



*Химический факультет  
Московского государственного  
университета имени М.В.Ломоносова*



*Химико-технологический факультет  
Самарского государственного  
технического университета*

# **Молекулярный дизайн новых ингибиторов ионных каналов РНК-геномных вирусов**

**Радченко Е.В., Ширяев В.А., Петров П.В.,  
Палюлин В.А., Климочкин Ю.Н., Зефиоров Н.С.**

# Виропорины

- Относительно короткие вирусные белки
- Преимущественно гидрофобный характер
- 1–3 трансмембранных домена
- Олигомерные комплексы (4, 5, 6, 7)
- Динамическая структура
- **Вирусные ионные каналы или поры** в мембране вируса и/или хозяина
- Модификация локальной среды обеспечивает размножение вируса
- Могут играть решающую роль на различных стадиях жизненного цикла вируса
- **Привлекательные мишени для создания антивирусных средств**

# Виропорины

Впервые открыты в 1992 году

(белок М2 вируса гриппа – мишень действия амантадина)

Растущее семейство белков

В том числе важные патогены человека

Classification	Family	Virus	Name	Amino acids	TMDs	Consensus ion specificity	Role of channel function	
ssRNA (+)	<i>Picornaviridae</i>	Poliovirus	2B	97	2	Ca <sup>2+</sup>	Particle production, cell lysis	
			VP4	68	1	–*	Entry	
		Coxsackievirus B3	2B	99	2	Ca <sup>2+</sup>	Particle production, cell lysis	
			EV71	2B	99	2	Cl <sup>–</sup>	Virus spread
			Human rhinovirus	VP4	68	1	–	Entry
	<i>Flaviviridae</i>	Hepatitis C virus	p7	63	2	H <sup>+</sup>	Particle production, entry?	
			BVDV	p7	63	2	H <sup>+</sup> †	Particle production
		CSFV	p7	63	2	Ca <sup>2+</sup>	Particle production	
			Dengue virus	M	75	2	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production
	<i>Togaviridae</i>	Semliki Forest virus	6K	60	2	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production	
			Sindbis virus	6K	55	1‡	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production
		Ross River virus	6K	62	1‡	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production	
	<i>Coronaviridae</i>	SARS-CoV	E	76	1	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production	
			3a	274	3	K <sup>+</sup>	Virus spread	
8a			39	1	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	–		
ssRNA (–)	<i>Paramyxoviridae</i>	MHV	E	83	1	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production	
			hRSV	SH	64	1	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	TNF antagonist, pathogenesis
	<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza A virus	M2	97	1	H <sup>+</sup>	Entry, particle production (some)	
			Influenza B virus	BM2	115	1	H <sup>+</sup>	Entry
	Influenza C virus	NB	100	1	H <sup>+</sup>	–		
		CM2	115	1	H <sup>+</sup>	Entry		
dsRNA	<i>Reoviridae</i>	Rotavirus	NSP4	175	1/3	Ca <sup>2+</sup>	Particle production, endotoxin	
Reverse transcription (RNA)	<i>Retroviridae</i>	HIV-1	Vpu	81	1	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production	
			HTLV-1	P13ii	87	2	K <sup>+</sup> †	Mitochondrial permeability
dsDNA	<i>Polyomaviridae</i>	SV40	VP4	125	1	Ca <sup>2+</sup>	Particle production	
			JC	Agno	71	1	Ca <sup>2+</sup>	Particle production
	<i>Papillomaviridae</i>	HPV-16	E5	83	3	H <sup>+</sup> †	Oncogene, signalling/trafficking	

# Виропорины

Значительное разнообразие структур, характеристик, функций и механизмов

Не похожи на «классические» ионные каналы

Динамическая структура

Classification	Family	Virus	Name	Amino acids	TMDs	Consensus ion specificity	Role of channel function
ssRNA (+)	<i>Picornaviridae</i>	Poliovirus	2B	97	2	Ca <sup>2+</sup>	Particle production, cell lysis
			VP4	68	1	–*	Entry
		Coxsackievirus B3	2B	99	2	Ca <sup>2+</sup>	Particle production, cell lysis
			EV71	2B	99	2	Cl <sup>–</sup>
	<i>Flaviviridae</i>	Human rhinovirus	VP4	68	1	–	Entry
			Hepatitis C virus	p7	63	2	H <sup>+</sup>
		BVDV	p7	63	2	H <sup>+</sup> †	Particle production
		CSFV	p7	63	2	Ca <sup>2+</sup>	Particle production
		Dengue virus	M	75	2	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production
		<i>Togaviridae</i>	Semliki Forest virus	6K	60	2	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>
	Sindbis virus		6K	55	1‡	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production
	Ross River virus		6K	62	1‡	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production
	<i>Coronaviridae</i>	SARS-CoV	E	76	1	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production
			3a	274	3	K <sup>+</sup>	Virus spread
MHV		8a	39	1	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	–	
		E	83	1	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production	
ssRNA (–)	<i>Paramyxoviridae</i>	hRSV	SH	64	1	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	TNF antagonist, pathogenesis
	<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza A virus	M2	97	1	H <sup>+</sup>	Entry, particle production (some)
			Influenza B virus	BM2	115	1	H <sup>+</sup>
		NB	100	1	H <sup>+</sup>	–	
	Influenza C virus	CM2	115	1	H <sup>+</sup>	Entry	
dsRNA	<i>Reoviridae</i>	Rotavirus	NSP4	175	1/3	Ca <sup>2+</sup>	Particle production, endotoxin
Reverse transcription (RNA)	<i>Retroviridae</i>	HIV-1	Vpu	81	1	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Particle production
		HTLV-1	P13ii	87	2	K <sup>+</sup> †	Mitochondrial permeability
dsDNA	<i>Polyomaviridae</i>	SV40	VP4	125	1	Ca <sup>2+</sup>	Particle production
		JC	Agno	71	1	Ca <sup>2+</sup>	Particle production
	<i>Papillomaviridae</i>	HPV-16	E5	83	3	H <sup>+</sup> †	Oncogene, signalling/trafficking

# Подходы к дизайну ингибиторов

## Мишени

Вирус гриппа А  
Протонный канал М2

Вирус гепатита С  
Ионный канал р7

Динамическая структура  
Различные подтипы мишени  
Широкий спектр действия ингибиторов  
Каркасные соединения

## Общая процедура дизайна

Молекулярная  
динамика  
мишеней

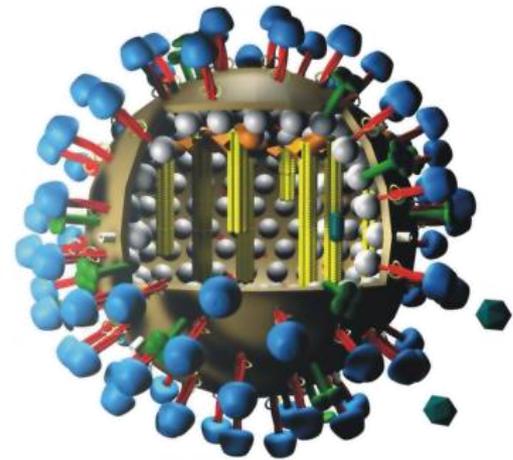
Анализ сайтов  
связывания

Молекулярный  
докинг

Молекулярная  
динамика  
комплексов

Оценка  
ADMET-  
свойств

# Вирус гриппа А



Сезонные эпидемии гриппа каждый год затрагивают **до 10% взрослых и до 30% детей** по всему миру

**3–5 млн случаев тяжелой болезни и 250–500 тыс смертей**, прежде всего в группах высокого риска

Эпизодические **мировые пандемии**: быстрое распространение новых подтипов с еще более высокой смертностью

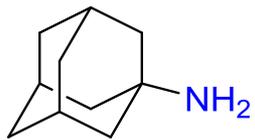
Огромная **социальная и экономическая нагрузка**

# Ограниченные клинические ВОЗМОЖНОСТИ

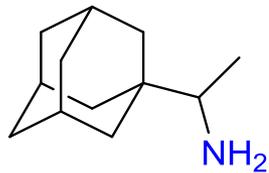
Вакцины требуют ежегодного обновления из-за изменчивости вируса

**Аминоадамантаны** – ингибиторы протонного канала M2  
Ингибиторы нейраминидазы (осельтамивир, занамивир)  
...?

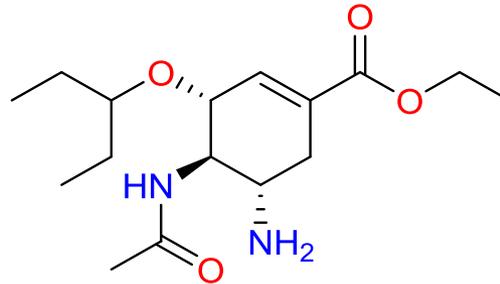
**Быстрое появление резистентных штаммов**



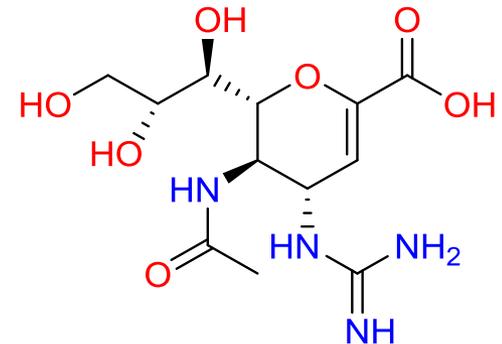
Амантадин



Римантадин

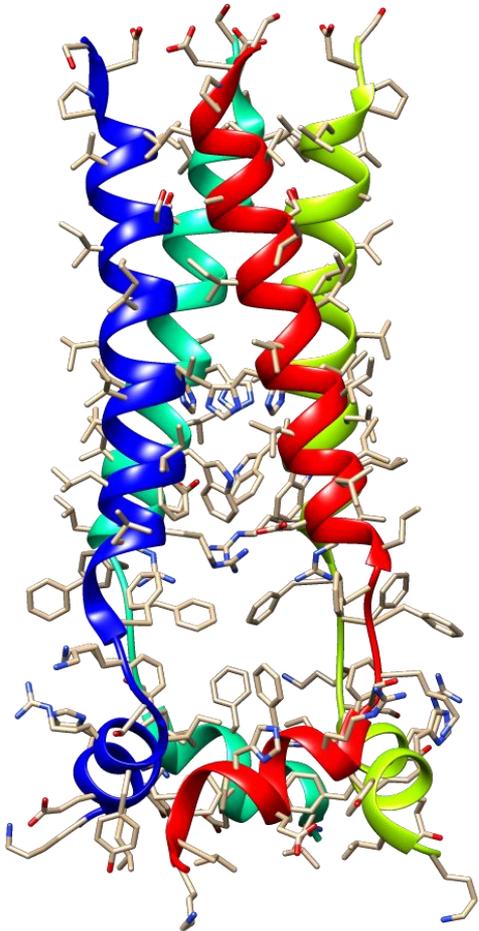


Осельтамивир



Занамивир

# Протонный канал M2



Тетрамерный ионный канал

Высокая селективность к протонам

**Критическая роль в жизненном цикле вируса**

**Проникновение в клетку:** повышение кислотности внутреннего объема вириона в поздних эндосомах обеспечивает высвобождение рибонуклеопротеина

**Созревание вирионов:** снижение кислотности транс-сети Гольджи предотвращает преждевременные изменения конформации гемагглютинаина

# Аминоадамантаны как ингибиторы M2

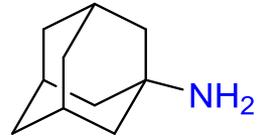
## Классические аминоадамантаны

Применяются с 1960-х годов

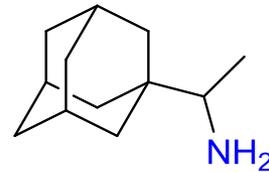
Резистентность достигает 100%

**Точечные мутации (прежде всего S31N и V27A)**

В настоящее время не рекомендованы для терапии или профилактики



Амантадин

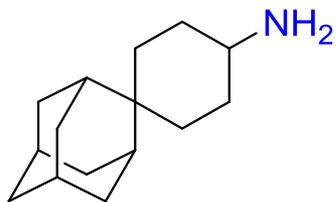


Римантадин

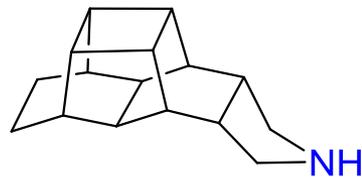
Активный поиск новых ингибиторов

**Необходим широкий спектр действия**

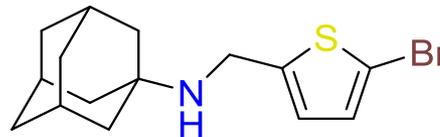
Тройные ингибиторы (WT/S31N/V27A) пока не известны



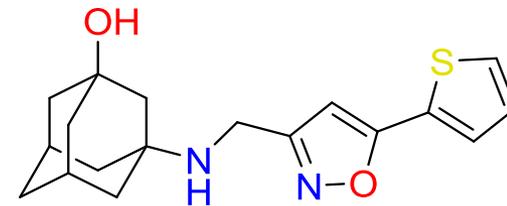
V27A/WT



V27A/WT



S31N/WT



S31N

# Процедура дизайна ингибиторов M2

Молекулярная  
динамика  
мишеней

Анализ сайтов  
связывания

Молекулярный  
докинг

Молекулярная  
динамика  
комплексов

Оценка  
ADMET-  
свойств

AMBER 14

3 мишени

Явная  
мембрана

MDpocket 2.0

10 структур для  
каждой мишени

AutoDock Vina  
1.1.2

Хорошая  
оценка для 5+  
из 10 структур

AMBER 14

3 мишени

Явная  
мембрана

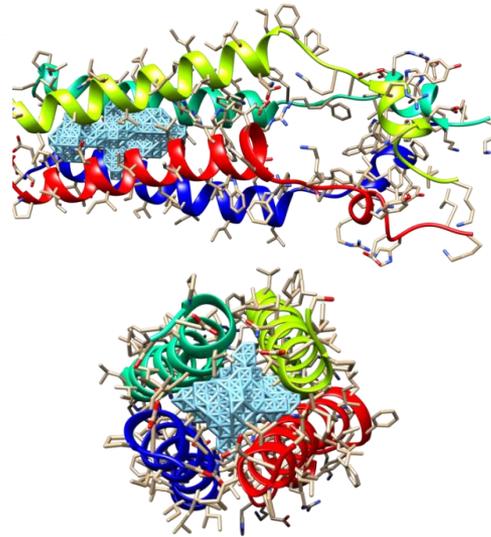
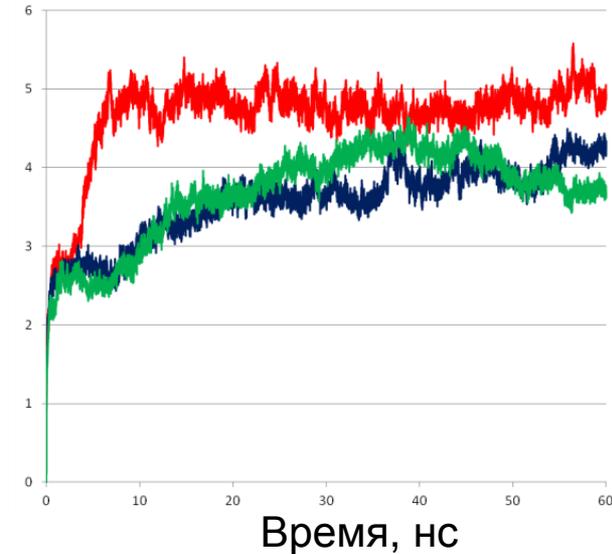
OCHEM

Собственные  
модели

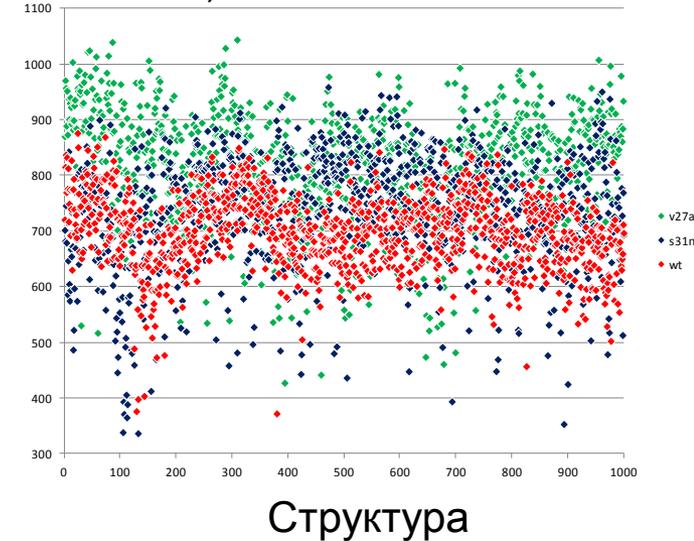
Klimochkin Y.N., Shiryaev V.A., Petrov P.V., Radchenko E.V., Palyulin V.A., Zefirov N.S. Design of broad-spectrum inhibitors of influenza A virus M2 proton channels: A molecular modeling approach, *Curr. Comp.-Aided Drug Des.*, **2016**, 12 (2), 154–164

# Анализ динамической структуры сайтов связывания

RMSD, Å



Объем, Å<sup>3</sup>



Домен проводимости M2 (M2CD)

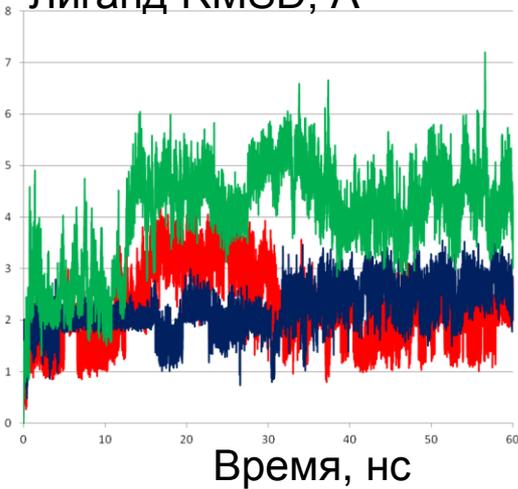
Исходные структуры по данным ЯМР

Высокая изменчивость объема и формы полости

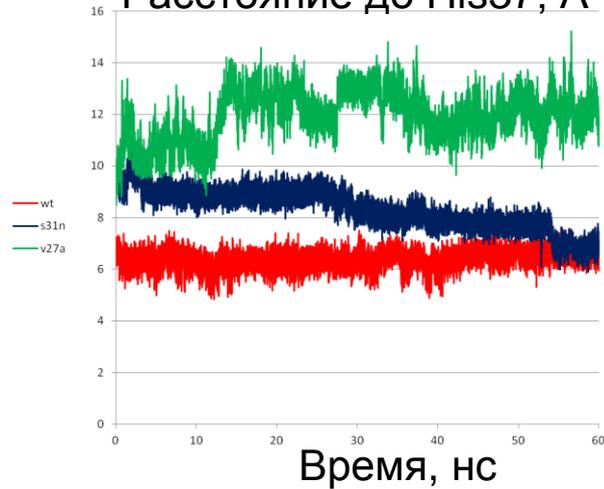
10 структур с наибольшим объемом полости для каждой мишени

# Валидация процедуры дизайна

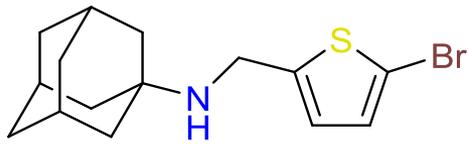
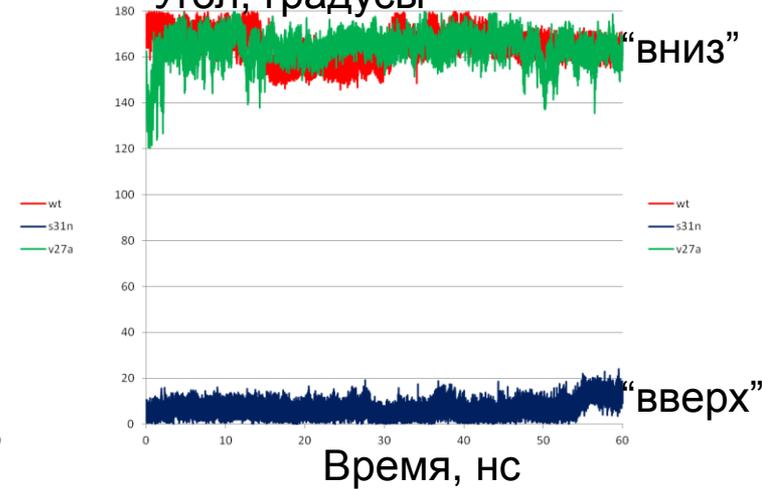
Лиганд RMSD, Å



Расстояние до His37, Å



Угол, градусы



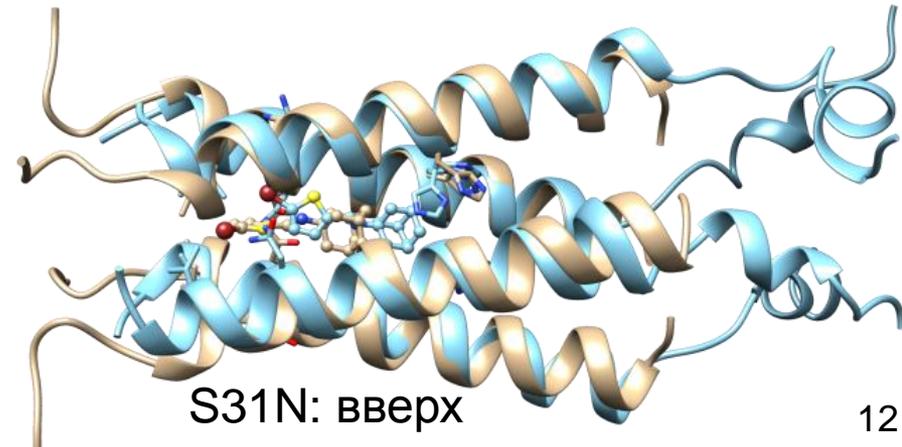
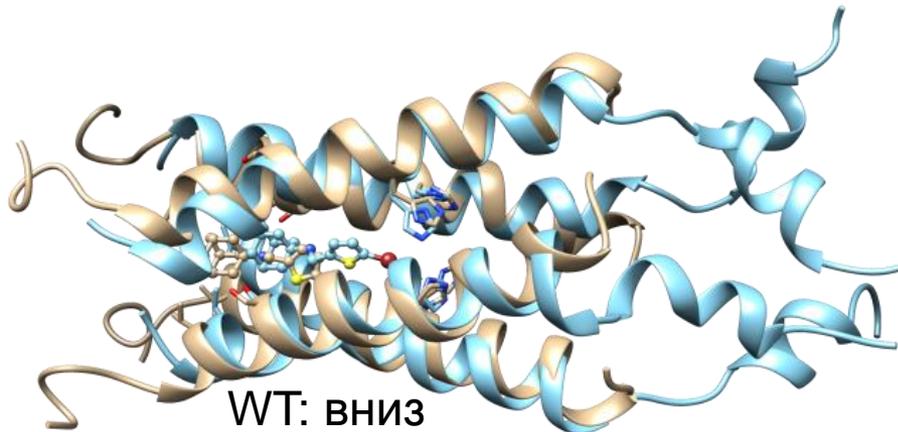
S31N/WT

Слабое связывание без ингибирования для V27A

Хорошее связывание для WT и S31N

Положение и ориентация лиганда соответствуют данным ЯМР

(голубой – модель, бежевый – ЯМР)



# Дизайн перспективных ингибиторов широкого спектра действия

Библиотека **868** производных адамантана

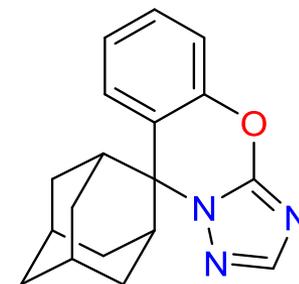
Докинг в 10 структур полости для каждой из трех мишеней (WT, S31N, V27A)

Критерий: хорошая оценка для 5 и более из 10 структур для каждой мишени

Фокусированная библиотека: **52** соединения

Связывание стабилизируется дополнительными линкерами (особенно планарными ароматическими или гетероароматическими) между каркасным и основным фрагментами

**Одно соединение было выбрано для детального анализа**

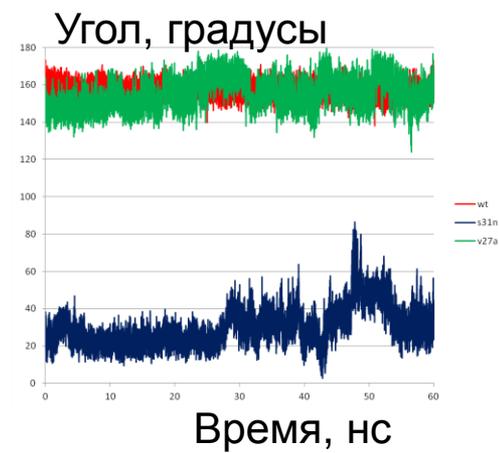
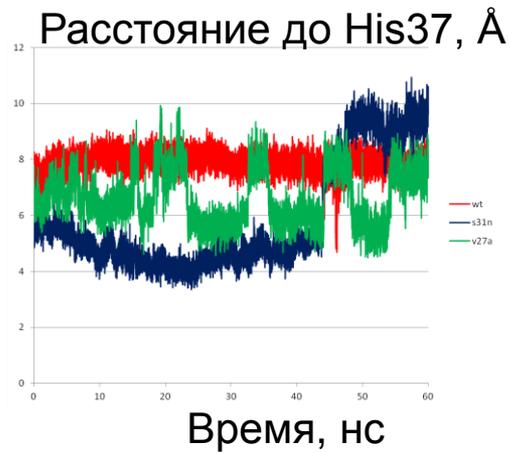
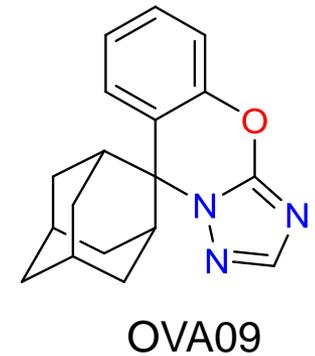
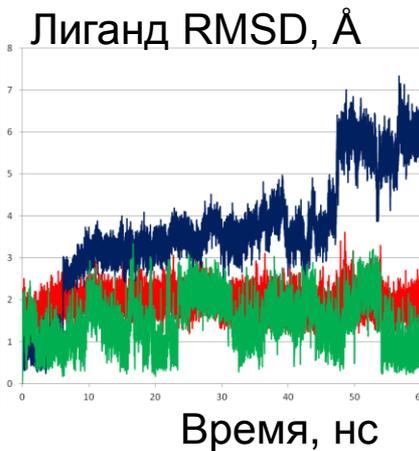
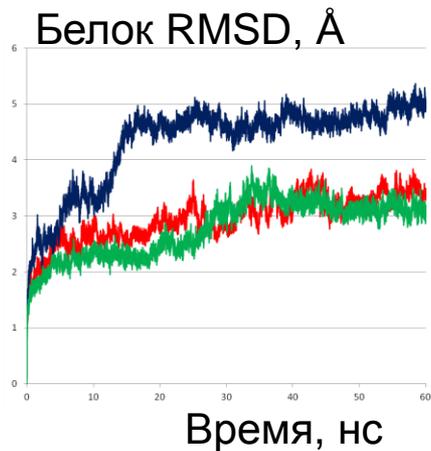


OVA09

# Анализ соединения OVA09

Стабильное связывание в ходе моделирования молекулярной динамики

Более напряженный комплекс для S31N, нарушение структуры канала

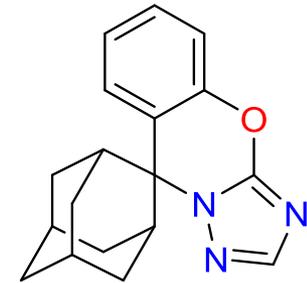


# Анализ соединения OVA09

Стабильное связывание в ходе моделирования молекулярной динамики

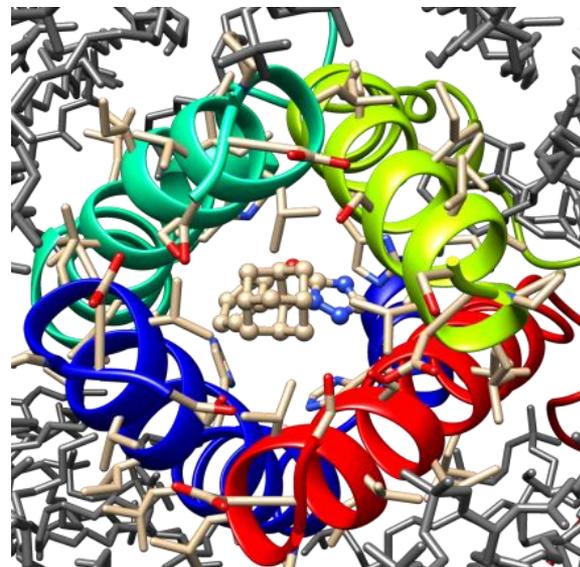
Более напряженный комплекс для S31N, нарушение структуры канала

Приемлемые значения липофильности и всасывания в кишечнике

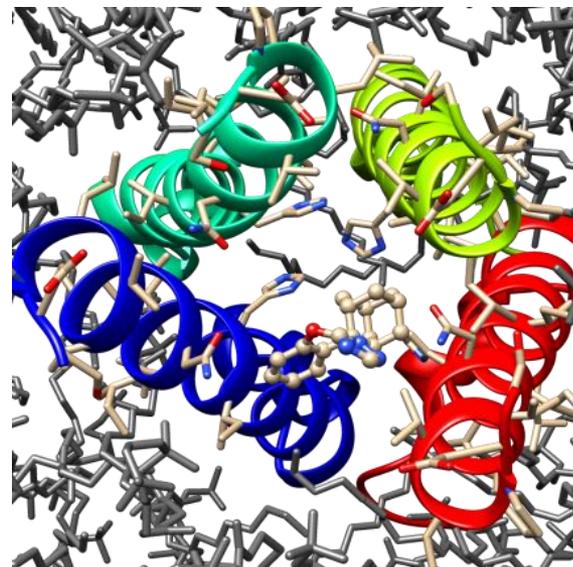


OVA09

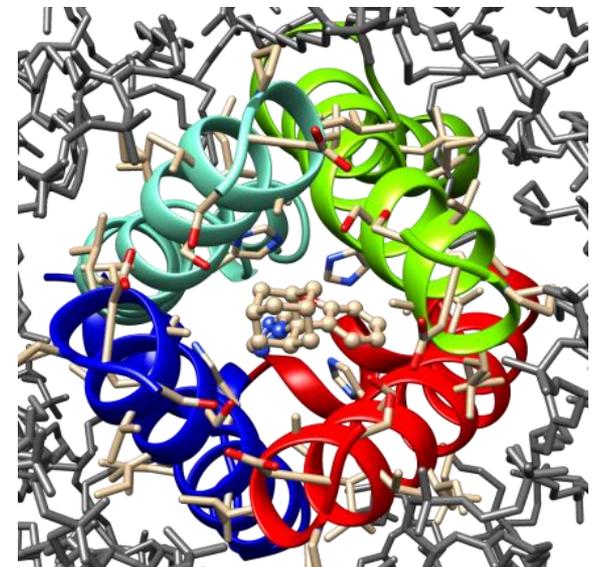
WT:  
Стабильное связывание



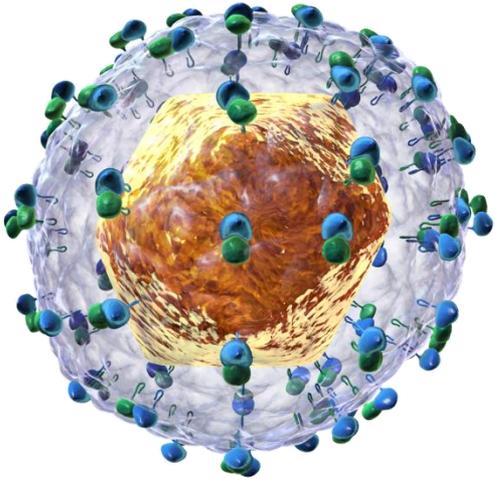
S31N:  
Стабильное связывание  
Нарушение канала



V27A:  
Стабильное связывание



# Вирус гепатита С (НСV)



В настоящее время затрагивает до **185 млн человек, или около 3% населения мира**

Распространенность выше для конкретных групп населения, регионов и возрастных групп

Снижение качества жизни, цирроз и фиброз печени, гепатоцеллюлярная карцинома, печеночная недостаточность

Смертность от связанных с гепатитом С заболеваний печени около **700 000 человек в год**

Огромная **социальная и экономическая нагрузка**

# Клинические возможности

Вакцина отсутствует

**Классическая терапия:** PEG-интерферон и рибавирин

Неудобная, длительная, побочные эффекты, низкая эффективность

**Антивирусные препараты прямого действия (DAA)**

Ингибиторы NS3/4A, NS5A и NS5B

Революция в терапии гепатита С

Зависимость от генотипа вируса, возможна резистентность

Труднодоступность, высокая стоимость

**Необходимы новые классы препаратов**

# Ионный канал p7

Преимущественно гексамерный ионный канал

Критическая роль в жизненном цикле вируса

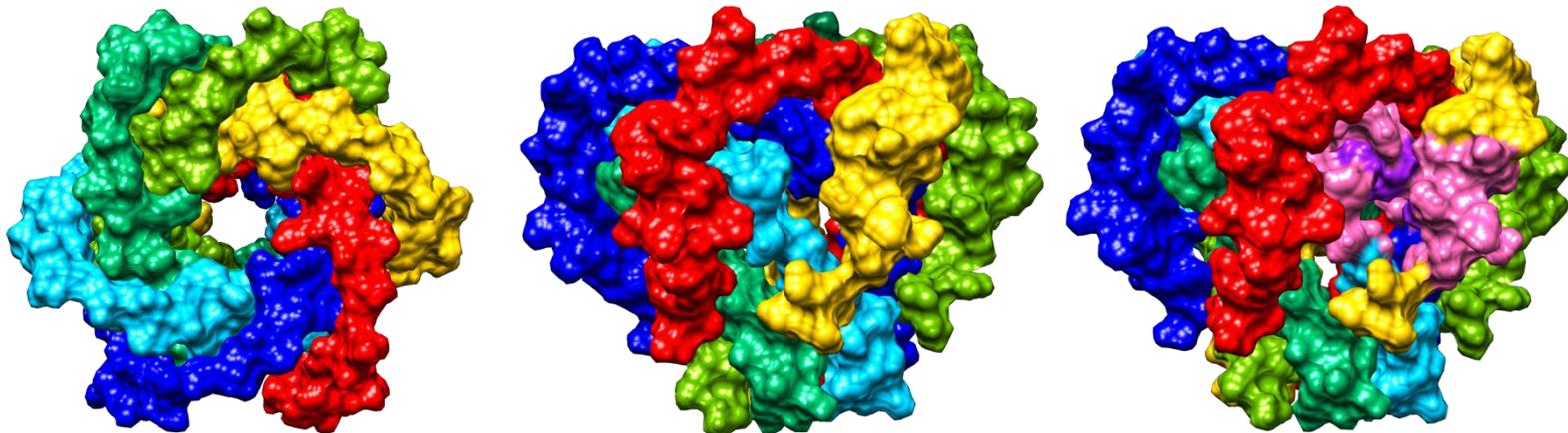
Созревание вирионов: снижение кислотности транс-сети  
Гольджи

Аминоадамантаны изучались как потенциальные ингибиторы

Неубедительные клинические данные

Зависимость от генотипа вируса

Аллостерический механизм, уточнение сайта связывания



# Процедура дизайна ингибиторов р7

Молекулярная  
динамика  
мишеней

Анализ сайтов  
связывания

Молекулярный  
докинг

Молекулярная  
динамика  
комплексов

Оценка  
ADMET-  
свойств

AMBER 14

**5 мишеней**

Gt1a,  
Gt1b, Gt1b\_L20F,  
Gt2a, Gt2b  
(модели по  
гомологии)

**Явная  
мембрана**

AmberTools

**Частые  
структуры для  
каждой мишени  
и сайта**

AutoDock Vina  
1.1.2

**Хорошая  
оценка для 3+  
из 6 структур  
Хорошая  
средняя оценка**

AMBER 14

**5 мишеней**

**Явная  
мембрана**

OCHEM

**Собственные  
модели**

# Дизайн перспективных ингибиторов широкого спектра действия

Библиотека **1112 производных адамантана**

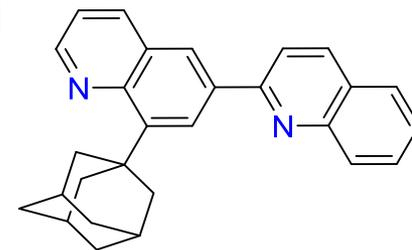
Докинг в 6 структур сайтов связывания для каждой из пяти мишеней (Gt1a, Gt1b, Gt1b\_L20F, Gt2a, Gt2b)

Критерий: очень хорошая оценка хотя бы для одной структуры, хорошая оценка для 3 и более из 6 структур для каждой мишени, хорошая средняя оценка

Фокусированная библиотека: **9 соединений**

Связывание стабилизируется дополнительными группами (особенно планарными ароматическими или гетероароматическими), присоединенными к каркасному фрагменту

**Одно соединение было выбрано для детального анализа**

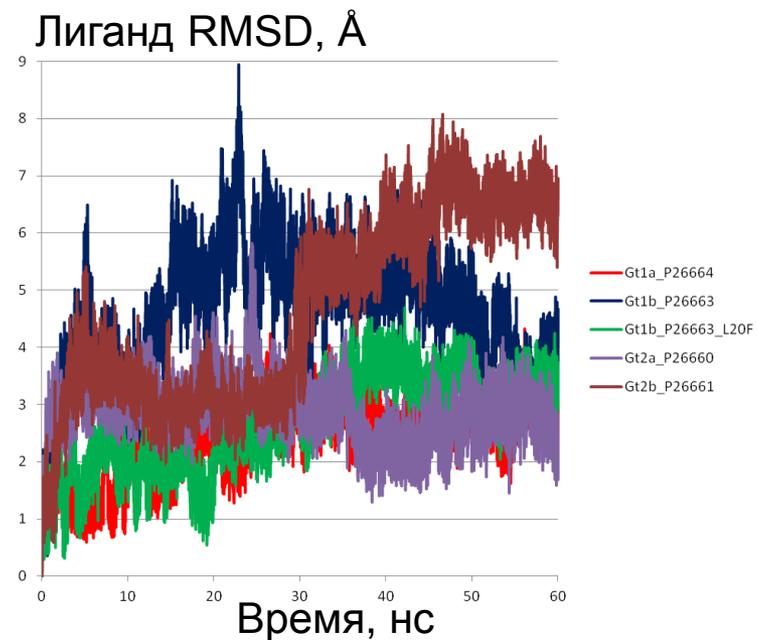
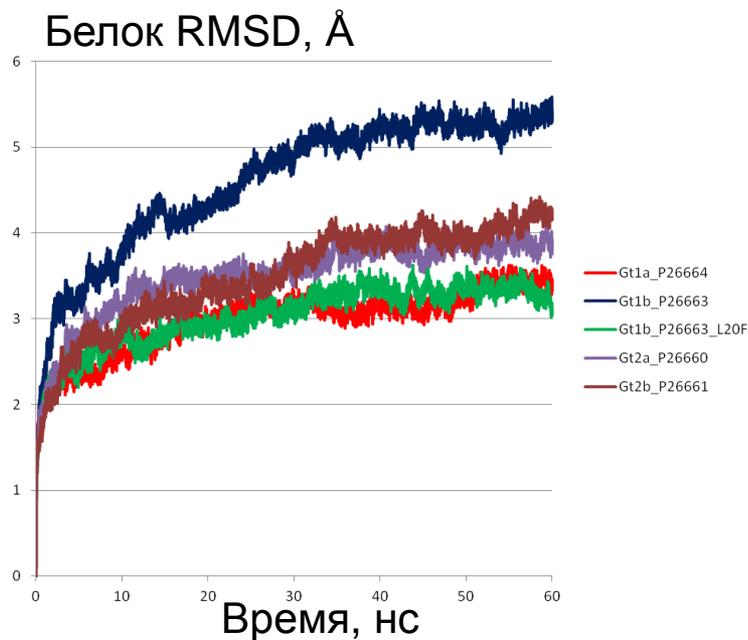


SVA609

# Анализ соединения SVA609

Стабильное связывание в ходе моделирования молекулярной динамики

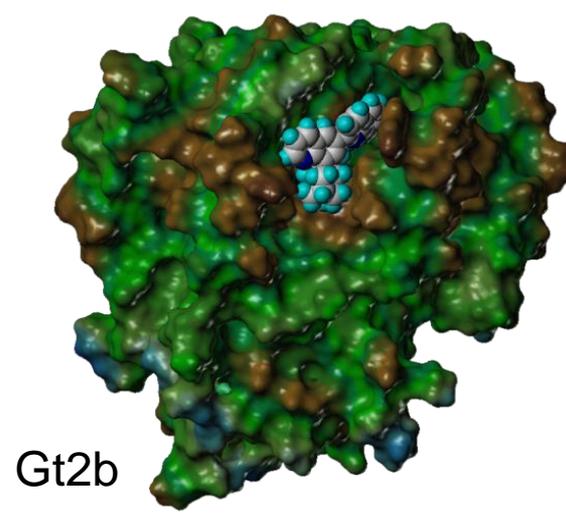
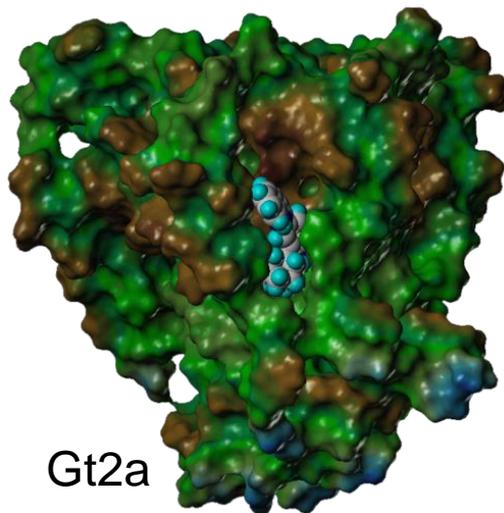
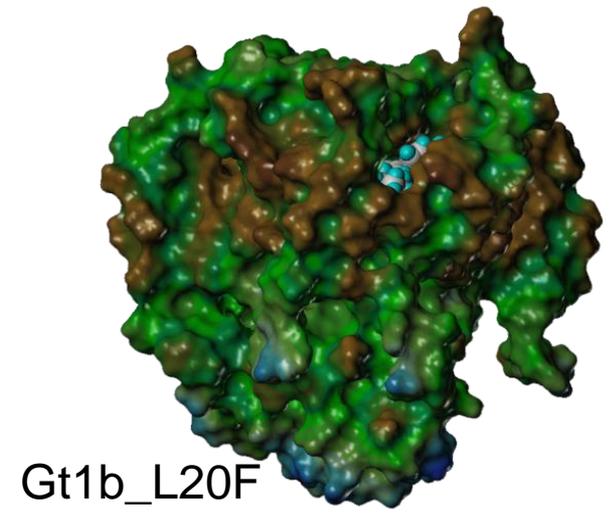
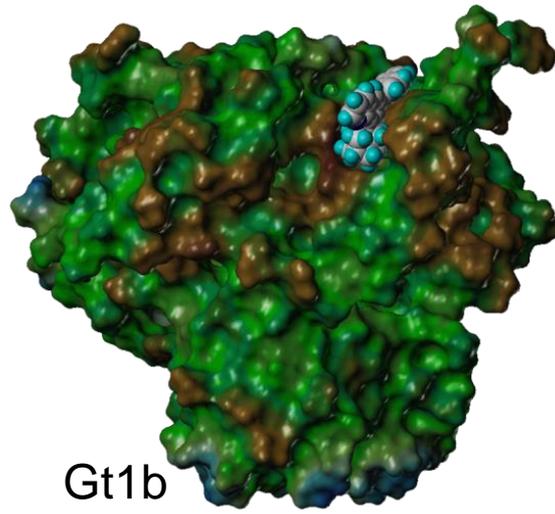
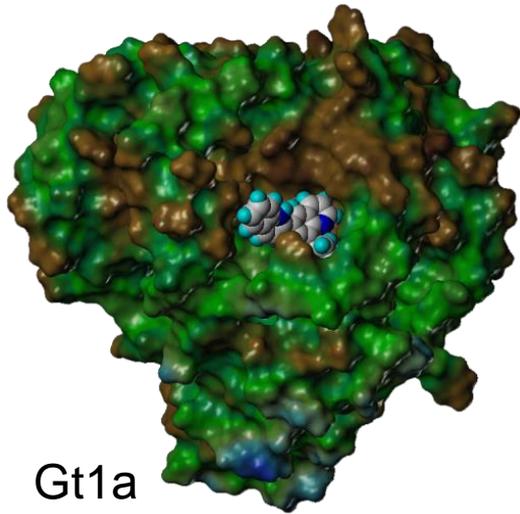
Приемлемые значения липофильности и всасывания в кишечнике



# Анализ соединения SVA609

Стабильное связывание в ходе моделирования молекулярной динамики

Приемлемые значения липофильности и всасывания в кишечнике



# Выводы

- С помощью методов моделирования по гомологии, молекулярной динамики и молекулярного докинга построен представительный набор моделей ионных каналов M2 вируса гриппа и p7 вируса гепатита С, проанализированы сайты связывания ингибиторов, найден ряд структур **потенциальных ингибиторов широкого спектра действия**
- Для одного из предложенных соединений выполнен **детальный анализ связывания**
- Предлагаемый подход применим также для дизайна лигандов широкого спектра действия, взаимодействующих с **другими лабильными мишенями**

# Благодарности

Российский научный фонд (проект №15-13-00084)

*Спасибо  
за внимание!*