


Рис. 1. Химические структуры потенциальных миметиков нейтрализующего анти-ВИЧ-1 антитела N6. Приведены систематические названия соединений

Fig. 1. Chemical structures of the potential mimetics of the neutralizing anti-HIV-1 antibody N6. Systematic names of these compounds are given

отрицательными значениями свободной энергии связывания и способных блокировать участок белка gp120, критический для взаимодействия вируса с первичным рецептором CD4. На рис. 1 показаны химические структуры этих соединений, а в табл. 2 приведены их основные физико-химические параметры.

Исследование комплексов идентифицированных соединений с белком gp120 показывает (рис. 2), что, как и МКА N6, они взаимодействуют с тремя областями CD4-связывающего сайта белка gp120, а именно с Phe⁴³-полостью и с варибельными участками V3 и V5 [5]. Анализ межмолекулярных взаимодействий, реализующихся в структурных комплексах лиганд/gp120 (рис. 2, 3), свидетельствует о том, что наибольшее число межатомных контактов с белком gp120 формирует

Т а б л и ц а 2. Химические соединения – потенциальные пептидомиметики анти-ВИЧ антитела N6, идентифицированные на основе остатков Tyr-54, Arg-71, Trp-100c и Gln-96 иммуноглобулина

T a b l e 2. Chemical compounds presenting potential peptidomimetics of the anti-HIV antibody N6 identified based on the immunoglobulin residues Tyr-54, Arg-71, Trp-100c and Gln-96

Лиганд Ligand	Химическая формула Chemical formula	Молекулярная масса (Да) Molecular mass (Da)	LogP	Число доноров водородной связи Number of H-bond donors	Число акцепторов водородной связи Number of H-bond acceptors
I	$C_{48}H_{75}N_{19}O_{13}S_2$	1190,368	-8,5	15	19
II	$C_{53}H_{72}N_{18}O_{12}$	1153,273	-2,5	15	16
III	$C_{61}H_{78}GaN_{15}O_{15}$	1331,108	-7,1	11	20

П р и м е ч а н и е: LogP – липофильность соединения (логарифм распределения вещества в системе октанол/вода).
N o t e: LogP – compound lipophilicity (logarithm of substance distribution in the system octanol/water).

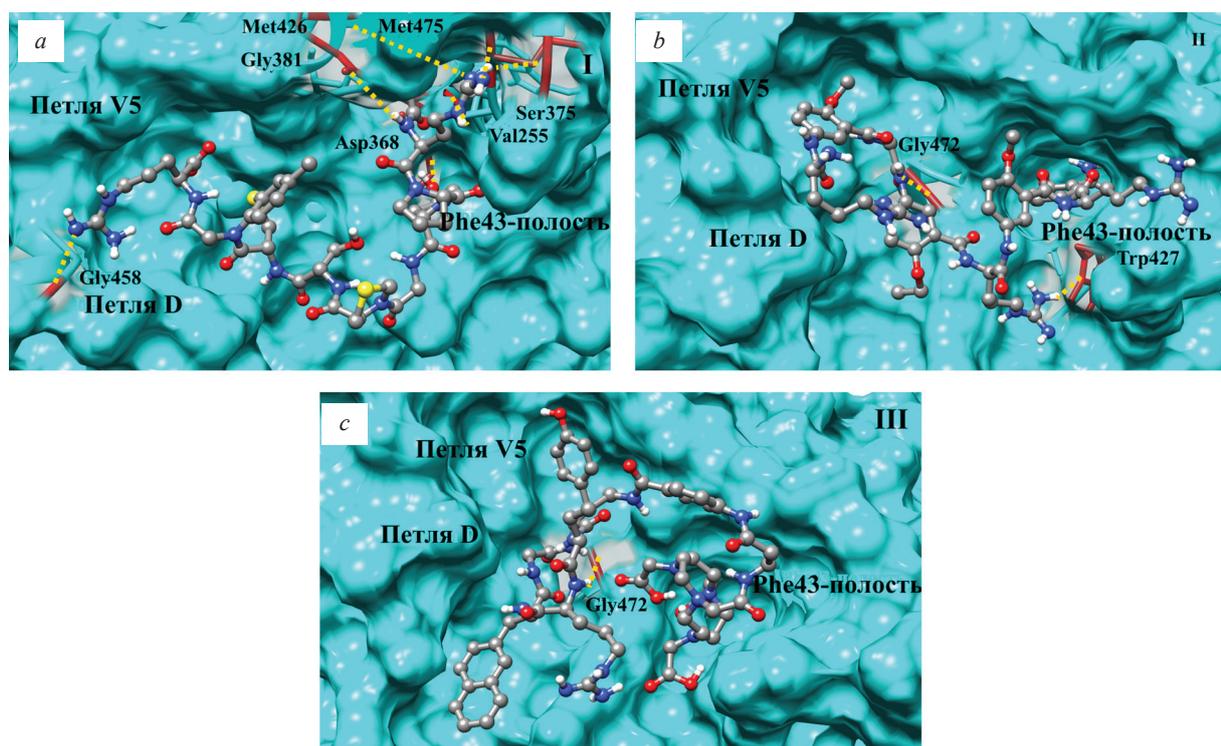


Рис. 2. Структурные комплексы соединений I (a), II (b) и III (c) с белком gp120 ВИЧ-1, построенные методом молекулярного докинга и оптимизированные на этапе их подготовки к МД расчетам. Соединения изображены с помощью молекулярной модели «шарик–палочка–шарик». Отмечены остатки белка gp120, образующие водородные связи с лигандами. Водородные связи показаны точечными линиями

Fig. 2. Structural complexes of compounds I (a), II (b) and III (c) with the HIV-1 gp120 protein generated by molecular docking and optimized at the stage of their preparation for the MD simulations. The compounds are represented by a ball–stick–ball model. The residues of gp120 forming hydrogen bonds with the ligands are indicated. Hydrogen bonds are shown by dotted lines

соединение I, образующее семь водородных связей и широкую сеть ван-дер-ваальсовых контактов с аминокислотными остатками этого гликопротеина, ответственными за связывание ВИЧ-1 с клеточным рецептором CD4. Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что это соединение образует водородную связь с Asp-368_{gp120}, имитируя взаимодействие Arg-71 МКА N6 с этим остатком белка gp120 [5], который является одним из ключевых компонентов CD4-связывающего сайта ВИЧ-1 [9]. По данным рентгеноструктурного анализа [9], Asp-368_{gp120} участвует в водородном связывании с остатком Arg-59 молекулы CD4, и это взаимодействие играет важную роль в процессе адсорбции вируса на поверхности клетки-мишени, что подтверждают результаты сайт-направленного мутагенеза, согласно которым одиночная замена остатка Asp-368 белка gp120 на аланин существенно уменьшает инфективность вируса [10]. Соединение I формирует

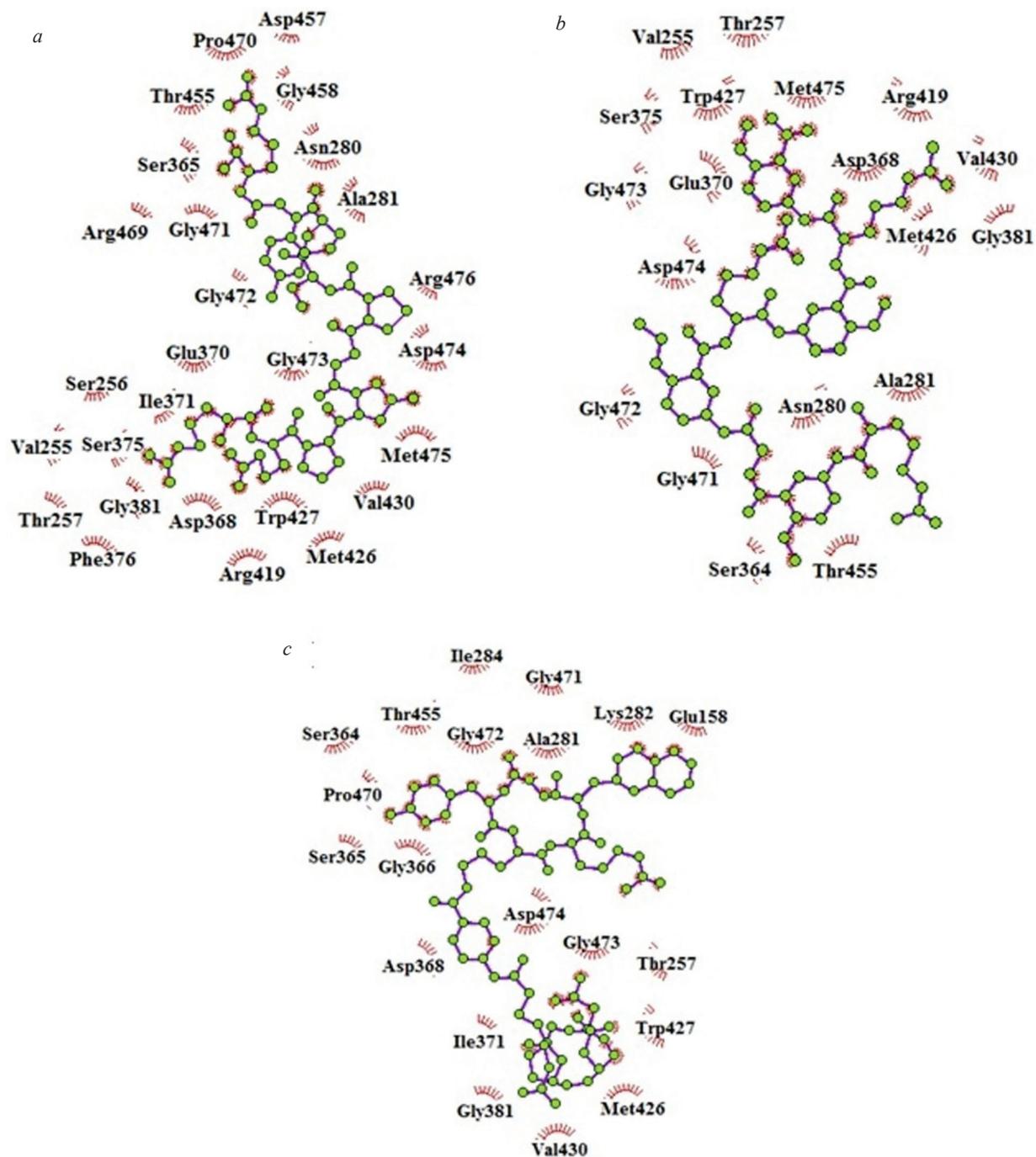


Рис. 3. Аминокислотные остатки белка gp120, формирующие ван-дер-ваальсовы контакты с соединениями I (a), II (b) и III (c)

Fig. 3. The gp120 residues forming van der Waals contacts with compounds I (a), II (b) and III (c)

также водородные связи с остатками Val-255, Ser-355, Gly-381, Met-426 и Met-475, входящими в состав Phe⁴³-полости белка gp120, а также с остатком Gly-458, расположенным в его вариательной области V5 (рис. 2). Среди этих остатков следует особо отметить Met-426_{gp120}, который, как и Asp-368_{gp120}, формирует «горячую точку» связывания в интерфейсе gp120–CD4 [11]. В частности, в [12] было показано, что прямое водородное связывание ингибитора ВИЧ (+)-DMJ-II-121 с карбонильной группой остатка Met-426_{gp120} приводит к увеличению противовирусной активности по сравнению с ингибитором (+)-DMJ-I-228, который взаимодействует с Met-426_{gp120} путем образования водородной связи, опосредованной водным окружением. При анализе межмолеку-

лярных контактов соединения I необходимо также отметить водородную связь этого лиганда с остатком Gly-458_{gp120} вариабельной области V5 белка gp120, присутствующим в интерфейсе N6–gp120 наряду с остатками Phe⁴³-полости и петли D [5]. Как было отмечено выше, МКА N6 не зависит от вариаций аминокислотной последовательности домена V5 белка gp120, что наделяет этот иммуноглобулин способностью нейтрализовывать ряд штаммов ВИЧ-1, резистентных к другим антителам VRC01-класса, взаимодействующим с CD4-связывающим сайтом оболочки вируса [5].

Наряду с водородными связями, соединение I формирует большое число ван-дер-ваальсовых контактов с остатками, расположенными в областях белка gp120, которые связываются с антителом N6 (рис. 3, a). Среди этих остатков необходимо особо отметить Asp-368, Glu-370, Ile-371, Met-426, Trp-427 и Gly-473 (рис. 3, a), расположенные у входа или внутри Phe⁴³-полости белка gp120 [9]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа [9], именно эти остатки являются основными вкладчиками во взаимодействие белка gp120 с Arg-59_{CD4} и Phe-43_{CD4}, на долю которого приходится около 23 % от общего числа контактов рецептора CD4 с CD4-связывающим сайтом ВИЧ-1 [9]. При этом Arg-59_{CD4} образует водородные связи с Asp-368_{gp120}, а остаток Phe-43_{CD4} вовлечен в широкую сеть ван-дер-ваальсовых контактов с Glu-370_{gp120}, Met-426_{gp120}, Trp-427_{gp120} и Gly-473_{gp120} [9]. Этот вывод касается остатка Thr-257_{gp120}, который расположен в кристаллической структуре комплекса gp120/CD4 под бензольным кольцом Phe-43_{CD4} и формирует прямые межатомные контакты с клеточным рецептором CD4, а также остатка Met-475_{gp120} [9]. Кроме Phe⁴³-полости, соединение I участвует в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях с остатками Asn-280 и Ala-281 петли D3, а также с остатками Gly-458 и Arg-469, расположенными в вариабельной области V5 белка gp120 (рис. 3, a) [9].

В отличие от соединения I, принимающего активное участие в образовании межмолекулярных водородных связей, лиганды II и III вступают в водородное связывание лишь с двумя аминокислотными остатками CD4-связывающего сайта ВИЧ, локализованными в Phe⁴³-полости белка gp120, а именно с Gly-472 и с Trp-427 (рис. 2, b и c). При этом соединение II формирует водородные связи с обеими аминокислотами, а соединение III – только с Gly-472 (рис. 2, b и c). Однако как и соединение I, лиганды II и III образуют обширную сеть прямых межатомных контактов с остатками белка gp120, критическими для связывания ВИЧ-1 с клеточным рецептором CD4 (рис. 3, b и c) [9].

Анализ величин констант диссоциации (K_d) комплексов потенциальных миметиков МКА N6 с белком gp120, рассчитанных с помощью оценочной функции NNScore 2.0 (nbc.ucsd.edu/pnnscore), свидетельствует об их высоком сродстве к CD4-связывающему сайту ВИЧ-1. Построенные методом молекулярного докинга комплексы характеризуются низкими значениями K_d , равными 17,0 нмоль (лиганд I), 34 нмоль (лиганд II) и 55 нмоль (лиганд III), что подтверждает высокую эффективность межмолекулярных взаимодействий, стабилизирующих эти надмолекулярные структуры. Данные МД расчетов подтверждают выводы, сделанные на основе анализа результатов статических моделей комплексов лиганд/gp120, которые не претерпевают значительных структурных преобразований в процессе молекулярной динамики. Этот вывод согласуется с приведенными в табл. 3 средними значениями свободной энергии Гиббса и соответствующими им

Т а б л и ц а 3. Средние значения свободной энергии $\langle \Delta G \rangle$ образования комплексов потенциальных миметиков антитела N6 с белком gp120 ВИЧ-1 и соответствующие им стандартные отклонения ΔG_{STD}

T a b l e 3. Averages of binding free energy $\langle \Delta G \rangle$ for the complexes of the antibody N6 mimetics with the HIV-1 gp120 protein and their standard deviations ΔG_{STD}

Лиганд Ligand	$\langle \Delta H \rangle$, ккал/моль (kcal/mol)	$(\Delta H)_{STD}$, ккал/моль (kcal/mol)	$\langle T\Delta S \rangle$, ккал/моль (kcal/mol)	$(T\Delta S)_{STD}$, ккал/моль (kcal/mol)	$\langle \Delta G \rangle$, ккал/моль (kcal/mol)	ΔG_{STD} , ккал/моль (kcal/mol)
I	-62,43	6,31	-42,13	8,04	-20,30	10,22
II	-55,87	8,71	-45,15	7,92	-10,72	11,77
III	-41,25	5,40	-31,33	9,32	-9,92	10,77

П р и м е ч а н и е: $\langle \Delta H \rangle$ и $\langle T\Delta S \rangle$ – соответственно средние значения энтальпийной и энтропийной составляющих свободной энергии; $(\Delta H)_{STD}$ и $(T\Delta S)_{STD}$ – соответствующие этим значениям стандартные отклонения.

N o t e: $\langle \Delta H \rangle$ and $\langle T\Delta S \rangle$ are the mean values of enthalpic and entropic components of free energy respectively; $(\Delta H)_{STD}$ and $(T\Delta S)_{STD}$ are standard deviations corresponding to these values.

величинами стандартных отклонений. Анализ данных табл. 3 показывает, что межмолекулярные взаимодействия соединения I с белком gp120 приводят к существенно более низкому значению свободной энергии связывания по сравнению с соответствующими величинами для соединений II и III, а также с величиной $-9,5 \pm 0,1$ ккал/моль, измеренной методом изотермической титрационной калориметрии для комплекса gp120/CD4 [13]. При этом расчетные значения энергии Гиббса для лигандов II и III близки к этой экспериментальной величине (табл. 3).

Заключение. В результате совместного использования методов виртуального скрининга и молекулярного моделирования обнаружены три химических соединения – функциональных миметика анти-ВИЧ антитела N6, нейтрализующего ряд штаммов ВИЧ-1, резистентных к другим антителам, взаимодействующим с CD4-связывающим сайтом оболочки вируса. В отличие от соединений, идентифицированных ранее [6] и взаимодействующих с Phe⁴³-полостью белка gp120, обнаруженные в настоящей работе лиганды кроме этого гидрофобного кармана оболочки вируса связываются, как и антитело N6, с еще двумя функционально важными областями гликопротеина – петлей D и варибельным участком V5, что обеспечивает более широкий спектр нейтрализующего действия этого иммуноглобулина. Обнаруженные соединения образуют широкую сеть межмолекулярных контактов с остатками белка gp120, ответственными за связывание с рецептором CD4, и проявляют высокое сродство к CD4-связывающему сайту ВИЧ-1 в соответствии с низкими значениями констант диссоциации и свободной энергии Гиббса, рассчитанными для их комплексов с белком gp120. Среди найденных соединений наиболее перспективный «компьютерный профиль» имеет соединение I, формирующее семь водородных связей и большое число ван-дер-ваальсовых контактов с аминокислотными остатками молекулярной мишени, доминирующими в интерфейсе gp120/CD4. Поэтому это соединение является первоочередным кандидатом для тестирования на анти-ВИЧ активность против широкого набора различающихся вирионов ВИЧ.

Идентифицированные соединения могут быть использованы в качестве базовых структур для разработки новых эффективных лекарственных препаратов против ВИЧ-1 с широким спектром нейтрализующего действия.

Благодарности. Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект X18КИ-002) и Национальным фондом естественных наук Китая (проект 84630090) в рамках программы сотрудничества и обмена.

Acknowledgements. The study was supported by grants from the Belarusian Foundation for Basic Research (project X18КИ-002) and the National Natural Science Foundation of China (project 84630090) within the cooperation and exchange Program.

Список использованных источников

1. Sharp, P. M. Origins of HIV and the AIDS pandemic / P. M. Sharp, B. H. Hahn // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2011. – Vol. 1, N 1. – P. a006841. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
2. UNAIDS | AIDSinfo [Electronic resource]. – Mode of access: <http://aidsinfo.unaids.org/>. – Date of access: 27.07.2019.
3. Kumari, G. Highly active antiretroviral therapy for treatment of HIV/AIDS patients: current status and future prospects and the Indian scenario / G. Kumari, R.K. Singh // *HIV AIDS Rev.* – 2012. – Vol. 11, N 1. – P. 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.hivar.2012.02.003>
4. Mann, J. K. HIV-1 vaccine immunogen design strategies / J. K. Mann, T. Ndung'u // *Virol. J.* – 2015. – Vol. 12, N 1. – P. 3. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0221-0>
5. Identification of a CD4-binding-site antibody to HIV that evolved near-pan neutralization breadth / J. Huang [et al.] // *Immunity.* – 2016. – Vol. 45, N 5. – P. 1108–1121. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.027>
6. Виртуальный скрининг и идентификация потенциальных ингибиторов ВИЧ-1 на основе кросс-реактивного нейтрализующего антитела N6 / А. М. Андрианов [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 4. – С. 445–456. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-4-445-456>
7. Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2 / A. Alhossary [et al.] // *Bioinformatics.* – 2015. – Vol. 31, N 13. – P. 2214–2216. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv082>
8. AMBER 16 / D. A. Case [et al.]. – San Francisco, 2016.
9. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody / P. D. Kwong [et al.] // *Nature.* – 1998. – Vol. 393, N 6686. – P. 648–659. <https://doi.org/10.1038/31405>
10. Identification of individual human-immunodeficiency-virus type-1 gp120 amino-acids important for CD4 receptor-binding / U. Olshevsky [et al.] // *Virol.* – 1990. – Vol. 64, N 12. – P. 5701–5707.
11. Liu, Y. Optimization of CD4/gp120 inhibitors by thermodynamic-guided alanine-scanning mutagenesis / Y. Liu, A. Schön, E. Freire // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2013. – Vol. 81, N 1. – P. 72–78. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12075>
12. Structure-based design, synthesis and validation of CD4-mimetic small molecule inhibitors of HIV-1 entry: Conversion of a viral entry agonist to an antagonist / J. R. Courter [et al.] // *Acc. Chem. Res.* – 2014. – Vol. 47, N 4. – P. 1228–1237. <https://doi.org/10.1021/ar4002735>
13. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction / D. G. Myszka [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97, N 16. – P. 9026–9031. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.9026>

References

1. Sharp P. M., Hahn B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2011, vol. 1, no. 1, p. a006841. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
2. UNAIDS | *AIDSinfo*. Available: <http://aidsinfo.unaids.org/> (accessed on 27 June 2019).
3. Kumari G., Singh R. K. Highly active antiretroviral therapy for treatment of HIV/AIDS patients: current status and future prospects and the Indian scenario. *HIV & AIDS Review*, 2012, vol. 11, no. 1, pp. 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.hivar.2012.02.003>
4. Mann J. K., Ndong'u T. HIV-1 vaccine immunogen design strategies. *Virology Journal*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 3. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0221-0>
5. Huang J., Kang B. H., Ishida E., Zhou T., Griesman T., Sheng Z., Wu F., Doria-Rose N. A., Zhang B., McKee K., O'Dell S., Chuang G. Y., Druz A., Georgiev I. S., Schramm C. A., Zheng A., Joyce M. G., Asokan M., Ransier A., Darko S., Migueles S. A., Bailer R. T., Louder M. K., Alam S. M., Parks R., Kelsoe G., Von Holle T., Haynes B. F., Douek D. C., Hirsch V., Seaman M. S., Shapiro L., Mascola J. R., Kwon P. D., Connors M. Identification of a CD4-binding-site antibody to HIV that evoked nearpan neutralization breadth. *Immunity*, 2016, vol. 45, no. 5, pp. 1108–1121. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.027>
6. Andrianov A. M., Nikolaev G. I., Kornoushenko Yu. V., Huang J., Jiang S., Tuzikov A. V. Virtual screening and identification of potential HIV-1 inhibitors based on the cross-reactive neutralizing antibody N6. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 4, pp. 445–456 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-4-445-456>
7. Alhossary A., Handoko S. D., Mu Y., Kwok C. K. Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2. *Bioinformatics*, 2015, vol. 31, no. 13, pp. 2214–2216. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv082>
8. Case D. A., Betz R. M., Cerutti D. S., Cheatham T. E., Darden T. A., Duke R. E., Giese T. J., Gohlke H., Goetz A. W., Homeyer N., Izadi S., Janowski P., Kaus J., Kovalenko A., Lee T. S., LeGrand S., Li P., Lin C., Luchko T., Luo R., Madej B., Mermelstein D., Merz K. M., Monard G., Nguyen H., Nguyen H. T., Omelyan I., Onufriev A., Roe D. R., Roitberg A., Sagui C., Simmerling C. L., Botello-Smith W. M., Swails J., Walker R. C., Wang J., Wolf R. M., Wu X., Xiao L., Kollman P. A. *AMBER 2016*. San Francisco, 2016.
9. Kwong P. D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R. W., Sodroski J., Hendrickson W. A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 1998, vol. 393, no. 6686, pp. 648–659. <https://doi.org/10.1038/31405>
10. Olshevsky U., Helseth E., Furman C., Li J., Haseltine W., Sodroski J. Identification of individual human-immunodeficiency-virus type-1 gp120 amino-acids important for CD4 receptor-binding. *Journal of Virology*. 1990, vol. 64, no. 12, pp. 5701–5707.
11. Liu Y., Schön A., Freire E. Optimization of CD4/gp120 inhibitors by thermodynamic-guided alanine-scanning mutagenesis. *Chemical Biology and Drug Design*, 2013, vol. 81, no. 1, pp. 72–78. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12075>
12. Courter J. R., Madani N., Sodroski J., Schön A., Freire E., Kwong P. D., Hendrickson W. A., Chaiken I. M., LaLonde J. M., Smith A. B. Structure-based design, synthesis and validation of CD4-mimetic small molecule inhibitors of HIV-1 entry: Conversion of a viral entry agonist to an antagonist. *Accounts of Chemical Research*, 2014, vol. 47, no. 4, pp. 1228–1237. <https://doi.org/10.1021/ar4002735>
13. Myszka D. G., Sweet R. W., Hensley P., Brigham-Burke M., Kwong P. D., Hendrickson W. A., Wyatt R., Sodroski J., Doyle M. L. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, vol. 97, no. 16, pp. 9026–9031. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.9026>

Информация об авторах

Андрянов Александр Михайлович – д-р хим. наук, гл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrianov@iboch.by.

Николаев Григорий Игоревич – аспирант. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (Сурганова, 6, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: reshaemvsem@gmail.com.

Корноушенко Юрий Валерьевич – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yurakorval@gmail.com.

Карпенко Анна Дмитриевна – аспирант. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (Сурганова, 6, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: rfe.karpenko@gmail.com.

Джингхе Хуанг – профессор. Key Laboratory of Medical Molecular Virology (MOE/NHC/CAMS), School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai, China. E-mail: Jinghehuang@fudan.edu.cn.

Шибо Дзян – профессор. Key Laboratory of Medical Molecular Virology (MOE/NHC/CAMS), School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai, China. E-mail: shibojiang@fudan.edu.cn.

Тузиков Александр Васильевич – член-корреспондент, д-р физ.-мат. наук, профессор, генеральный директор. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (Сурганова, 6, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tuzikov@newman.bas-net.by.

Information about the authors

Andrianov Alexander Mikhailovich – D. Sc. (Chemistry), Chief researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrianov@iboch.by.

Nikolaev Grigory Igorevich – Postgraduate student. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: reshaemvsem@gmail.com.

Kornoushenko Yuri Valerievich – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yurakorval@gmail.com.

Karpenko Anna Dmitrievna – Postgraduate student. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rfe.karpenko@gmail.com.

Jinghe Huang – Professor. Key Laboratory of Medical Molecular Virology (MOE/NHC/CAMS), School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai, China. E-mail: Jinghehuang@fudan.edu.cn.

Shibo Jiang – Professor. Key Laboratory of Medical Molecular Virology (MOE/NHC/CAMS), School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai, China. E-mail: shibojiang@fudan.edu.cn.

Tuzikov Alexander Vasilievich – Corresponding Member, D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor, General Director. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tuzikov@newman.bas-net.by.