

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

УДК 51-76:577.322:539.19
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-4-445-456>

Поступило в редакцию 06.03.2019
Received 06.03.2019

**А. М. Андрианов¹, Г. И. Николаев², Ю. В. Корноушенко¹, 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*

ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ КРОСС-РЕАКТИВНОГО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА N6

Аннотация. Методами виртуального скрининга и молекулярного моделирования идентифицированы 6 потенциальных пептидомиметиков кросс-реактивного нейтрализующего анти-ВИЧ-1 антитела N6, способных имитировать фармакофорные свойства этого иммуноглобулина путем специфических и эффективных взаимодействий с CD4-связывающим сайтом белка gp120 оболочки вируса. Показано, что ключевую роль во взаимодействии этих соединений с белком gp120 играют многочисленные ван-дер-ваальсовы контакты с консервативными остатками Phe⁴³-полости гликопротеина, критическими для связывания ВИЧ-1 с клеточным рецептором CD4, а также водородные связи с остатком Asp-368_{gp120}, образование которых увеличивает химическое сродство без активации нежелательного аллостерического эффекта. Согласно данным молекулярной динамики, комплексы обнаруженных лигандов с белком gp120 энергетически стабильны и характеризуются более низкими значениями свободной энергии связывания по сравнению с ингибиторами ВИЧ-1 NBD-11021 и DMJ-II-121, использованными в расчетах в качестве контрольных соединений. Идентифицированные соединения могут быть использованы в работах по созданию новых противовирусных препаратов – ингибиторов проникновения ВИЧ-1, блокирующих ранние стадии развития ВИЧ-инфекции.

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

Для цитирования: 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>

**Alexander M. Andrianov¹, Gregory I. Nikolaev², Yuri V. Kornoushenko¹, 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*

VIRTUAL SCREENING AND IDENTIFICATION OF POTENTIAL HIV-1 INHIBITORS BASED ON THE CROSS-REACTIVE NEUTRALIZING ANTIBODY N6

Abstract. Six potential peptidomimetics of the cross-reactive neutralizing anti-HIV-1 antibody N6 that are able to mimic the pharmacophoric features of this immunoglobulin by specific and effective interactions with the CD4-binding site of the viral gp120 protein were identified by virtual screening and molecular modeling. The key role in the interaction of these compounds with gp120 is shown to play multiple van der Waals contacts with conserved residues of the gp120 Phe⁴³ cavity critical for the HIV binding to cellular receptor CD4, as well as hydrogen bonds with Asp-368_{gp120} that increase the chemical affinity without activating unwanted allosteric effect. According to the data of molecular dynamics, the complexes of the identified ligands with gp120 are energetically stable and show the lower values of binding free energy compared with the HIV-1 inhibitors NBD-11021 and DMJ-II-121 used in the calculations as a positive control. The identified compounds may be

involved in the design of novel antiviral drugs presenting HIV-1 inhibitors that block the early stages of the development of HIV infection.

Keywords: HIV-1, gp120 protein, 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., 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>

Введение. Этиологический агент СПИДа – вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) – является одним из наиболее хорошо изученных вирусов, однако эффективные лекарства для профилактики и лечения этого заболевания до сих пор не созданы [1]. С начала эпидемии СПИДа более 70 млн человек были инфицированы ВИЧ-1 и около половины из них уже умерли [1; 2]. Значительный прогресс был достигнут только в разработке метода высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), заключающегося в использовании комбинации как минимум трех антиретровирусных препаратов, которые блокируют различные этапы репликационного цикла вируса. ВААРТ значительно увеличивает продолжительность жизни пациентов и уменьшает количество новых инфекций. Однако длительное использование антиретровирусных препаратов может вызывать серьезные побочные эффекты и появление устойчивых к лекарственным средствам вирусных штаммов, что приводит к необходимости разработки новых, более эффективных и безопасных анти-ВИЧ-1 препаратов [1; 2].

На сегодняшний день разработка профилактической вакцины против ВИЧ-1 рассматривается в качестве единственного способа для предотвращения распространения пандемии СПИДа [3]. Однако многочисленные механизмы, используемые ВИЧ-1, обеспечивают защиту вируса от иммунной атаки, создавая значительные препятствия на пути решения проблемы [4]. Обнаружение анти-ВИЧ антител с широкой нейтрализующей активностью, выделенных у отдельных ВИЧ-позитивных пациентов, которые на протяжении 15–20 лет не проявляют признаков болезни, предполагает возможность преодоления «защитного щита» ВИЧ-1 путем создания иммуногена, способного индуцировать выработку антител широкого спектра действия, имеющих естественное происхождение [5].

В настоящее время более 40 моноклональных антител (МКА) с широкой вирусной нейтрализацией являются потенциальными кандидатами для разработки безопасной и эффективной вакцины против ВИЧ-1 [5]. Эти антитела блокируют четыре функционально консервативных эпитопа оболочки вируса, которые включают CD4-связывающий сайт белка gp120, сегменты V1/V2 и V3 этого гликопротеина, проксимальную внешнюю область MPER белка gp41 и четвертичный интерфейс gp120–gp41 [5]. Среди кросс-реактивных анти-ВИЧ антител следует особо выделить МКА N6, которое нейтрализует до 98 % протестированных штаммов ВИЧ-1, включая 16 из 20 штаммов, резистентных к другим антителам, блокирующим CD4-связывающий участок белка gp120 [6]. Антитело N6 взаимодействует с относительно консервативными областями CD4-связывающего участка белка gp120 и, в отличие от его предшественников класса VRC01, практически независимо от вариабельной области V5 гликопротеина [6]. Этот уникальный способ связывания обеспечивает устойчивость N6 к изменениям оболочки вируса, включая N-гликозилирование петли V5, являющееся в значительной степени причиной резистентности ВИЧ-1 к другим антителам, подобным VRC01 [6].

Несмотря на значительный прогресс в идентификации анти-ВИЧ антител с широкой нейтрализующей активностью и в определении механизмов их специфического связывания с белками оболочки вируса, многочисленные попытки разработать иммуноген, индуцирующий кросс-реактивные антитела к ВИЧ-1, к настоящему времени не увенчались успехом [4; 5]. К сожалению, разработанные вакцины-кандидаты не могут стимулировать индукцию нейтрализующих антител против большинства циркулирующих в мире вирусных штаммов. Поэтому задача создания универсальной вакцины против ВИЧ является главным приоритетом в развитии стратегий по разработке эффективных препаратов для профилактики и лечения ВИЧ-инфекции [5]. Одной из

существенных проблем в решении этой задачи является сложная пространственная организация антигенных детерминант, узнаваемых большинством нейтрализующих ВИЧ-1 антител.

В последние годы было разработано и протестировано большое число ингибиторов проникновения ВИЧ-1 с различными механизмами действия, но только два из них – антагонист корцептора CCR5 маравинок и ингибитор слияния ВИЧ-1 энфувиртид – были одобрены для клинического использования [1; 2]. Однако недостатки этих антиретровирусных препаратов значительно ограничивают их применение в ВААРТ. Поскольку маравинок взаимодействует с корцептором CCR5 клетки-мишени, а не с молекулярной мишенью, этот препарат не используется в стандартных режимах ВААРТ и применяется только для терапии пациентов, инфицированных CCR5-тропными штаммами ВИЧ-1 [1; 2]. Основными недостатками лечения энфувиртидом, который связывается с белком gp41 и предотвращает слияние мембран вируса и клетки хозяина, является необходимость двукратного ежедневного внутримышечного введения и его высокая стоимость. Кроме того, клиническое применение энфувертида ограничено его относительно низкой активностью, низким генетическим барьером лекарственной устойчивости и коротким периодом полувыведения [1; 2].

Таким образом, существует очевидная необходимость в разработке более эффективных ингибиторов проникновения ВИЧ-1 с множественной лекарственной устойчивостью и улучшенными фармакологическими свойствами. В связи с этим представляется актуальным поиск низкомолекулярных соединений, способных имитировать структурные и фармакофорные свойства антител широкого спектра действия против ВИЧ-1.

В настоящей работе проведен виртуальный скрининг низкомолекулярных химических соединений, имитирующих фармакофорные свойства анти-ВИЧ антитела N6 [6], выполнена оценка их потенциальной нейтрализующей активности и идентифицированы молекулы, перспективные для создания новых эффективных противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Для решения поставленной задачи были выполнены исследования, включающие следующие этапы:

1) построение модели фармакофора, описывающей совокупность структурно-функциональных свойств анти-ВИЧ антитела N6, обеспечивающих специфичность его взаимодействия с CD4-связывающим участком белка gp120 оболочки вируса;

2) виртуальный скрининг молекулярных библиотек веб-сервера Pharmit [7], позволяющего проводить интерактивное исследование химического пространства с целью поиска потенциальных лекарств на основе их структурно-функционального сходства с высокоаффинными лигандами белка-мишени;

3) молекулярный докинг белка gp120 ВИЧ-1 с соединениями, согласующимися с заданной фармакофорной моделью МКА N6;

4) молекулярную динамику (МД) комплексов потенциальных N6-миметиков с белком gp120, расчет свободной энергии их образования и отбор молекул, перспективных для тестирования на анти-ВИЧ активность против широкого набора модификаций вируса.

Материалы и методы исследования. Для построения модели фармакофора анти-ВИЧ антитела N6 использовали программное обеспечение веб-сервера Pharmit (<http://pharmit.csb.pitt.edu>) [7] с привлечением в качестве входных данных структуры комплекса N6/gp120 в кристалле (Банк данных белков; код 5TE7; <https://www.rcsb.org>) [6]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа [6], определяющую роль в связывании МКА N6 с белком gp120 ВИЧ-1 играют остатки Tyr-54 и Arg-71 тяжелой цепи иммуноглобулина, которые специфически взаимодействуют с гидрофобным «карманом» CD4-связывающего сайта белка gp120, именуемым Phe⁴³-полостью, критической для связывания вируса с первичным рецептором CD4. В табл. 1 приведена модель фармакофора, построенная на основе этих остатков антитела в результате совместного анализа результатов, предсказанных сервером «Pharmit», с данными рентгеновской кристаллографии [6]. Эта модель была использована для проведения виртуального скрининга баз данных химических соединений с целью идентификации низкомолекулярных соединений, способных имитировать взаимодействия МКА N6 с Phe⁴³-полостью белка gp120 оболочки вируса.

Т а б л и ц а 1. Фармакофорная модель кросс-реактивного анти-ВИЧ антитела N6, использованная для виртуального скрининга молекулярных библиотек веб-сервера Pharmit

Table 1. Pharmacophore model of the cross-reactive antibody N6 used for virtual screening of the molecular libraries of the web server Pharmit

Тип фармакофора Pharmacophore type	Координаты X, Y, Z фармакофора (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

Виртуальный скрининг осуществляли в шести молекулярных библиотеках веб-сервера Pharmit, содержащих структуры более 1 млрд 200 млн конформеров для 96 млн химических соединений (<http://pharmit.csb.pitt.edu>). В результате был идентифицирован набор соединений, удовлетворяющих заданной модели фармакофора и характеризующихся отрицательными значениями энергии связывания с белком gp120. Оценку эффективности взаимодействия этих соединений с белком gp120 ВИЧ-1 проводили методами молекулярного докинга и молекулярной динамики.

Структуру белка gp120 ВИЧ-1 в кристалле (код 5TE7 в Банке данных белков) [6] использовали в приближении жесткого рецептора для проведения молекулярного докинга с соединениями, идентифицированными в базах данных сервера Pharmit. Докинг осуществляли с учетом конформационной подвижности лигандов с помощью программы QuickVina 2 [8]. В качестве положительного контроля использовали ингибиторы проникновения ВИЧ-1 NBD-11021 [9] и DMJ-II-121 [10], представляющие новый класс полных функциональных антагонистов клеточного рецептора CD4. Трехмерные структуры ингибиторов NBD-11021 и DMJ-II-121 заимствовали из их структурных комплексов с белком gp120, установленных методом рентгеноструктурного анализа [9; 10]. Перед проведением докинга к структурам лигандов и рецептора добавляли атомы водорода с привлечением программного пакета OpenBabel и выполняли их оптимизацию в силовом поле UFF (http://openbabel.org/wiki/Main_Page). Ячейка для докинга включала Phe⁴³-полость белка gp120 и представляла собой область гликопротеина со следующими пограничными значениями координат: $X \in (38 \text{ \AA}, 63 \text{ \AA})$, $Y \in (34 \text{ \AA}, 59 \text{ \AA})$, $Z \in (55 \text{ \AA}, 75 \text{ \AA})$; т. е. объем ячейки составлял $25 \times 25 \times 20 = 12500 \text{ \AA}^3$. Для каждого лиганда генерировали 9 моделей комплекса, лучших по значению оценочной функции; при этом параметр, характеризующий полноту поиска (охват конформационного пространства), был задан равным 50.

Межмолекулярные взаимодействия в структурных комплексах потенциальных лигандов с белком gp120 ВИЧ-1 определяли с помощью программы BINANA (<http://nbc.ucs.d.edu/data/sw/hosted/binana/>). Ван-дер-ваальсовы взаимодействия визуализировали средствами программы LigPlot (<http://ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>).

МД расчеты структурных комплексов потенциальных N6-миметиков с белком gp120 проводили с помощью программного пакета Amber 16 (<http://ambermd.org/>) [11] в силовом поле Amber (набор параметров ff10) с явным заданием растворителя (трехточечная модель воды TIP3P). Для параметризации лигандов использовали обобщенное силовое поле AMBER (<http://ambermd.org/>) [11]. Начальные координаты атомов водорода белка gp120 определяли с привлечением модуля xleap пакета AMBERTools 1.5 (<http://ambermd.org/>) [11]. Структурные комплексы лигандов с белком gp120 помещали в ячейку в форме усеченного октаэдра таким образом, чтобы наименьшее расстояние между ее гранями и атомами исследуемой системы превосходило 10 \AA , после чего свободное пространство заполняли молекулами воды. Перед проведением МД расчетов энергию структурного комплекса минимизировали методами наискорейшего спуска (500 шагов) и сопряженных градиентов (1000 шагов). Затем осуществляли нагрев системы от 0 до 310 К в течение 1 нс при постоянном объеме ячейки. На следующем шаге в течение 1 нс уравнивали давле-

ние в системе, установленное на значении 1 атм., посредством динамического изменения размеров ячейки (<http://ambermd.org/>) [11] с характерной частотой $2,0 \text{ пс}^{-1}$. На этапах нагрева и уравнивания давления накладывали дополнительные ограничения на положения атомов системы с помощью потенциала параболической формы с силовыми постоянными, равными соответственно 1,0 и 0,5 ккал/моль. Далее эти ограничения снимали и вновь подвергали систему релаксации в течение 2 нс в изобарно-изотермических условиях. МД моделирование проводили в два последовательных этапа. На первом этапе генерировали МД траектории комплексов длительностью 1 нс и методом MM-GB/SA [11] рассчитывали энтальпийные составляющие свободной энергии их образования, а затем отбирали надмолекулярные структуры с энтальпией связывания, меньшей чем у ингибиторов ВИЧ NBD-11021 [9] и DMJ-II-121 [10]. На втором этапе для отобранных комплексов выполняли расчет МД траекторий длительностью 30 нс в изобарно-изотермических условиях при температуре $T = 310 \text{ К}$ и давлении $P = 1,0 \text{ атм}$. Для контроля температуры использовали термостат Ланжевена (<http://ambermd.org/doc10/>) [11] с частотой столкновений $2,0 \text{ пс}^{-1}$. Контроль давления в ячейке осуществляли с помощью баростата Берендсена [11] с характерным временем 2,0 пс. Интегрирование уравнений движения Ньютона осуществляли с помощью алгоритма «leap-frog» (<http://ambermd.org/doc10/>) [11] с шагом интегрирования 2,0 фс. Для фиксации длин всех связей, в образовании которых участвуют атомы водорода, применяли алгоритм SHAKE (<http://ambermd.org/>) [11]. Максимальное расстояние, на котором учитывали невалентные взаимодействия, задавали равным 8,0 Å. Для расчета энергии электростатических взаимодействий использовали метод Эвальда [11].

Средние значения свободной энергии образования комплексов вычисляли с помощью метода MM-GB/SA, реализованного в программном пакете AMBER 16 [11]. 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 5 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 [11]. Энтропийный член свободной энергии связывания определяли с помощью модуля Nmode в программном пакете Amber 11 [11].

Результаты и их обсуждение. Виртуальный скрининг молекулярных библиотек веб-сервера Pharmit позволил идентифицировать 58 соединений, согласующихся с построенной моделью фармакофора МКА N6 (табл. 1) и характеризующихся отрицательными значениями энергии связывания. В результате уточнения комплексов этих соединений с белком gp120, выполненного методом молекулярной динамики во временном интервале 1 нс, были отобраны 15 надмолекулярных структур с более низкими значениями энтальпии связывания по сравнению с контрольными ингибиторами ВИЧ-1 NBD-11021 и DMJ-II-121, а последующие молекулярно-динамические расчеты длительностью 30 нс, проведенные для этих комплексов, выявили 6 соединений, более предпочтительных (относительно NBD-11021 и DMJ-II-121) в терминах свободной энергии их образования. Поэтому эти соединения были идентифицированы как наиболее вероятные пептидомиметики МКА N6. Информация о найденных веб-сервером Pharmit соединениях приведена в табл. 2, а на рис. 1 показаны их химические структуры.

Т а б л и ц а 2. Химические соединения – потенциальные пептидомиметики анти-ВИЧ антитела N6

T a b l e 2. Chemical compounds presenting potential peptidomimetics of the anti-HIV antibody N6

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	$C_{21}H_{39}N_9O_8$	545,598	-6,752	10	17
II	$C_{26}H_{40}N_2O_3$	428,617	4,47	3	5
III	$C_{29}H_{41}N_9O_6$	611,704	-1,158	8	15
IV	$C_{25}H_{34}N_6O_4$	482,59	-1,098	0	10
V	$C_{24}H_{45}N_4O_2$	421,65	6,047	3	5
VI	$C_{27}H_{38}N_6O_9S$	622,694	3,015	3	13

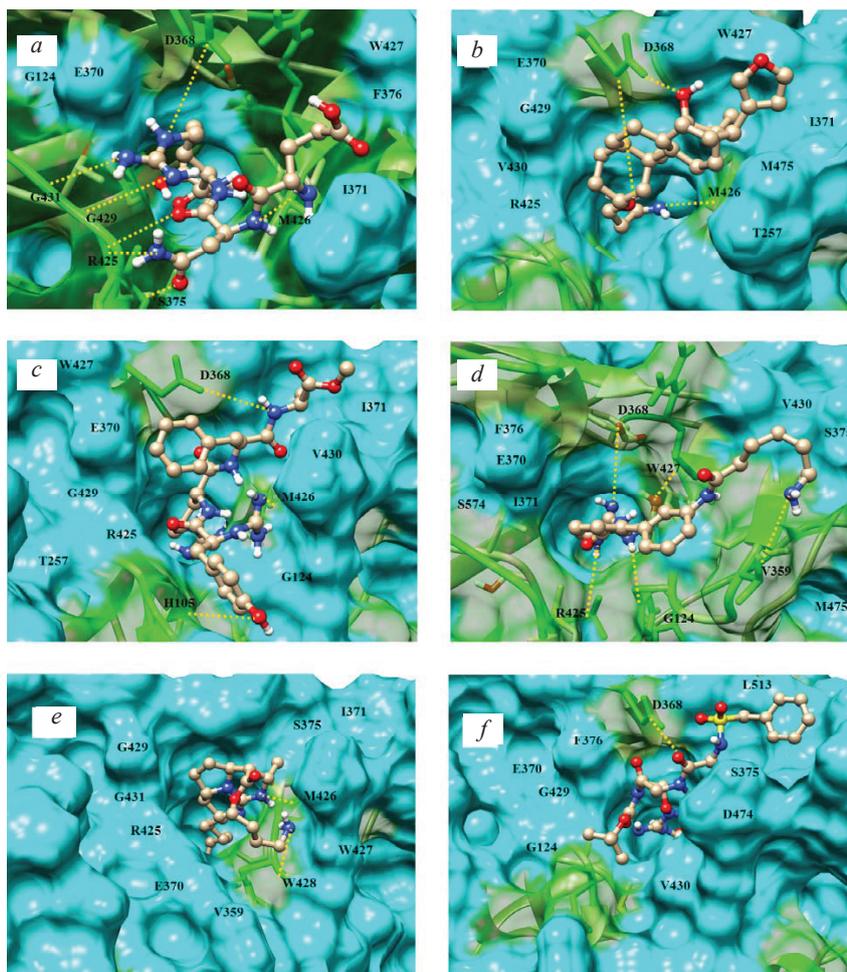


Рис. 2. Структурные комплексы соединений I (a), II (b), III (c), IV (d), V (e) и VI (f) с белком gp120 ВИЧ-1, построенные методом молекулярного докинга и уточненные на этапе их подготовки к МД расчетам. Соединения изображены с помощью молекулярной модели «шарик–палочка–шарик». Отмечены остатки белка gp120, образующие межатомные контакты с лигандами (табл. 3). Водородные связи показаны пунктирными линиями

Fig. 2. Structural complexes of compounds I (a), II (b), III (c), IV (d), V (e), and VI (f) with the HIV-1 gp120 protein generated by molecular docking and refined 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 interatomic contacts with the ligands are indicated (Table 3). Hydrogen bonds are shown by dotted lines

согласно которому прямое водородное связывание ингибитора ВИЧ (+)-DMJ-II-121 – функционального антагониста CD4 – с карбонильной группой остатка Met-426_{gp120} приводит к увеличению противовирусной активности по сравнению с ингибитором (+)-DMJ-I-228, который связывается с Met-426_{gp120} путем образования водородной связи, опосредованного водным окружением. Кроме того, водородные связи с отдельными лигандами формируют такие функционально важные остатки Phe⁴³-полости белка gp120, как Gly-429, Gly-431, Ser-375 (соединение I), Arg-425 (соединения I и IV), His-105 (соединение III), Gly-124 (соединение IV), Trp-427, Val-359 (соединение IV) и Trp-428 (соединение V) (табл. 3). Два соединения – лиганды I и III – образуют солевые мостики с остатками Arg-425_{gp120} и Glu-370_{gp120} соответственно (табл. 3).

Наряду с водородными связями, интерфейс структурных комплексов N6-миметиков с белком gp120 содержит большое число ван-дер-ваальсовых контактов, в формировании которых участвуют аминокислоты гидрофобной Phe⁴³-полости гликопротеина, ответственные за взаимодействие вируса с остатком Phe-43_{CD4} (табл. 3), который играет ключевую роль в присоединении ВИЧ к поверхности клетки-мишени [12]. Анализ расчетных данных показывает (табл. 3, рис. 3), что соединения I–V образуют прямые межатомные контакты с остатками Glu-370, Ile-371, Arg-

Таблица 3. Межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся в структурных комплексах потенциальных N6-миметиков с белком gp120

Table 3. Intermolecular interactions appearing in the structural complexes of the potential N6-mimetics with the gp120 protein

Лиганд Ligand	Водородная связь ¹ Hydrogen bond ¹	Ван-дер-ваальсовы контакты ² Van der Waals contacts ²	Солевые мостики ³ Salt bridges ³
I	NH*...O[M426], NH**...O[G429], NH***...N[G431], OH*...N[R425], NH [■] ...O[R425], OH**...O[S375], N*...HO[D368]	E370(7), W427(12), R425(3), G124(3), F376(2), I371(2), D368(4)	COO...R425
II	NH*...O[D368], NH**...O[M426], O*...HO[D368]	R425(7), V430(4), I371(5), G429(3), E370(6), T257(1), W427(4), M475(2)	–
III	NH*...O[M426], OH*...N[H105], N*...HO[D368]	G429(3), R425(2), G124(2), V430(2), I371(2), D368(4), E370(5), W427(3), T257(2)	CNN...E37
IV	NH*...O[G124], NH**...O[R425], OH*...N[W427], NH***...O[V359], N [■] ...HO[D368]	E370(8), I371(1), R425(1), V430(2), G124(2), W427(6), M475(3), V359(1), S574(1), S375(2), F376(2)	–
V	NH*...O[M426], NH**...N[W428]	R425(3), I371(3), G431(1), G429(1), E370(9), W427(16), V359(5), S375(1)	–
VI	O*...HO[D368]	G429(1), D474(2), V430(4), L513(3), G124(2), E370(4), S375(3), F376(5)	–

Примечания: ¹ – первыми указаны атомы молекулы лиганда, а вторыми – атомы аминокислотных остатков gp120 (приведены в квадратных скобках в однобуквенном коде); ² – аминокислотные остатки gp120, формирующие ван-дер-ваальсовы контакты с лигандами. В скобках указано число контактов; ³ – для солевых мостиков первыми приведены функциональные группы лигандов, а вторыми – аминокислотные остатки белка gp120.

Notes: ¹ – atoms of the ligands are shown first, followed by the corresponding atoms of gp120 (the residues of aromatase are in brackets in one-letter code); ² – amino acids of gp120 forming van der Waals contacts with the ligands. The number of contacts is given in brackets; ³ – for salt bridges, the functional groups of ligands are shown first, followed by the residues of gp120.

425 и Trp-427 белка gp120, доминирующими в связывании вируса с молекулой CD4. При этом отдельные лиганды формируют ван-дер-ваальсовы контакты с другими функционально важными аминокислотами белка gp120, такими как Gly-124 (соединения I, III, IV, VI), Phe-376 (соединения I, IV, VI), Val-430 (соединения II, III, IV, VI), Gly-429 (соединения II, III, V, VI), Thr-257 (соединения II, III), Met-475 (соединения II, IV), Val-359 (соединения IV, V), Ser-375 (соединения IV, V, VI), Ser-574 (соединение IV), Phe-376 (соединения IV, VI), Gly-431 (соединение V), Val-359 (соединение V), Asp-474 (соединение VI) и Leu-513 (соединение VI) (табл. 3, рис. 3).

Необходимо отметить, что большинство аминокислот белка gp120, образующих межмолекулярные контакты с идентифицированными соединениями, входит в состав интерфейса комплекса gp120/CD4 и имитирует взаимодействия, ключевые для связывания МКА N6 с гликопротеином оболочки вируса. Так, согласно данным рентгеноструктурного анализа [12], взаимодействия аминокислотных остатков Phe-43 и Arg-59 молекулы CD4 с консервативными остатками Asp-368, Glu-370 и Trp-427 белка gp120 являются критическими для связывания ВИЧ-1 с рецептором CD4. При этом Phe-43_{CD4} погружается в Phe⁴³-полость CD4-связывающего участка белка gp120 и взаимодействует с остатками Asp-368, Glu-370, Ile-371, Asn-425, Met-426, Trp-427 и Gly-473, на долю которых приходится 23 % от общего числа контактов ВИЧ-1 с рецептором CD4, а остаток Arg-59_{CD4} формирует две водородные связи с Asp-368_{gp120} [12]. Именно эти взаимодействия обеспечивают прочное связывание белка gp120 ВИЧ-1 с первичным рецептором CD4 [12]. Аналогичный CD4 механизм связывания с белком gp120 реализуется для кросс-реактивного антитела N6 [6] и идентифицированных на его основе пептидомиметиков, имитирующих ключевые взаимодействия этого иммуноглобулина с Phe⁴³-полостью CD4-связывающего сайта оболочки вируса (рис. 2, табл. 3).

Эффективность межмолекулярных взаимодействий потенциальных N6-миметиков с белком gp120 подтверждают значения констант диссоциации (K_d) (табл. 4), вычисленные для комплексов лиганд/gp120 с помощью оценочной функции NNScore 2.0 (<http://rocce-vm0.ucsd.edu/data/sw/>

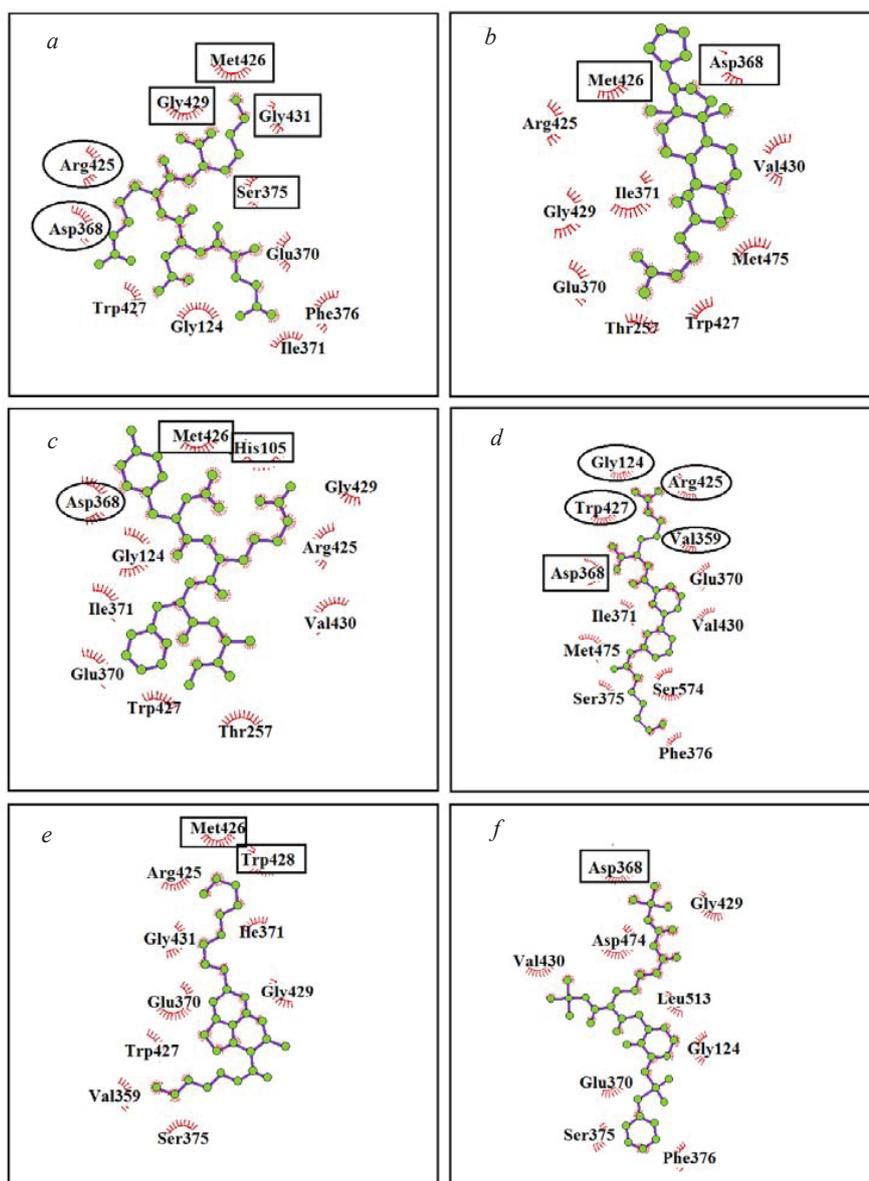


Рис. 3. Аминокислотные остатки белка gp120, формирующие ван-дер-ваальсовы контакты и водородные связи с соединениями I (a), II (b), III (c), IV (d), V (e) и VI (f). Эллипсом выделены остатки, вовлеченные как в водородное связывание, так и в ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Прямоугольником отмечены аминокислоты, участвующие в образовании только водородных связей

Fig. 3. The gp120 residues forming van der Waals contacts and hydrogen bonds with compounds I (a), II (b), III (c), IV (d), V (e), and VI (f). Residues involved both in hydrogen bonding and van der Waals interactions are marked by ellipses. Amino acids forming only hydrogen bonds are highlighted by rectangles

hosted/nnscore/), разработанной на основе метода машинного обучения с использованием 20 нейронных сетей и предназначенной для предсказания высокоаффинных низкомолекулярных лигандов. Низкие значения K_d , варьирующие в интервале от 0,185 до 1,930 мкМ (табл. 4), свидетельствуют о высоком средстве идентифицированных соединений с CD4-связывающим сайтом белка gp120. Этот вывод согласуется с данными о средних значениях свободной энергии образования комплексов лиганд/gp120 (табл. 5), рассчитанных на основе анализа их молекулярно-динамических траекторий. Из данных табл. 5 видно, что обнаруженные в базах данных веб-сервера Pharmit лиганды характеризуются низкими величинами свободной энергии связывания с молекулярной мишенью. Следует, однако, отметить, что все вычислительные подходы к оценке энер-

гии межмолекулярных взаимодействий используют различные приближения, которые варьируют от упрощенных форм уравнений до приближений, ограничивающих размер системы и фундаментальных приближений в уравнениях, необходимых для решения задачи. Тем не менее, точность метода MM-GB/SA [11] дает основание предполагать, что лиганды I–IV проявляют более высокую аффинность связывания с белком gp120 по сравнению с ингибиторами NBD-11021 и DMJ-II-121, а значения величин свободной энергии для лигандов V и VI по крайней мере сопоставимы с соответствующими параметрами, предсказанными для этих контрольных соединений. При этом значения энергии связывания для соединений V и VI сопоставимы с величиной $-9,5 \pm 0,1$ ккал/моль, измеренной для комплекса CD4/gp120 методом изотермической титрационной калориметрии (табл. 5) [15].

Т а б л и ц а 4. Значения констант диссоциации, вычисленные для комплексов потенциальных миметиков антитела N6 с белком gp120 ВИЧ-1 с помощью оценочной функции NNScore 2.0

Table 4. The values of dissociation constants calculated for the complexes of the potential mimetics of antibody N6 with gp120 using NNScore 2.0 scoring function

Лиганд	I	II	III	IV	V	VI
K_d (мкМ)	0,185	0,213	1,125	1,589	1,621	1,930

Т а б л и ц а 5. 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}

Table 5. Mean values 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	-54,87	7,12	-27,66	9,08	-27,20	11,54
II	-41,62	5,92	-17,57	5,54	-24,05	8,11
III	-48,09	5,25	-26,87	8,09	-21,23	9,64
IV	-43,01	10,54	-24,78	7,72	-18,24	13,07
V	-39,22	4,53	-24,64	8,95	-14,59	10,03
VI	-39,59	5,75	-25,20	8,82	-14,38	10,53
DMJ-II-121	-38,81	3,83	-26,42	8,94	-12,39	9,72
NBD-11021	-32,17	6,02	-19,87	6,09	-12,30	8,56

Пр 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.

Note: $\langle \Delta H \rangle$ 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.

Заключение. Анализ полученных результатов показывает, что 6 химических соединений (рис. 1), обнаруженных в молекулярных библиотеках веб-сервера Pharmit, способны имитировать фармакофорные свойства Fab-фрагмента МКА N6 путем специфических и эффективных взаимодействий с участком белка gp120 ВИЧ-1, критическим для связывания вируса с клеточным рецептором CD4. При этом ключевую роль играют многочисленные ван-дер-ваальсовы контакты лигандов с остатками Phe⁴³-полости gp120, ответственными за взаимодействие ВИЧ-1 с Phe-43_{CD4}, а также водородные связи с остатком Asp-368_{gp120}, образование которых увеличивает аффинность связывания без активации нежелательного аллостерического эффекта [10]. По данным молекулярной динамики, комплексы этих лигандов с белком gp120 энергетически стабильны и характеризуются более низкими значениями свободной энергии связывания с белком gp120 по сравнению с известными ингибиторами NBD-11021 и DMJ-II-121, использованными в расчетах в качестве контрольных соединений.

Идентифицированные соединения могут быть использованы в работах по созданию новых противовирусных препаратов – ингибиторов проникновения ВИЧ-1, блокирующих ранние стадии развития ВИЧ-инфекции.

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 Fundamental Research (project X18КИ-002) and the National Natural Science Foundation of China (project 84630090) within the cooperation and exchange Program.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Arts, E. J. HIV-1 antiretroviral drug therapy / E. J. Arts, D. J. Hazuda // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2012. – Vol. 2, N 4. – P. a007161. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161>
2. 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>
3. Wang, H.-B. HIV vaccine research: The challenge and the way forward / H.-B. Wang, Q.-H. Mo, Z. Yang // *J. Immunol. Res.* – 2015. – Vol. 2015. – Art. 503978. <https://doi.org/10.1155/2015/503978>
4. Barouch, D. H. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine / D. H. Barouch // *Nature.* – 2008. – Vol. 455, N 7213. – P. 613–619. <https://doi.org/10.1038/nature07352>
5. 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>
6. 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>
7. Sunseri, J. Pharnit: interactive exploration of chemical space / J. Sunseri, D. R. Koes // *Nucl. Acids Res.* – 2016. – Vol. 44. – P. W442–W448. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw287>
8. 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>
9. Structure-based design of a small molecule CD4-antagonist with broad spectrum anti-HIV-1 activity / F. Curreli [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 58, N 17. – P. 6909–6927. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00709>
10. 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>
11. AMBER 16 / D. A. Case [et al.]. – San Francisco, 2016.
12. 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>
13. 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.
14. 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>
15. 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. Arts E. J., Hazuda D. J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012, vol. 2, no. 4, pp. a007161. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161>
2. 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>
3. Wang H.-B., Mo Q.-H., Yang Z. J. HIV vaccine research: The challenge and the way forward. *Journal of Immunology Research*, 2015, vol. 2015, art. 503978. <https://doi.org/10.1155/2015/503978>
4. Barouch D. H. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature*, 2008, vol. 455, no. 7213, pp. 613–619. <https://doi.org/10.1038/nature07352>
5. Mann J. K., Ndung'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>
6. 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., Kwong P. D., Connors M. Identification of a CD4-binding-site antibody to HIV that evolved near-pan neutralization breadth. *Immunity*, 2016, vol. 45, no. 5, pp. 1108–1121. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.027>
7. Sunseri J., Koes D. R. Pharnit: interactive exploration of chemical space. *Nucleic Acids Research*, 2016, vol. 44, pp. W442–W448. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw287>
8. 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>
9. Curreli F., Kwon Y. D., Zhanga H., Scacalossi D., Belov D. S., Tikhonov A. A., Andreev I. A., Altieric A., Kurkin A. V., Kwong P. D., Debnath A. K. Structure-based design of a small molecule CD4-antagonist with broad spectrum anti-HIV-1 activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, vol. 58, no. 17, pp. 6909–6927. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00709>

10. 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>

11. 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.

12. 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>

13. 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.

14. 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>

15. 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

Андреанов 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.

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, Sarganov 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.

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, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tuzikov@newman.bas-net.by.