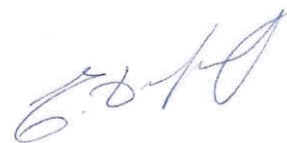


На правах рукописи



Дуева Евгения Владимировна

**РАЗРАБОТКА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНГИБИТОРОВ
РЕПРОДУКЦИИ ПЕРЕНОСИМЫХ КЛЕЩАМИ ФЛАВИВИРУСОВ**

02.00.16 — Медицинская химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в лаборатории медицинской химии кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в лаборатории структурной вирусологии ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова».

Научный руководитель: **Палюлин Владимир Александрович**, к.х.н., с.н.с., зав. лабораторией медицинской химии кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный консультант: **Козловская Любовь Игоревна**, к.б.н., зав. лабораторией вирусологии полиомиелита и других энтеровирусных инфекций – референс-центра ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова»

Официальные оппоненты: **Брель Валерий Кузьмич**, профессор, д.х.н., зав. лаб. фосфорорганических соединений ФГБНУ Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова Российской академии наук

Гудашева Татьяна Александровна, член-корр. РАН, к.х.н., д.б.н., зав. отделом химии лекарственных средств ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Ведущая организация: ФГБНУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита состоится 21 декабря 2016 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета Д 501.001.69 при МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.3, Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, ауд. 446. С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27 и на сайте Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова <http://www.chem.msu.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.69
доктор химических наук, профессор



Т.В. Магдесиева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Заболевания, вызываемые представителями рода *Flavivirus*, наиболее известными из которых являются вирусы денге (ДНГВ), лихорадки Западного Нила (ВЛЗН), жёлтой лихорадки, японского энцефалита, клещевого энцефалита (ВКЭ), вирус Зика и другие, представляют серьезную проблему для здравоохранения. Они широко распространены по всему миру, особенно в тропических регионах, и переносятся комарами или клещами. На данный момент не существует препаратов, которые бы использовались для специфического лечения флавивирусных инфекций.

Для России наиболее актуальной является проблема клещевого энцефалита (КЭ): на территориях, эндемичных по КЭ, проживает порядка 64 млн. человек, ежегодно количество случаев заболевания КЭ в России достигает 3 000. Помимо этого, имеются сочетанные очаги ВКЭ и других флавивирусов, к примеру, ВЛЗН или вируса Повассан (ПОВ). Наиболее эффективным методом борьбы с КЭ является своевременная вакцинация, однако уровень вакцинирования населения РФ по-прежнему остается низким, а заболеваемость КЭ растет в некоторых регионах. На данный момент помимо терапии специфическим иммуноглобулином, применение которого сопряжено со многими сложностями, не представлено препаратов с доказанной эффективностью для лечения КЭ. Таким образом, существует необходимость в разработке новых подходов и препаратов для лечения КЭ и других заболеваний, вызываемых близкородственными флавивирусами.

Наиболее изученными в отношении антифлавивирусной активности среди низкомолекулярных соединений являются аналоги нуклеозидов, действующие на процесс репликации вируса и ингибирующие активность вирусной РНК-полимеразы. Тем не менее, к настоящему моменту ни один из представителей этого класса не введен в клиническую практику для лечения флавивирусных инфекций. Большинство исследований направлено на изучение активности малых молекул против переносимых комарами флавивирусов, в частности ДНГВ, и лишь единичные работы посвящены их исследованию в отношении флавивирусов, переносимых клещами. На сегодняшний день известно крайне малое количество соединений, действующих на другие белки и стадии жизненного цикла флавивирусов. Одним из перспективных направлений

является поиск ингибиторов слияния флавивирусов, действующих на растворимые эктодомены вирусных белков оболочки sE.

Целью работы являлась разработка низкомолекулярных ингибиторов репродукции ВКЭ и ПОВ, связывающихся с белком E оболочки флавивирусов и действующих на стадию слияния вирусной и клеточной мембран. Для этого в работе были поставлены и решены следующие основные **задачи**:

- моделирование структуры белков оболочки sE флавивирусов;
- виртуальный скрининг библиотек низкомолекулярных соединений для отбора потенциальных ингибиторов слияния флавивирусов;
- молекулярный дизайн структур потенциальных ингибиторов слияния флавивирусов, основанный на знании структуры мишени;
- определение цитотоксичности и ингибиторной активности отобранных соединений против репродукции ВКЭ и ПОВ в культуре клеток;
- определение стадии жизненного цикла вирусов, на которую влияют идентифицированные соединения;
- анализ механизма ингибирования репродукции методом молекулярной динамики;
- анализ взаимодействий ингибиторов репродукции флавивирусов с белками sE и анализ взаимосвязи между структурами этих низкомолекулярных соединений и их противовирусной активностью;
- исследование специфичности действия ингибиторов репродукции ВКЭ по отношению к различным штаммам вируса.

Научная новизна. В ходе работы впервые были построены модели пространственной структуры белков оболочки sE ВКЭ и ПОВ. Была разработана методика экспериментального скрининга низкомолекулярных соединений для выявления ингибиторной активности в отношении ВКЭ и ПОВ в культуре клеток и разработаны методики исследования механизма действия ингибиторов. Были идентифицированы ингибиторы репродукции ВКЭ и ПОВ, обладающие высокой противовирусной активностью, принадлежащие различным классам химических соединений (1,4-дигидропиридины, 1,3,5-тиадиазины и 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксиды). Исследованы соотношения между структурой идентифицированных ингибиторов репродукции и их противовирусной активностью. Экспериментально показан широкий спектр

активности 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов против различных штаммов ВКЭ, относящихся ко всем известным подтипам. На примере этих соединений впервые продемонстрирована возможность ингибировать репродукцию ВКЭ разных штаммов и подтипов.

Механизм противовирусного действия предложенных ингибиторов был исследован *in vitro* и при помощи сравнительного моделирования молекулярной динамики различных форм белков оболочки sE. Моделирование молекулярной динамики позволило прояснить механизм действия ингибиторов репродукции флавивирусов. Установлено изменение конформационной подвижности димеров белков sE при связывании с молекулами ингибитора. Экспериментально подтверждена гипотеза о взаимодействии ингибиторов с поверхностью вирионов на стадии их проникновения в клетку.

Впервые выявлены новые факторы, влияющие на результат определения активности соединений, действующих на белки оболочки вирусов. Показано влияние белка sE, не задействованного в формировании инфекционных вирионов, на величину активности ингибиторов репродукции.

Практическая значимость работы. Полученные в ходе работы модели пространственной структуры белков оболочки sE ВКЭ и ПОВ позволили впервые проводить основанный на знании структуры биомишени дизайн ингибиторов слияния флавивирусов, переносимых клещами. Данные о структурах и способах связывания с белком sE идентифицированных низкомолекулярных соединений, обладающих противовирусной активностью, могут быть применены для дальнейшего поиска новых ингибиторов репродукции флавивирусов методами, основанными на знании структур лигандов, что было невозможно до нашей работы.

Разработанные методики экспериментального скрининга и исследования механизма действия низкомолекулярных соединений *in vitro* в отношении ВКЭ и ПОВ могут применяться для других родственных вирусов.

Выявленное в ходе работы влияние содержания белка E, не задействованного в формировании инфекционных вирионов, на определение величин активности ингибиторов репродукции необходимо учитывать при подготовке и характеристике вирусных препаратов для тестирования соединений, действующих на белки оболочки, и при сравнении их активностей.

Полученная в ходе моделирования молекулярной динамики информация о влиянии лигандов на конформационную подвижность белков sE важна для детального понимания процесса слияния и конформационного поведения белков оболочки.

Личный вклад автора состоит в анализе литературы, постановке локальных задач, планировании стратегии и дизайна экспериментов, интерпретации и обобщении полученных результатов, подготовке материалов к публикации, представлении полученных результатов на конференциях. Автором проведено моделирование структур белков оболочки sE, моделирование и анализ траекторий молекулярной динамики, докинг и дизайн структур потенциальных низкомолекулярных ингибиторов слияния и биологические испытания цитотоксичности и активности 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов, исследование механизма действия соединений.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на следующих российских и международных конференциях: XIX Национальный конгресс «Человек и лекарство» (2012, Москва); 26-й Семинар по молекулярному моделированию (2012, Эрланген, Германия); 12-й Международный симпозиум по болезням, переносимым клещами, в Йене (2013, Веймар, Германия); 6-я Объединенная конференция по хемоинформатике в Шеффилде (2013, Шеффилд, Великобритания); 1-я Российская конференция по медицинской химии MedChemRussia (2013, Москва); российская конференция с международным участием «Современные проблемы клещевого энцефалита» (2013, Москва); 34-я Европейская школа по медицинской химии (2014, Урбино, Италия); 7-й Международный симпозиум по теоретической биофизике TheoBio (2015, Кальяри, Италия); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015» (2015, Москва); 21-й Европейский симпозиум по количественным соотношениям «структура – активность» EuroQSAR (2016, Верона, Италия); 4-й Конгресс по противовирусным средствам Antivirals (2016, Ситжес, Испания).

Публикации. По результатам работы опубликовано 3 научных статьи в зарубежных журналах, индексируемых международными системами цитирования (Web of Science, Scopus, PubMed) и 11 тезисов докладов российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 130 страницах и содержит 23 таблицы и 48 рисунков. Библиографический указатель включает в себя 266 источников литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Флавивирусы являются оболочечными вирусамии. На начальных этапах инфекции в результате слияния вирусной и клеточной мембран происходит проникновение вирусного генетического материала в цитоплазму клетки, где может быть инициирован процесс репликации. Для слияния двух мембран требуется участие белков Е оболочки флавивирусов. Под действием низкого рН эндосом происходит необратимая конформационная перестройка белков Е из метастабильных димеров (рис. 1А) в шипообразные тримеры, атакующие мембрану клетки хозяина. В результате дальнейших конформационных перестроек образуется пора, соединяющая липидные мембраны эндосомы и флавивируса, через которую вирусная РНК попадает в клетку.

В базе белковых структур PDB имеются кристаллографические данные об атомной структуре растворимого эктодомена белка Е оболочки (sE) ДНГВ с открытым гидрофобным карманом между доменами I и II (рис. 1Б), в котором связана малая молекула детергента (код доступа 1ОКЕ), для некоторых других флавивирусов также имеются рентгеноструктурные данные о белках sE, но лишь с закрытым карманом. В результате докинга библиотек низкомолекулярных соединений в открытый карман sE ДНГВ, были найдены соединения, ингибирующие репродукцию флавивирусов, переносимых комарами, вероятно, путем предотвращая слияния вирусной и клеточной мембран. Эти соединения называются *ингибиторами слияния флавивирусов*. Терапевтическое применение таких ингибиторов могло бы иметь лечебный эффект за счет снижения вирусной нагрузки на начальных этапах инфекции. До проведения настоящей работы в литературе не было данных о подобных соединениях для флавивирусов, переносимых клещами.

Материалы и методы

Для достижения цели работы использовались такие методы, как моделирование структуры белков по гомологии, молекулярный докинг, моделирование молекулярной динамики, дизайн низкомолекулярных соединений с заданными свойствами, исследование соотношений между химическими структурами и активностью, определение активности соединений против флавивирусов методом ингибирования образования бляшек и фокусов, определение цитопатического действия фотометрическим методом, иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Результаты и их обсуждение

Глава 1. Моделирование структуры белков sE

Для проведения виртуального скрининга библиотек низкомолекулярных соединений с целью поиска потенциальных ингибиторов слияния ВКЭ и ПОВ, действующих на белки sE, необходимо наличие структур sE с открытой формой кармана. В базе PDB имеются кристаллографические данные лишь об атомной структуре sE ВКЭ с закрытым карманом (код доступа 1SVB), для вируса Повассан они отсутствуют вовсе. Ввиду этого были построены модели открытых форм белков sE ВКЭ и ПОВ по гомологии с открытой формой белка sE ДНГВ (код доступа 1OKE), а также модель закрытой формы sE ПОВ.

На первой стадии было построено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей шаблонных и моделируемых белков. Идентичность аминокислотных последовательностей sE варьируется от 30% между ДНГВ и ПОВ до 63% между ВКЭ и ПОВ, для ДНГВ и ВКЭ эта величина составляет 36%. Идентичность последовательностей порядка 20% является нижней границей применимости метода моделирования по гомологии.

Как можно предполагать из моделирования по гомологии, полученные модели sE имеют все структурные особенности эктодоменов E флавивирусов. Они обладают тремя четко выраженными доменами, преобладающей вторичной структурой в которых являются β -листы. Форма и размер моделей также очень близки к форме и размерам структур-шаблонов.

Результаты оценки в программах PROCHECK и ProSa, свидетельствуют о высоком стереохимическом качестве полученных моделей.

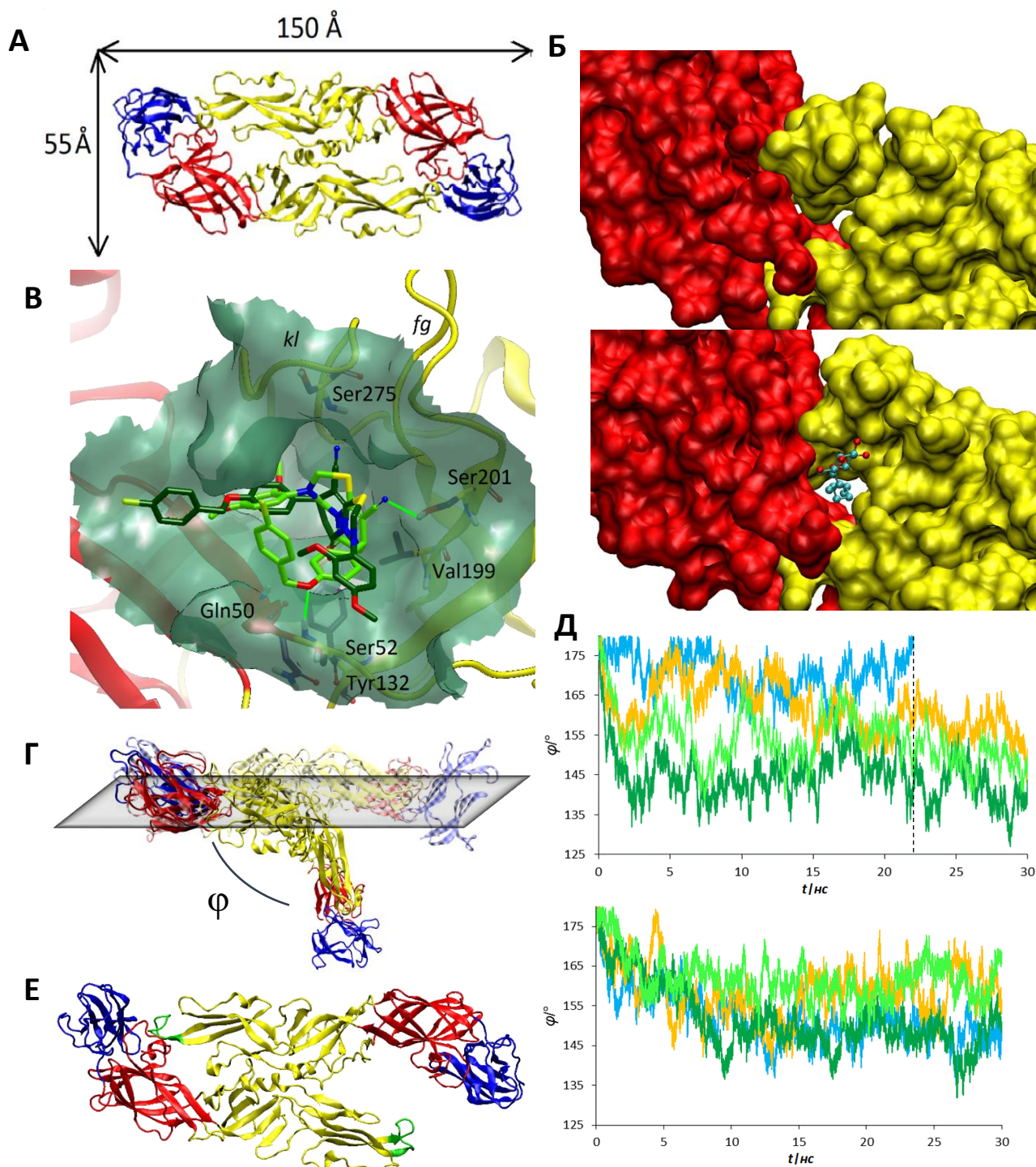


Рисунок 1. **А)** Укладка полипептидной цепи ВКЭ sE в димере. Красным окрашен центральный первый домен, желтым – второй, синим – третий. **Б)** Карман связывания малых молекул белка sE в закрытой (сверху) и открытой форме в комплексе с детергентом (снизу). **В)** Способы связывания (R)-55 (салатовый) и (S)-55 (зеленый) в кармане sE ПОВ по результатам докинга. **Г)** Изгибание структуры димера sE в процессе моделирования МД. Выравнивание по доменам I и III первой субъединицы димера начальной структуры и структуры с наименьшим углом φ системы R_H^0 (угол φ тупой и уменьшается при изгибании). **Д)** Диссоциация петли слияния (зеленый) и домена III соседней субъединицы в $aro_c_H^0$. **Е)** Изменение угла φ во времени: сверху – при нейтральном pH (пунктиром отмечен момент диссоциации димера в системе $aro_c_H^0$); снизу – при низком pH. Голубые графики соответствуют закрытой форме sE, оранжевые – открытой, темно-зеленые – комплексу с (R)-55, светло-зеленый график – комплексу с (S)-55.

Область связывания детергента в структуре 1ОКЕ представляет собой вытянутый гидрофобный канал с широким входом, который располагается на внешней стороне белка (по отношению к поверхности вириона) и сильно сужающимся у внутренней стороны белка. Соответствующие полости моделей белков sE ВКЭ и ПОВ по форме схожи с сайтом связывания детергента ДНГВ, но канал в них, в отличие от последнего, практически закрыт со стороны, прилегающей к липидной оболочке вириона, а входы в карман более широкие. Также эти каналы нельзя назвать гидрофобными со всей строгостью, поскольку в них присутствует больше гидрофильных остатков, чем в структуре 1ОКЕ.

Глава 2. Производные 1,4-дигидропиридина и 1,3,5-тиадиазина как ингибиторы ВКЭ и ПОВ

Для поиска низкомолекулярных соединений – потенциальных ингибиторов слияния флавивирусов, переносимых клещами, в программе FRED проводился докинг в карман модели белка sE ПОВ библиотеки низкомолекулярных органических гетероциклических соединений ХимЭкс, содержащей 5886 соединений.

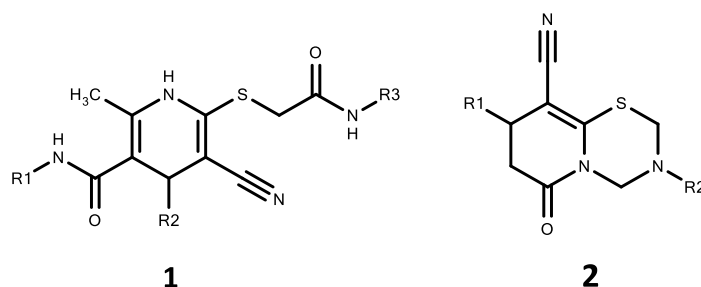
Из списков 500 соединений с наилучшими способами связывания по оценкам 6 функций программы FRED конечный хит-лист формировался путем отбора соединений, вошедших в по крайней мере 3 списка, и соединений с наилучшими оценками каждой функции. Таким образом было отобрано 201 соединение. При последующем визуальном анализе результатов с целью избежать структур, формирующих нежелательные взаимодействия (такие как водородные связи донор – донор или акцептор – акцептор), и отбросить соединения, принадлежащие к плохо представленным в выборке классам, было отобрано 89 соединений, 12 из которых относились к классу 1,3,5-тиадиазинов, а остальные – к классу 1,4-дигидропиридинов. Для отобранных соединений было проведено предварительное определение активности методом ингибирования образования бляшек либо фокусов¹ против ВКЭ штамма Абсеттаров и ПОВ

¹ Бляшкообразующая единица (БОЕ), бляшка – область клеточного монослоя, убитая вирусом и не окрашиваемая витальными красителями. Фокусообразующая единица (ФОЕ), фокус – это область заражённого клеточного монослоя, окрашенная антителами к вирусу. Одна бляшка или фокус соответствует потомству одной вирусной частицы.

штамма Повассан 24 соответственно при концентрации 10 мкМ. Для 7 соединений, подавивших образование 50% и более бляшек или фокусов в этом тесте, было проведено определение цитотоксичности (CC₅₀) и значений EC₅₀.

Значения CC₅₀ острой (24 часа) и хронической (7 дней) токсичности по отношению к культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) для соединений оказались выше 10 мкМ, что было расценено приемлемым для первых соединений в классе (табл. 1).

Таблица 1. Цитотоксичность и ингибиторная активность соединений в отношении репродукции ВКЭ штамма Абсеттаров и ПОВ штамма Повассан 24.



Центральный фрагмент	R1	R2	R3	№	CC ₅₀ , мкМ		EC ₅₀ , мкМ	
					24 ч.	7 д.	ВКЭ	ПОВ
1	4-ClC ₆ H ₄	Ph	3-MeC ₆ H ₄	50	>250	41	2,0 ± 0,4	>10
			4-PhOC ₆ H ₄	51	>250	38	2,8 ± 0,6	>10
	4-MeOC ₆ H ₄	2-фурил	4- <i>n</i> BuC ₆ H ₄	52	64	14	2,5 ± 0,5	>10
2	4-BnOC ₆ H ₄	4- <i>n</i> BuC ₆ H ₄	—	53	>250	35	1,9 ± 0,4	>10
	4-BnO-3-MeOC ₆ H ₃	4-MeOC ₆ H ₄		54	>250	53	0,09 ± 0,01	>10
	4-(4-ClC ₆ H ₄ CH ₂ O)C ₆ H ₄	2,4-(MeO) ₂ C ₆ H ₃		55	109	39	0,07 ± 0,02	1,3 ± 0,1
	3-BnOC ₆ H ₄	2-EtOC ₆ H ₄		56	>250	116	2,6 ± 0,4	2,2 ± 0,3

Соединения проявили дозозависимое ингибирование вирусной репродукции. Представители класса 1,4-дигидропиридинов проявили активность против ВКЭ в микромолярном диапазоне. Несмотря на гораздо меньшую представленность 1,3,5-триадиозинов, они в целом были более активны: **54** и **55** обладают EC₅₀ 90 и 70 нМ соответственно, при этом соединения **55** и **56** подавляют репродукцию и ВКЭ, и ПОВ, несмотря на различия в аминокислотном составе белков.

При пороговом значении EC₅₀ = 10 мкМ по результатам докинга наблюдаются схожие ориентации и активных, и неактивных соединений в карманах sE. Соединения испытывались в виде рацемических смесей, для

каждого стереоизомера можно выделить такие способы связывания с белками, которые будут характерны для всех соединений класса с соответствующей конфигурацией хирального центра. К примеру, в случае ПОВ соединение **55** докируется таким образом, что (*R*)-**55** образует водородные связи с Ser201 и Ser52, а его бициклическое ядро образует ван-дер-ваальсовы контакты с Val199, в то время как (*S*)-**55** не образует водородных связей с аминокислотными остатками белка (рис. 1В). В кармане sE ВКЭ (*R*)-**55** также способен формировать водородную связь в отличие от (*S*)-энантиомера. Использование порога в 10 мкМ для отнесения соединения к активным оказалось весьма жестким критерием при использовании метода ингибирования образования бляшек или фокусов. Поэтому с целью более детального изучения взаимосвязей между структурой и противовирусной активностью в последующих испытаниях пороговой была принята концентрация в 50 мкМ.

Механизм антифлавивирусной активности соединения **55** был изучен путем анализа влияния порядка добавления соединения и инфицирования клеток («time-of-addition») на значение EC₅₀. В дополнение к стандартному тесту по ингибированию образования 50% фокусов ПОВ, в котором вирус предварительно инкубируется с раствором изучаемого соединения, а затем добавляется к клеткам, были выполнены два дополнительных эксперимента: соединения добавлялись к клеткам за 1 час до или через час после инфицирования. В этих модификациях эксперимента соединение не продемонстрировало активности. Дозозависимый эффект наблюдался лишь в стандартном тесте с предварительным инкубированием вируса и вещества перед инфицированием клеток. Следовательно, наиболее вероятно, что противовирусное действие является результатом взаимодействия **55** с поверхностью вириона на стадии его проникновения в клетку, но не на более поздних стадиях или в результате взаимодействия соединений с поверхностью клеток. Это является доводом в пользу изначальной гипотезы о взаимодействии исследуемых соединений с белками оболочки sE.

Специфичность взаимодействия соединения **55** с флавивирусами была также исследована путем определения его активности в отношении неродственного безоболочечного вируса полиомиелита первого типа в клетках человеческой мышечной рабдомиосаркомы. Соединение не проявило

активности в концентрации 50 мкМ, что является еще одним указанием на специфичность взаимодействия **55** с оболочкой флавивирусов.

Глава 3. Моделирование молекулярной динамики

Для выяснения деталей взаимодействия ингибитора репродукции **55** и димера белка оболочки sE ПОВ было проведено моделирование молекулярной динамики. Изучались два состояния протонирования белка sE: соответствующее зрелому вириону при pH ~ 7 (остатки гистидина не заряжены) и состояние готовности к слиянию при pH ~ 6 (остатки гистидина протонированы и заряжены положительно). Рассматривались два состояния кармана связывания β -OG, а также оба энантиомера соединения **55** для выяснения возможного преимущества одного из энантиомеров. Для каждой системы были собраны траектории МД в неявно заданном растворителе длительностью 30 нс.

Таблица 2. Параметры систем, для которых проводилось моделирование МД.

Состояние карманов sE	Заряд остатков His	Обозначение
Закрытый	0	apo_c_H ⁰
Закрытый	+1	apo_c_H ⁺
Открытый	0	apo_o_H ⁰
Открытый	+1	apo_o_H ⁺
Комплекс с (R)- 55	0	R_H ⁰
Комплекс с (R)- 55	+1	R_H ⁺
Комплекс с (S)- 55	0	S_H ⁰
Комплекс с (S)- 55	+1	S_H ⁺

Главным видимым компонентом движения во всех системах является изгибание, которое происходит вследствие вращения домена II относительно доменов I и III в плоскости, перпендикулярной плоскости димера (рис. 1Г).

Начиная с практически плоской конформации ($\varphi = 176^\circ$), димеры sE изгибаются в разной степени (рис. 1Д). В условиях нейтрального pH амплитуда изгибания меньше для систем без лигандов по сравнению с комплексами. Наибольшие изменения угла наблюдаются в системе R_H⁰, в которой значение φ достигает 127° . В наименьшей степени изгибается структура с закрытым карманом apo_c_H⁰. Димеры sE ПОВ с протонированными остатками гистидина изгибаются так же, как димеры при нейтральном pH. Разница амплитуд между формами с ингибитором и без него при низком pH становится менее выраженной. Однако и с нейтральными, и заряженными остатками гистидина димеры sE в комплексе с (R)-**55** в среднем изгибаются в большей степени, чем с

(S)-55.

Таким образом, связывание с лигандом приводит к увеличению конформационной подвижности белка sE, что в предыдущих работах по моделированию МД коррелировало с уменьшением инфекционности вирионов. Высокая энергия активации для преодоления электростатического отталкивания между полярными группами фосфолипидов при слиянии вирусной и клеточной мембран преодолевается с помощью энергии конформационных перестроек белков E из метастабильных димеров в энергетически выгодные тримеры. Связывание молекулы ингибитора, по-видимому, может снижать энергию этого конформационного перехода, таким образом предотвращая слияние.

Хотя при нейтральном pH закрытая форма претерпевает наименьший изгиб, в этой системе происходит потеря контакта между петлей слияния первой субъединицы и доменом III соседней после 22 нс моделирования (рис. 1Е), чего не наблюдается в других системах. По литературным данным, димеры белка E ДНГВ и ВКЭ не демонстрировали склонности к диссоциации в течение, соответственно, 8 и 10 нс моделирования МД. Хотя отсутствие диссоциации димеров может быть списано на короткие промежутки времени моделирования, стоит отметить, что sE ВЛЗН (аминокислотная последовательность sE ПОВ имеет большее сходство с sE ВЛЗН, чем с ДНГВ) в растворе существует преимущественно как мономер, для ДНГВ напротив продемонстрировано наличие и димерных, и мономерных форм в растворе. В связи с этим можно ожидать менее плотную упаковку белковой оболочки вирионов ПОВ по сравнению с ДНГВ и ВКЭ.

Глава 4. Производные 4-аминотетрагидрохиназолина как ингибиторы ВКЭ

Серия 1,2,4-замещенных аналогов 4-аминотетрагидрохиназолина **60 – 86** (табл. 3) была разработана на основе докинга виртуальной библиотеки 1,6-замещенных 4-фторпиримидин-N-оксидов (рис. 2Б), содержащих алкильные и фенильные производные, в карман связывания β -OG модели открытой формы белка E ВКЭ.

Величины и острой, и хронической токсичности оказались ниже для соединений, не содержащих адамантановых заместителей. Тем не менее, для

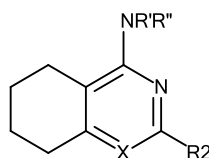
всех соединений значения острой цитотоксичности были выше 10 мкМ. Для 9 соединений, которые ингибировали образование по крайней мере 50% фокусов при концентрации 50 мкМ, были определены значения EC_{50} . Эти соединения продемонстрировали дозозависимый характер ингибирования репродукции ВКЭ. Соединение **60** обладало умеренной активностью с EC_{50} 12 мкМ. Серия морфолин-содержащих соединений **65 – 67**, пиперазиновые производные **68 – 70** и производные первичных ароматических аминов не проявили активности, за исключением соединения **73** ($EC_{50} = 5,6$ мкМ) и малоактивного соединения **62**. Наиболее активные соединения **79**, **81**, **84** и **86** содержат объемные адамантильные заместители R'' и трет-бутильную группу в позиции R2. Удаление адамантильного заместителя ведет к значительному снижению активности (**84** и **62**) или к ее потере (**86** и **70**). Замена трет-бутильного заместителя меньшей группой также негативно отражается на активности (**77**, **78**, **80**, **83**, **85**). Уменьшение длины линкера между адамантаном и центральным фрагментом (**79** и **75**) приводит к потере активности.

При докинге соединений серии генерируется большое количество разнообразных способов связывания, наиболее часто наблюдались две ориентации молекул, отличающиеся направлением N-оксидной группы (рис. 2В). Специфическая ориентация характерна для соединений **73** и **86** (рис. 2Б, Г).

Ориентации соединений **60** и **62** схожи и характеризуются водородными связями с His275 и Tyr132 (рис. 2А). Тетраметиленовый цикл направлен вглубь кармана аналогично **59**. Ориентации неактивных соединений **61**, **63**, **64**, **71** и **72** схожи с ориентацией **62**, но вследствие наличия гидрофильных заместителей в положениях 3 и 4 фенильного кольца соединения **63** и **64** получили более низкую оценку, чем **62**, так как эти группы формируют невыгодные контакты с гидрофобным регионом кармана.

Соединения **71** и **72**, содержащие фенильные заместители вместо бензильных, не могут принять конформации с благоприятной плоской геометрией аминогрупп, что может объяснить отсутствие активности. Соединение **60** содержит метильную группу вместо *трет*-бутильной и поэтому образует менее эффективные взаимодействия в кармане по сравнению с **62**.

Таблица 3. Структура и биологическая активность 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов.



№	X	R2	R'	R''	CC ₅₀ , мкМ		EC ₅₀ , мкМ
					24 ч.	7 д.	
60	N→O	Me	H	<i>n</i> -Bu	172	97	12±1
61	N→O	Me	H	CH ₂ Ph	432	93	>50
62	N→O	<i>t</i> -Bu	H	CH ₂ Ph	283	98	46±3
63	N→O	Me	H	CH ₂ (4-OMe-C ₆ H ₄)	220	87	>50
64	N→O	Me	H	CH ₂ (3-OH-4-OMe-C ₆ H ₃)	>500	214	>50
65	N→O	Me			>500	>125	>50
66	N	Me			>500	>500	>50
67	N→O	<i>t</i> -Bu			>500	282	>50
68	N→O	Me			>500	>500	>50
69	N	Me			>500	305	>50
70	N→O	<i>t</i> -Bu			>500	213	>50
71	N→O	Me	H	Ph	>500	>250	>50
72	N→O	<i>t</i> -Bu	H	Ph	>500	>500	>50
73	N→O	Me	H	2-OH-C ₆ H ₄	>500	340	5,60±0,09
74	N→O	Me	H	CH ₂ -(1-Ad)	142	47	>50
75	N→O	<i>t</i> -Bu	H	CH ₂ -(1-Ad)	>500	419	>50
76	N→O	Me	H	CH(1-Ad)CH ₃	101	40	>50
77	N→O	Me	H	(CH ₂) ₂ -(1-Ad)	54	12	>50
78	N→O	Et	H	(CH ₂) ₂ -(1-Ad)	109	64	33,1±0,2
79	N→O	<i>t</i> -Bu	H	(CH ₂) ₂ -(1-Ad)	43	12	7,4±0,5
80	N→O	Me	H	(CH ₂) ₂ -(2-Ad)	46	16	>50
81	N→O	<i>t</i> -Bu	H	(CH ₂) ₂ -(2-Ad)	54	35	6,6±0,4
82	N→O	Me	H	(CH ₂) ₂ O-(1-Ad)	183	85	>50
83	N→O	Me	H	CH(1-Ad)Ph	48	14	11±3
84	N→O	<i>t</i> -Bu	H	CH(1-Ad)Ph	24	11	5,5±0,2
85	N→O	Me			391	90	>50
86	N→O	<i>t</i> -Bu			271	211	14,1±0,6

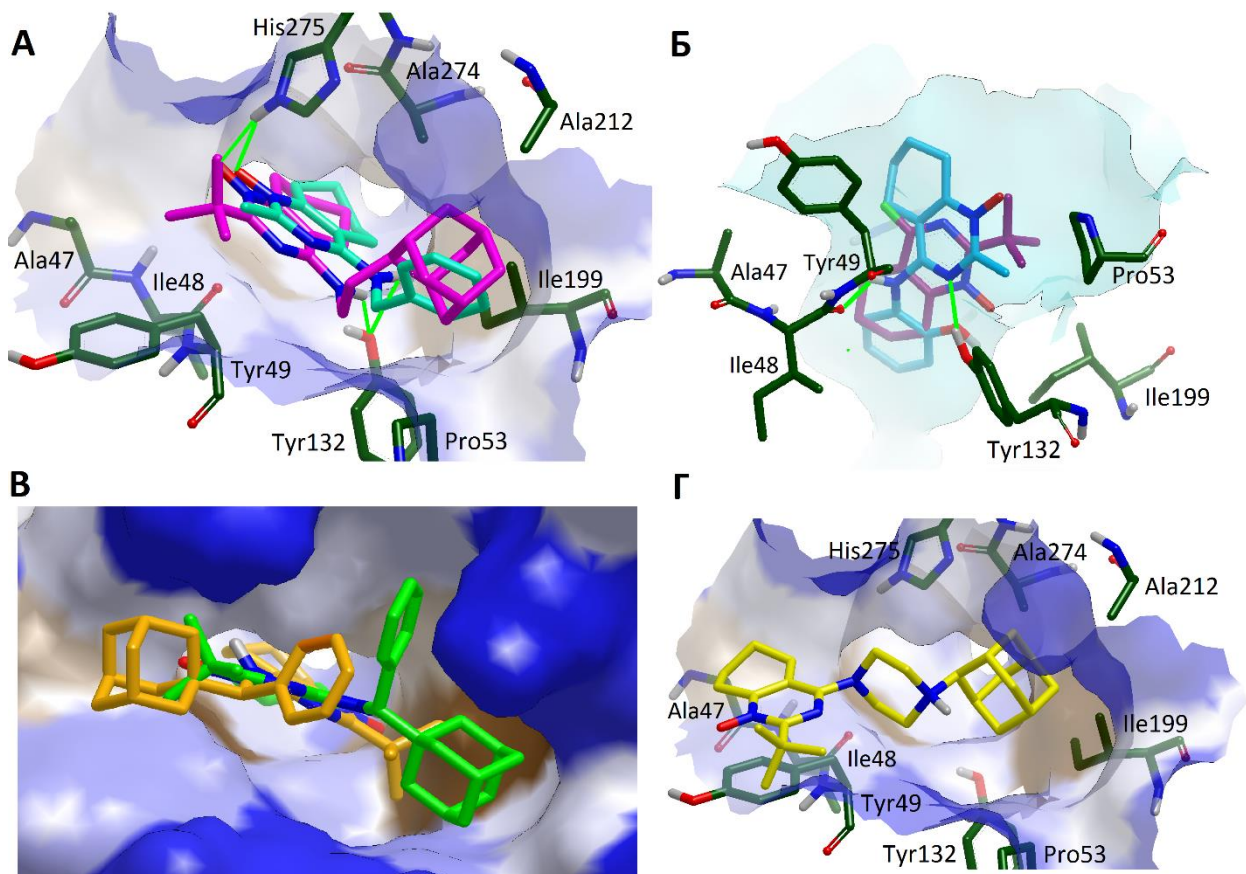


Рисунок 2. Докинг тетрагидрохиназолин-N-оксидов в карман белка E ВКЭ. Ориентация соединений **А)** **62** (сине-зеленый) и **79** (лиловый), вид сверху; **Б)** 2-трет-бутил-4-фтортетрагидрохиназолин-N-оксида (фиолетовый) и **73** (голубой), вид сбоку, поверхность кармана окрашена голубым; **В)** (R)-**84** (оранжевый) и (S)-**84** (салатовый); **Г)** **86**, вид сверху. Поверхность кармана окрашена в соответствии с гидрофобностью регионов, если не указано иное: от синего для наиболее гидрофильных регионов через белый к коричневому для наиболее гидрофобных. Водородные связи окрашены салатовым.

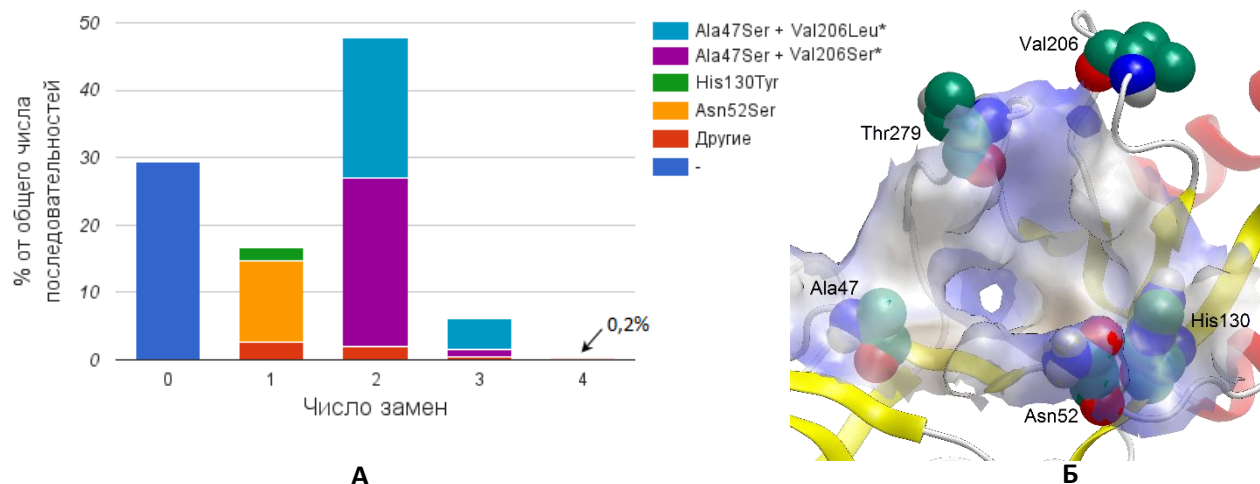


Рисунок 3. **А)** Распределение количества аминокислотных замен и **Б)** их расположение в кармане sE ВКЭ. *- Комбинация встречается и в составе тройных замен.

Адамантильные группы **79** (рис. 2А) и **81**, схожим образом располагающиеся в сайте связывания, чрезвычайно хорошо вписываются в гидрофобную полость кармана, образованную Ile199, Ala212 и Ala274, в то время как *трет*-бутильная группа контактирует с Ala47. Также образуются водородные связи с His275 и Tyr132. Замена *трет*-бутильного остатка меньшим по объему (**77**, **78**, **80**), а также уменьшение длины алифатической цепи линкера с адамантилом (**74** и **75**) нарушают эти взаимодействия.

Оптимальная ориентация одного из наиболее активных соединений **73** значительным образом отличается от ориентаций всех остальных активных соединений (рис. 2Б): его тетраметиленовое кольцо располагается глубоко в кармане, водородные связи могут образовываться между атомом азота в положении 3 и гидроксильной группой Tyr132, а также между карбонильным атомом кислорода Ile148 и аминогруппой **73**. Отличную от всех остальных соединений ориентацию в сайте также демонстрирует соединение **86** (рис.2Г).

Механизм антифлавивирусной активности идентифицированных соединений был изучен путем анализа влияния порядка добавления соединений и инфицирования клеток на значение EC₅₀ и активности против полиовируса. Как и в случае соединения **55**, противовирусная активность тетрагидрохиназолин-N-оксидов, вероятнее всего, является результатом взаимодействия ингибиторов с поверхностью вириона на стадии его проникновения в клетку.

Глава 5. Исследование активности 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов против различных штаммов ВКЭ

Препарат для лечения клещевого энцефалита должно ингибировать репродукцию как можно большего числа различных штаммов ВКЭ, так как на одной и той же территории могут циркулировать различные варианты вируса. Для соединений 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов, в предыдущих экспериментах проявивших активность против ВКЭ штамма Абсеттаров, была изучена ингибиторная активность в отношении других штаммов, принадлежащих всем известным подтипам вируса и имеющим аминокислотные замены в регионе кармана.

В результате анализа последовательностей белков E ВКЭ из базы GenBank было установлено, что почти треть представленных последовательностей имеет полностью идентичный состав карманов белка E, а оставшиеся представители

имеют не более 4 аминокислотных замен в ограниченном числе позиций. Подвергающиеся заменам аминокислоты располагаются на периферии кармана, последовательности с мутациями в его глубине не представлены (рис. 3). Это свидетельствует о важной роли региона кармана в жизненном цикле вируса и перспективности его использования в качестве мишени противовирусных соединений с широким спектром активности.

В коллекции лаборатории биологии арбовирусов ФГБНУ ИПВЭ им. М. П. Чумакова также не были обнаружены штаммы с заменами в глубине кармана, поэтому для работы были отобраны 7 штаммов (табл. 4), относящихся ко всем 3 подтипам ВКЭ и содержащих замены, которые лежат на периферии кармана (табл. 5). Значения EC_{50} были определены в опыте по ингибированию образования бляшек (табл. 5).

Таблица 4. Характеристика отобранных штаммов ВКЭ.

Подтип	Штамм	Идентичность белку Е Абсеттаров, %	Замены в кармане относительно штамма Абсеттаров
Европейский	Абсеттаров	—	—
	256	100	—
Сибирский	Васильченко	96,3	Ala47Ser + Thr279Ala
	Лесопарк11	96,7	Ala47Ser
	ЭК-328	96,5	
	ТВ08-Т2546	96,1	
Дальне-восточный	205КГГ	96,3	Ala47Ser + Gly129Glu
	ДВ 936к	95,7	

Для 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов была установлена ингибиторная активность в отношении различных штаммов, относящихся к разным подтипам ВКЭ. Соединения, наиболее активные против штамма Абсеттаров, проявляют наибольшую активность и против остальных штаммов. Примечателен штамм 256: несмотря на отсутствие замен во всем белке Е по сравнению со штаммом Абсеттаров, его репродукцию были способны подавить лишь два соединения – **73** и **84** (они являлись наиболее активными против всех исследованных штаммов, но в отношении штамма 256 обладали значительно более высокими значениями EC_{50}). Более того, соединение **73** в концентрации 50 мкМ ингибирует образование 89 – 99% бляшек всех штаммов, но лишь 68% в случае штамма 256 (рис. 4).

Для объяснения этих различий в профиле активности соединений против идентичных по белку Е штаммов 256 и Абсеттаров была выдвинута гипотеза о том, что соотношение между количеством белка Е, который формирует инфекционные вирионы, способные давать потомство, и количеством белка, входящего в состав не способных к репродукции вирусных частицы, оказывает значительное влияние на величины значений активности ингибиторов репродукции, связывающихся с белками оболочки.

Таблица 5. Активность производных татрагидрохиназолин-N-оксидов против различных штаммов ВКЭ.

Штамм	Соединение/EC ₅₀ , мкМ							
	60	73	78	79	81	83	84	86
Абсеттаров	31 ± 5	8 ± 3	35 ± 2	6 ± 2	6 ± 3	8 ± 3	4 ± 1	23 ± 6
256	н. а.	21 ± 2	н. а.	н. а.	н. а.	н. а.	26 ± 2	н. а.
Васильченко	н. а.	3,4 ± 0,2	н. а.	13 ± 2	16 ± 2	16 ± 2	4,3 ± 0,3	н. а.
ТВ08-Т2546	18 ± 4	4,0 ± 0,4	25 ± 3	7 ± 2	11,4 ± 0,9	15 ± 2	3,3 ± 0,4	29 ± 1
Лесопарк11	н. а.	6,5 ± 0,1	н. а.	6,0 ± 1,5	4,4 ± 0,2	23 ± 4	9 ± 1	35 ± 5
ЭК-328	н. а.	12 ± 1	н. а.	9,7 ± 0,7	7,5 ± 0,6	15,0 ± 0,2	10,1 ± 0,9	39 ± 2
205КГГ	н. а.	7,0 ± 0,2	н. а.	6,9 ± 0,8	8,3 ± 0,4	10,9 ± 0,5	4,1 ± 0,3	37 ± 1
ДВ 936к	18 ± 3	7,4 ± 0,3	н. а.	6,5 ± 0,6	5 ± 2	14,7 ± 0,1	4,3 ± 0,1	12 ± 2

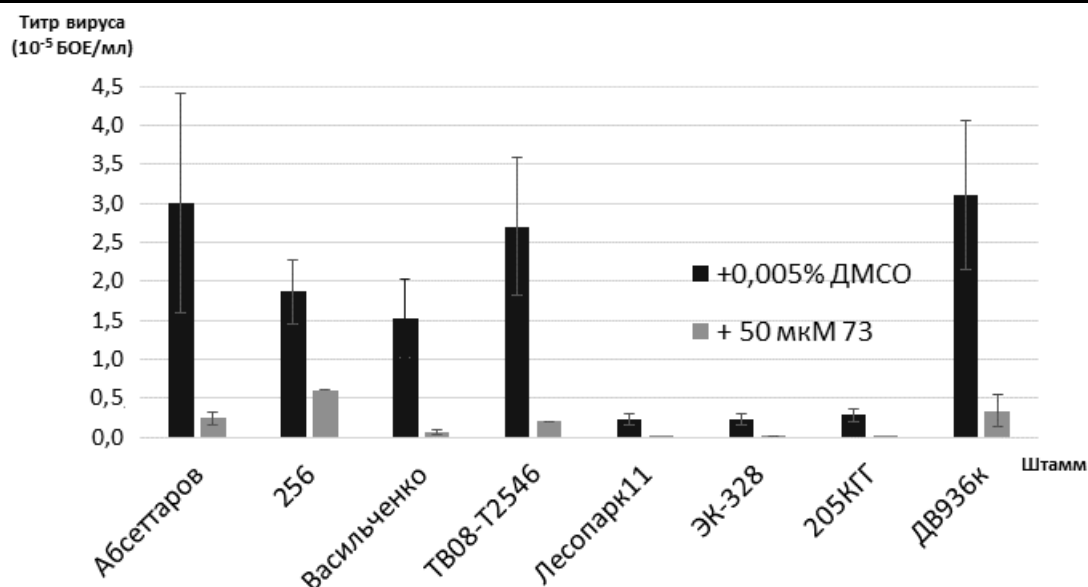


Рисунок 4. Титры ВКЭ различных штаммов в присутствии соединения 73 в концентрации 50 мкМ и соответствующего объема ДМСО.

Для проверки гипотезы с помощью метода иммуноферментного анализа было измерено содержание белка Е в пробах суспензий вирусов различных штаммов. Эти данные были сопоставлены с концентрацией инфекционных вирионов в пробах, соответствующей титру вируса, измеренному по

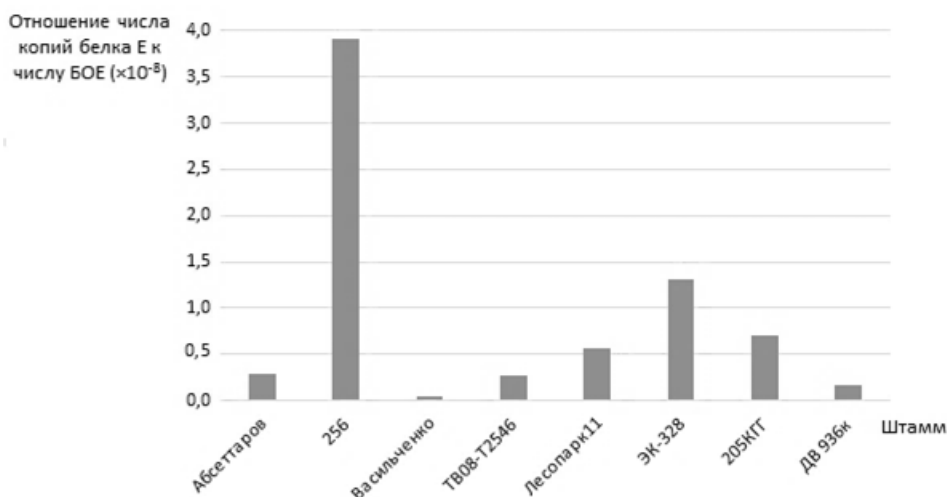


Рисунок 5. Отношение числа копий белка sE (копий/мл) к числу БОЕ (БОЕ/мл).

значения для остальных штаммов. Высокое содержание белка E, не участвующего в формировании неинфекционных вирионов, объясняет данные по активности соединений против штамма 256: для ингибирования образования одинакового количества бляшек в случае штамма 256 требуется большее количество вещества, чем для штамма Абсеттаров, так как в образцах штамма 256 содержится большее число неинфекционных частиц, способных связывать молекулы ингибитора, но не участвующих в репликации вируса.

Таким образом, критическим фактором, влияющим на определение активности ингибиторов репродукции, является соотношение между количеством неинфекционных частиц и инфекционными вирионами. Отношение к различным подтипам и замены на периферии кармана белков E оказывают малое влияние на активность соединений. Соединения **73** и **84** оказались способными ингибировать репродукцию всех исследованных штаммов, включая штамм 256 с высоким содержанием неинфекционных частиц, что свидетельствует о целесообразности дальнейшей разработки этих соединений.

ВЫВОДЫ

1) Методом моделирования по гомологии построены модели пространственной структуры белков оболочки sE вирусов клещевого энцефалита и Повассан. Охарактеризованы потенциальные карманы связывания низкомолекулярных соединений в моделях белков sE. С помощью полученных моделей впервые проведен основанный на структуре биомимети дизайн

количеству БОЕ (рис. 5).

Количество молекул белка E, приходящееся на одно и то же количество инфекционных частиц, для штамма 256 сильно превышает соответствующие

ингибиторов слияния флавивирусов, переносимых клещами.

2) Проведен виртуальный скрининг методом докинга в карманы моделей белков sE библиотеки из 5886 низкомолекулярных гетероциклических соединений. Для 89 отобранных соединений экспериментально определена цитотоксичность и активность против вируса клещевого энцефалита и Повассан в культуре клеток. Для 7 соединений, принадлежащих к классам 1,4-дигидропиридинов и 1,3,5-тиадиазин, установлено наличие ингибиторной активности в отношении вируса клещевого энцефалита с лучшим значением $EC_{50} = 70$ нМ, для 2 соединений установлена активность против обоих вирусов.

3) По результатам докинга 2,6-замещенных 4-фторпиримидин-N-оксидов предложена серия из 27 производных 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксида с объемными заместителями. Экспериментально показана активность 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов против 8 различных штаммов вируса клещевого энцефалита, относящихся ко всем известным подтипам. На примере этих соединений впервые продемонстрирована возможность ингибирования репродукции вируса клещевого энцефалита разных штаммов и подтипов. Изучены взаимосвязи между структурой и противовирусной активностью 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов.

4) На основе сравнительного моделирования молекулярной динамики различных форм белков оболочки sE показано, что связывание с найденным ингибитором приводит к увеличению подвижности белка sE, что может быть ассоциировано со снижением инфекционности вирионов.

5) Анализ влияния порядка добавления соединений и инфицирования клеток на значение EC_{50} свидетельствует о том, что противовирусная активность идентифицированных ингибиторов является результатом специфического взаимодействия соединений с поверхностью вириона на стадии его проникновения в клетку.

6) Показано влияние содержания белка E, не задействованного в формировании инфекционных вирионов, на определение ингибиторной активности низкомолекулярных соединений, что необходимо учитывать при подготовке и характеристике вирусных препаратов для тестирования соединений, а также при сравнении их активности.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ РАБОТ

- 1) Sedenkova K. N., Dueva E. V., Averina E. B., Grishin Y. K., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Palyulin V. A., Savelyev E. N., Orlinson B. S., Novakov I. A., Butov G. M., Kuznetsova T. S., Karganova G. G., Zefirov N. S., Synthesis and assessment of 4-aminotetrahydroquinazoline derivatives as tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2015, Vol. 13, №11, P. 3406 – 3415.
- 2) Dueva E. V., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Palyulin V. A., Pentkovski V. M., Zefirov N. S., Interaction of Flaviviruses with Reproduction Inhibitors Binding in β -OG Pocket: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Molecular Informatics*, 2014, Vol. 33, № 10, P. 695 – 708.
- 3) Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Dueva E. V., Dotsenko V. V., Rogova Y. V., Frolov K. A., Krivokolysko S. G., Romanova E. G., Morozov A. S., Karganova G. G., Palyulin V. A., Pentkovski V. M., Zefirov N. S. Inhibitors of tick-borne flaviviruses reproduction from structure-based virtual screening. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2013, Vol. 4 №9, P. 869 – 874.
- 4) Dueva E. V., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Palyulin V. A., Karganova G. G., Zefirov N. S. Molecular design of fusion inhibitors for flaviviruses. Book of abstracts "26th Molecular Modeling Workshop". March 12- 14, 2012. Erlangen, Germany. P. 52.
- 5) Дуева Е. В., Осолодкин Д. И., Козловская Л. И., Карганова Г. Г., Палюлин В. А., Зефирова Н. С. Молекулярный дизайн ингибиторов слияния флавивирусов. Сборник тезисов XIX Российского национального конгресса «Человек и лекарство». 23-27 апреля, 2012. Москва. С. 498.
- 6) Dueva E. V., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Rogova Y., Dotsenko V. V., Pentkovski V. M., Palyulin V. A., Karganova G. G., Zefirov N. S. Tick-borne encephalitis virus fusion inhibitors. Book of abstracts "12th International Jena Symposium on Tick-borne Diseases". March 21-23, 2013. Weimar, Germany. P. 27.
- 7) Dueva E. V., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Rogova Y. V., Dotsenko V. V., Pentkovski V. M., Palyulin V. A., Karganova G. G., Zefirov N. S. Flavivirus Fusion Inhibitors: Identification and Putative Mechanism of Action. Book of abstracts "6th Joint Sheffield Conference on Chemoinformatics". July 22-24, 2013. Sheffield, UK. P. 86.
- 8) Dueva E. V., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Rogova Y., Dotsenko V. V., Pentkovski V. M., Palyulin V. A., Karganova G. G., Zefirov N. S. Small molecule inhibitors of tick-borne flaviviruses. Book of abstracts "1st Russian Conference on Medicinal Chemistry". September 8-12, 2013. Moscow, Russia. P. 216.
- 9) Дуева Е. В., Осолодкин Д. И., Козловская Л. И., Карганова Г. Г., Палюлин В. А., Пентковский В. М., Зефирова Н. С. Изучение взаимодействий белков оболочки E флавивирусов со связывающимися в гидрофобном кармане ингибиторами методом молекулярной динамики. *Медицинская вирусология*, 2013, Т. 12, № 1, С. 86.
- 10) Dueva E. V. Reproduction inhibitors of tick-borne flaviviruses: identification and putative mechanism of action. Book of abstracts «XXXIV European School of Medicinal Chemistry». 29 June – 4 July, 2014. Urbino, Italy. P. 39 – 40.
- 11) Dueva E. V., Sedenkova K. N., Averina E. B., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Palyulin V. A., Karganova G. G. Molecular design of tick-borne flavivirus reproduction inhibitors. Book of abstracts «VII International Theoretical Biophysics Symposium TheoBio2015» June 8-12, 2015. Cagliari, Italy.
- 12) Дуева Е. В. Молекулярный дизайн ингибиторов слияния флавивирусов, переносимых клещами. Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015». 13-17 апреля, 2015. Москва. С. 91.
- 13) Dueva E. V., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Karganova G. G., Palyulin V. A., Zefirov N. S. Fusion inhibitors of tick-borne flaviviruses: identification and mode of action study. Book of abstracts 21st European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationship EuroQSAR. September 4-8, 2016. Verona, Italy. P. 70.
- 14) Dueva E., Osolodkin D., Kozlovskaya L., Tuchynska K., Palyulin V., Zefirov N., Karganova G. Computational studies of interactions between flavivirus E proteins and small molecule reproduction inhibitors. Book of abstracts «4th Antivirals Congress 2016». September 18-21, 2016. Sitges, Spain. P. 1.