

УДК: 51-76:577.322:539.19

Виртуальный скрининг новых ингибиторов проникновения ВИЧ-1, блокирующих CD4-связывающий участок белка gp120 оболочки вируса

Кашин И.А.^{1,2}, Тузиков А.В.², Андрианов А.М.*¹

¹*Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси, Минск, 220141, Республика Беларусь*

²*Объединенный институт проблем информатики, Национальная академия наук Беларуси, Минск, 220012, Республика Беларусь*

Аннотация. Осуществлен виртуальный скрининг новых анти-ВИЧ агентов – потенциальных пептидомиметиков клеточного рецептора CD4 – и проведена оценка их ингибиторной активности методами молекулярного моделирования. В результате выполненных исследований идентифицированы пять химических соединений, проявляющих, согласно расчетным данным, высокое сродство к CD4-связывающему участку белка gp120 ВИЧ-1 – функционально консервативному эпитопу оболочки вируса. В связи с этим найденные соединения рассматриваются как потенциальные ингибиторы проникновения ВИЧ-1 с широким спектром нейтрализующего действия.

Ключевые слова: ВИЧ-1, белок gp120, клеточный рецептор CD4, пептидомиметики, виртуальный скрининг, компьютерное моделирование, анти-ВИЧ агенты

ВВЕДЕНИЕ

Внедрению ВИЧ-1 в макрофаги и Т-лимфоциты предшествует связывание белка gp120 оболочки вируса с первичным рецептором CD4 клеточной мембраны, а также с хемокиновыми корецепторами CCR5 и/или CXCR4, взаимодействие с которыми активирует процесс слияния мембран, ведущий к проникновению вирусного генома в клетки-мишени (см., например, обзорные статьи [1–4]). При этом содержимое вирусной частицы проникает в цитоплазму клетки, где начинается процесс синтеза молекулы ДНК по шаблону вирусной РНК с участием фермента обратной транскриптазы [5]. Затем комплекс, состоящий из синтезированной ДНК и ряда вирусных и клеточных белков, проникает в ядро клетки-хозяина, где под действием вирусного фермента интегразы провирусная ДНК встраивается в ДНК хромосом [6]. В такой интегрированной форме, называемой провирусом, ВИЧ-1 может оставаться от нескольких часов до нескольких лет, прежде чем перейдет к следующей стадии жизненного цикла – транскрипции [7]. Транскрипция генома ВИЧ-1 находится под контролем белков Tat и Rev вируса, а также факторов транскрипции ДНК клетки-хозяина [8]. Транскрибированная пре-мРНК подвергается частичному или полному сплайсингу, либо транспортируется из ядра в неизменном виде. Из образованной таким образом мРНК на рибосомах клетки синтезируются различные вирусные белки, после чего на плазматической мембране происходит сборка новых вирусных частиц [9].

*andrianov@iboch.bas-net.by

В настоящее время большое внимание уделяется разработке лекарственных препаратов, терапевтическое действие которых основано на блокаде различных этапов репликационного цикла ВИЧ-1. В зависимости от механизма действия противовирусные препараты делятся на классы, включающие ингибиторы обратной транскриптазы (нуклеозидные, нуклеотидные и нуклеотидные), протеазы, интегразы, а также ингибиторы проникновения (слияния) [10–15]. Совместное использование этих препаратов формирует основу для высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), которая значительно повысила выживаемость многих пациентов, инфицированных ВИЧ [16]. Однако одной из главных проблем ВААРТ является высокая генетическая изменчивость ВИЧ-1, которая приводит к выработке устойчивости (резистентности) к определенному препарату через некоторое время после начала его применения [17]. Использование ВААРТ не только эффективно подавляет имеющуюся в организме разновидность вируса, но и существенно снижает уровень его мутаций, которые в дальнейшем могут привести к резистентности. Тем не менее, случаи проявления резистентности наблюдаются для всех типов используемых анти-ВИЧ-1 препаратов [16]. Кроме того, хотя используемые режимы ВААРТ являются эффективными для многих пациентов, их токсичность (вплоть до индивидуальной непереносимости), взаимодействие лекарств между собой, появление и передача резистентных штаммов [16] приводят к необходимости поиска новых антивирусных агентов с новыми механизмами действия. К числу таких агентов следует отнести ингибиторы проникновения ВИЧ-1 – химические соединения, способные вмешиваться в ранние стадии жизненного цикла вируса [15]. К преимуществам этих соединений можно отнести создание ими препятствия проникновению вируса в новые целевые клетки и уменьшение числа латентных резервуаров ВИЧ, а также возможность использования для профилактики ВИЧ-инфекции [18].

Проникновение вирусного генома в клетку-хозяина – первый этап репликационного цикла ВИЧ-1 – представляет собой перспективную мишень для нескольких типов противовирусных препаратов, таких как ингибиторы связывания белка gp120 с первичным рецептором CD4, антагонисты корецепторов CCR5 и CXCR4 и ингибиторы слияния оболочки вируса с мембраной чувствительной клетки [19]. Белки gp120 и CD4 являются мишенями для ингибиторов проникновения BMS-378806 [20] и TNX-355 [21]. Механизм действия BMS-378806 заключается в связывании этого соединения с фрагментом белка gp120, участвующим во взаимодействии с первичным рецептором CD4, и в последующем изменении конформации этого фрагмента таким образом, что узнавание вирусом молекулы CD4 становится невозможным [20]. Ингибитор ВИЧ-1 TNX-355 представляет собой анти-CD4 моноклональное антитело, которое путем взаимодействия с молекулой CD4 блокирует ее связывание с белком gp120 оболочки вируса [21]. Одобренный в 2003 году для клинического использования ингибитор слияния Энфувиртид [22–24] связывается с трансмембранным белком gp41 вируса и таким образом препятствует формированию “поры”, через которую геном вирусной частицы проникает в клетку-хозяина. Низкомолекулярные антагонисты корецептора CCR5 взаимодействуют с гидрофобным “карманом”, расположенным на его трансмембранных спиральных [25, 26]. Один из таких ингибиторов – Маравирик [27] – используется в практической медицине с 2007 года. Следует отметить, что в настоящее время обнаружено достаточно большое число ингибиторов проникновения ВИЧ-1 (см., например, [4, 28–30]), но только два из них – Энфувиртид и Маравирик – нашли широкое применение для терапии ВИЧ-инфекции. Тем не менее, как и другим противовирусным препаратам, этим анти-ВИЧ агентам присущ ряд недостатков [16, 28], что обуславливает актуальность поиска новых ингибиторов проникновения ВИЧ с широкой вирусной нейтрализацией и низкой токсичностью.

Цель исследования: осуществить виртуальный скрининг новых анти-ВИЧ агентов – потенциальных пептидомиметиков клеточного рецептора CD4 – и провести оценку их ингибиторной активности с последующим отбором молекул, формирующих перспективные базовые структуры для разработки противовирусных препаратов с широким спектром нейтрализующего действия.

Для достижения поставленной цели в работе решены следующие задачи:

1. Используя в качестве базовых элементов структуры аминокислотные остатки рецептора CD4, участвующие в специфических взаимодействиях с белком gp120 ВИЧ-1 [31], сформирован набор входных данных для web-сервера perMMsMIMIC (<http://mms.dsfarm.unipd.it/perMMsMIMIC/>) [32], с помощью которого идентифицированы химические соединения – наиболее вероятные пептидомиметики молекулы CD4.

2. Методами молекулярного докинга построены структурные комплексы полученных соединений с белком gp120 ВИЧ-1 и, исходя из величин оценочной функции, осуществлен отбор молекул, наиболее перспективных для дальнейших исследований.

3. Методами молекулярной динамики рассчитаны динамические траектории этих комплексов для лучших по данным докинга соединений и проведена оценка свободной энергии их образования

В результате выполненных исследований отобраны химические соединения, проявляющие, согласно расчетным данным, высокое сродство к CD4-связывающему участку белка gp120 ВИЧ-1 – функционально консервативному эпитопу оболочке вируса. В связи с этим найденные соединения рассматриваются как потенциальные ингибиторы проникновения ВИЧ-1 с широким спектром нейтрализующего действия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аминокислотные остатки рецептора CD4, критические для его связывания с белком gp120 ВИЧ-1, заимствовали из работы [31], в которой описан рентгеноструктурный комплекс gp120/CD4 с Fab-фрагментом моноклонального антитела 17b. Согласно данным работы [31], определяющий вклад в специфические взаимодействия молекулы CD4 с белком gp120 вносит участок 40–48 ее полипептидной цепи, на долю которого приходится 63% межатомных контактов, ответственных за формирование этой надмолекулярной структуры. Поэтому для поиска потенциальных пептидомиметиков рецептора CD4 в качестве базовой структуры использовали его нонапептидный сегмент Gln-40–Gly-41–Ser-42–Phe-43–Leu-44–Thr-45–Lys-46–Gly-47–Pro-48. Для расширения набора входных данных, анализируемых web-сервером perMMsMIMIC [32], проводили разбиение этого нонапептида на отдельные фрагменты, а также привлекали остатки Lys-29, Gln-33, Lys-35 и Arg-59 молекулы CD4, входящие в сайт связывания с белком gp120 ВИЧ-1 [31]. При этом рассматривали различные комбинации функциональных групп отобранных аминокислотных остатков CD4, которые представляли их боковые цепи, N- и C-концевые сегменты. Полученный таким образом набор входных данных включал одиннадцать разных элементов структуры клеточного рецептора CD4 (табл. 1).

Поиск пептидомиметиков осуществляли в базе данных MMsINC (<http://mms.dsfarm.unipd.it/MMsINC.html>) [33], содержащей 17 миллионов конформеров, рассчитанных для 3,9 миллиона коммерчески доступных химических соединений, с привлечением пяти методов, используемых программным обеспечением web-сервера perMMsMIMIC [32]. Эти методы включают различные комбинации алгоритма “сверхбыстрого распознавания формы” [34], суть которого состоит в обнаружении молекул, геометрически соответствующих заданному пептиду, с алгоритмами поиска по фармакофорам [35, 36] – молекулярным остовам, несущим существенные признаки,

ответственные за биологическую активность. В результате получили набор химических соединений – потенциальных пептидомиметиков молекулы CD4, эффективность связывания которых с белком gp120 ВИЧ-1 оценивали методом молекулярного докинга.

Таблица 1. Набор входных данных, использованный для поиска потенциальных пептидомиметиков молекулы CD4 в базе данных MMsINC

№	Входные данные*
1	Gln-40(S), Gly-41(NC), Ser-42(S), Phe-43(S), Leu-44(N), Thr-45(NC), Lys-46(N), Gly-47(NC), Pro-48(S)
2	Gln-40(S), Gly-41(C), Ser-42(S), Phe-43(S), Leu-44(S), Thr-45(S), Lys-46(S), Gly-47(C), Pro-48(S)
3	Ser-42(S), Phe-43(NSC), Leu-44(N), Lys-46(N)
4	Ser-42(S), Phe-43(NSC), Leu-44(NC), Lys-46(NC)
5	Gln-40(S), Gly-41(NC), Ser-42(S), Phe-43(NSC), Leu-44(NC)
6	Gln-40(S), Gly-41(NC), Ser-42(S), Phe-43(NSC), Leu-44(NC), Thr-45(NC)
7	Gln-40(S), Gly-41(NC), Ser-42(S), Phe-43(NSC), Leu-44(NC), Thr-45(NC), Lys-46(NC)
8	Ser-42(S), Phe-43(NSC), Leu-44(NC), Arg-59(S)
9	Ser-42(S), Phe-43(NSC), Leu-44(NC), Lys-46(NC), Arg-59(S)
10	Gln-40(S), Gly-41(NC), Ser-42(S), Phe-43(NSC), Leu-44(NC), Arg-59(S)
11	Lys-29(S), Gln-33(C), Lys-35(NC), Lys-46(N)

*Приведены номера остатков молекулы CD4 согласно их нумерации в структурном комплексе с белком gp120 ВИЧ-1 и антителом 17b [31]. В круглых скобках буквами S, N, C обозначены, соответственно, боковые цепи, N- и C-концы аминокислотных остатков.

Молекулярный докинг выполняли с помощью программы AutoDock Vina [37] с учетом конформационной подвижности лиганда, перебирая все его возможные ориентации относительно молекулы-рецептора. Трехмерную структуру белка gp120 выделяли из его комплекса с рецептором CD4 и антителом 17b, установленного методом рентгеноструктурного анализа [31] (код 1GC1 в Международном банке белков; <http://www.rcsb.org/pdb/>; [38, 39]). Атомы водорода добавляли с использованием пакета AutoDockTools (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>). Для всех потенциальных пептидомиметиков анализировали комплексы, лучшие по величине энергии связывания, и идентифицировали соединения, взаимодействующие, как и CD4, с CD4-связывающим участком белка gp120. Для дальнейших исследований отобрали 26 наиболее предпочтительных (по значению оценочной функции программы AutoDock Vina [37]) структурных комплексов, которые подвергли молекулярно-динамическим (МД) расчетам.

МД расчеты проводили с помощью программного пакета Amber 11 (<http://ambermd.org/>) [40] в силовом поле Amber (набор параметров ff10) с явным заданием растворителя (трехточечная модель воды TIP3P [41]). Для параметризации лигандов использовали обобщенное силовое поле AMBER (<http://ambermd.org/>) [42]. Начальные координаты атомов водорода белка gp120 определяли с привлечением модуля xleap пакета AMBERTools 1.5 (<http://ambermd.org/>) [40]. Структурный комплекс помещали в ячейку в форме усеченного октаэдра таким образом, чтобы наименьшее расстояние между ее гранями и атомами исследуемой системы превосходило 10 Å,

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 давление в системе, установленное на значении 1 атм, посредством динамического изменения размеров ячейки согласно схеме Берендсена и соавт. (<http://ambermd.org/>) [40] 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. На заключительном шаге моделирования проводили расчет МД траектории длительностью 30 нс. Для контроля температуры использовали термостат Ланжевена (<http://ambermd.org/doc10/>) [40] с частотой столкновений $2,0 \text{ пс}^{-1}$. Интегрирование уравнений движения Ньютона осуществляли с помощью алгоритма “leap-frog” (<http://ambermd.org/doc10/>) [40] с шагом интегрирования 2,0 фс. Для фиксации длин всех связей, в образовании которых участвуют атомы водорода, применяли алгоритм SHAKE (<http://ambermd.org/>) [43]. Максимальное расстояние, на котором учитывали невалентные взаимодействия, задавали равным 8,0 Å.

В качестве критерия стабильности комплексов использовали средние значения свободной энергии их образования, которые вычисляли с помощью процедуры MM-PB/SA [44], входящей в состав пакета AMBER 11 [40]. При этом первые 5 нс МД моделирования отводили на релаксацию системы и не учитывали в расчетах. Свободную энергию связывания вычисляли для 500 точек МД траектории, разделенных временным интервалом длительностью 50 нс.

Межмолекулярные водородные связи в статических моделях комплексов потенциальных пептидомиметиков CD4 с белком gp120 ВИЧ-1 анализировали с помощью программы BINANA [45]. Для определения водородных связей в динамических структурах комплексов использовали процедуру ptraj, встроенную в программный пакет AMBER 11 [40]. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия между пептидомиметиками CD4 и белком gp120 идентифицировали средствами программы Ligplot [46].

Расчеты проводили на компьютерном кластере СКИФ-ОИПИ Объединенного института проблем информатики НАН Беларуси [47].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Виртуальный скрининг базы данных MMsINC [33] позволил обнаружить 3914 химических соединений, удовлетворяющих заданным критериям поиска, направленного на идентификацию потенциальных пептидомиметиков клеточного рецептора CD4. В результате молекулярного докинга этих соединений с белком gp120, МД моделирования и последующего расчета свободной энергии образования комплексов для заключительного анализа были отобраны пять молекул – наиболее вероятных ингибиторов проникновения ВИЧ-1, способных блокировать CD4-связывающий участок белка gp120. Краткая информация об этих молекулах приведена в табл. 2, а на рис. 1 показаны их двумерные структуры.

Визуализация структурных комплексов отобранных соединений с белком gp120 ВИЧ-1 (рис. 2) свидетельствует о том, что они используют для связывания с вирусом один и тот же участок гликопротеина, формирующий на его поверхности молекулярный “карман”, называемый Phe-43-связывающей полостью [31]. По данным рентгеновской кристаллографии [31], остатки Glu-370, Ile-371, Asn-425, Met-426, Trp-

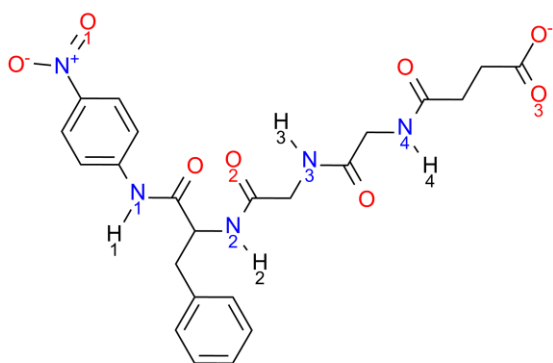
427 и Gly-473 этого участка белка gp120 участвуют в специфическом взаимодействии с Phe-43 молекулы CD4, которое является одним из ключевых на первом этапе проникновения вируса в клетку-хозяина. Из анализа комплексов, приведенных на рис. 2, следует, что одно из ароматических колец пептидомиметиков (рис. 1) погружается в молекулярный “карман” CD4-связывающего участка белка gp120 и блокирует указанные аминокислоты гликопротеина, имитируя механизм его взаимодействия с бензольным кольцом остатка Phe-43 клеточного рецептора.

Таблица 2. Химические соединения, идентифицированные в базе данных MMsINC, как наиболее вероятные пептидомиметики молекулы CD4^a

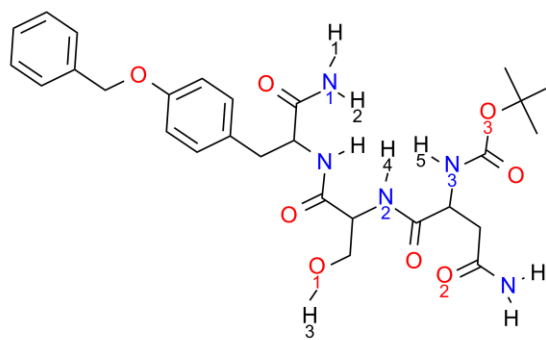
Код соединения	Систематическое название	Химическая формула	Масса (Да)	LogP ^b	Число доно-ров Н-связи	Число акцеп-торов Н-связи
MMs03927209	(R)-4-((2-((2-((1-((4-нитрофенил)амино)-1-оксо-3-фенил-пропан-2-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-4-оксобутаноат	C ₂₃ H ₂₄ N ₅ O ₈ ⁻	498,5	-0,98	4	4
MMs01102125	<i>Трет</i> -бутил((R)-4-амино-1-(((R)-1-(((S)-1-амино-3-(4-(бензилокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-гидрокси-1-оксопропан-2-ил)амино)-1,4-диоксобутан-2-ил)карбамат	C ₂₈ H ₃₇ N ₅ O ₈	571,6	0,29	6	7
MMs00029542	(1S,3S,4R,5R)-N-((S)-1-амино-3-(4-метоксифенил)-1-оксопропан-2-ил)-3-(3-(2,4-дифторфенил)уреидо)-1,4,5-тригидрокси-циклогексанкарбоксамид	C ₂₄ H ₂₈ F ₂ N ₄ O ₇	522,5	-0,077	7	7
MMs01087500	<i>трет</i> -бутил(2-(((R)-1-(((2S,3S)-1-амино-3-гидрокси-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-(4-(бензилокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-2-оксоэтил)карбамат	C ₂₇ H ₃₆ N ₄ O ₇	528,6	1,43	5	6
MMs01087509	<i>трет</i> -бутил((R)-1-(((R)-1-(((2S,3R)-1-амино-3-гидрокси-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-(4-(бензилокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенил-пропан-2-ил)карбамат	C ₃₄ H ₄₂ N ₄ O ₇	618,7	3,05	5	6

^aПриведенные данные заимствованы из базы данных MMsINC [33];

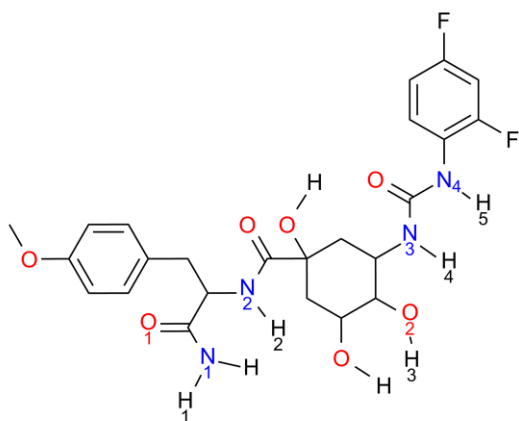
^bLogP – липофильность соединения (коэффициент распределения в системе н-октанол-вода).



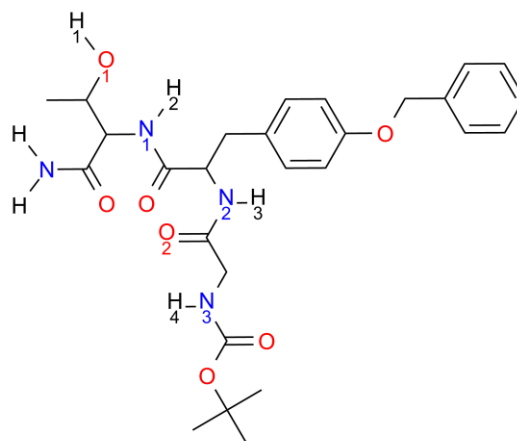
MMs03927209



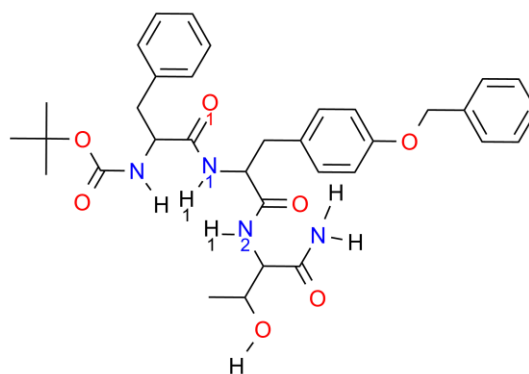
MMs01102125



MMs00029542



MMs01087500



MMs01087509

Рис. 1. Двумерные структуры химических соединений – потенциальных пептидомиметиков клеточного рецептора CD4. Указаны коды соединений в базе данных MMsINC [33]. Отмечены элементы структуры пептидомиметиков, участвующие в образовании водородных связей с белком gp120 ВИЧ-1 (табл. 3).

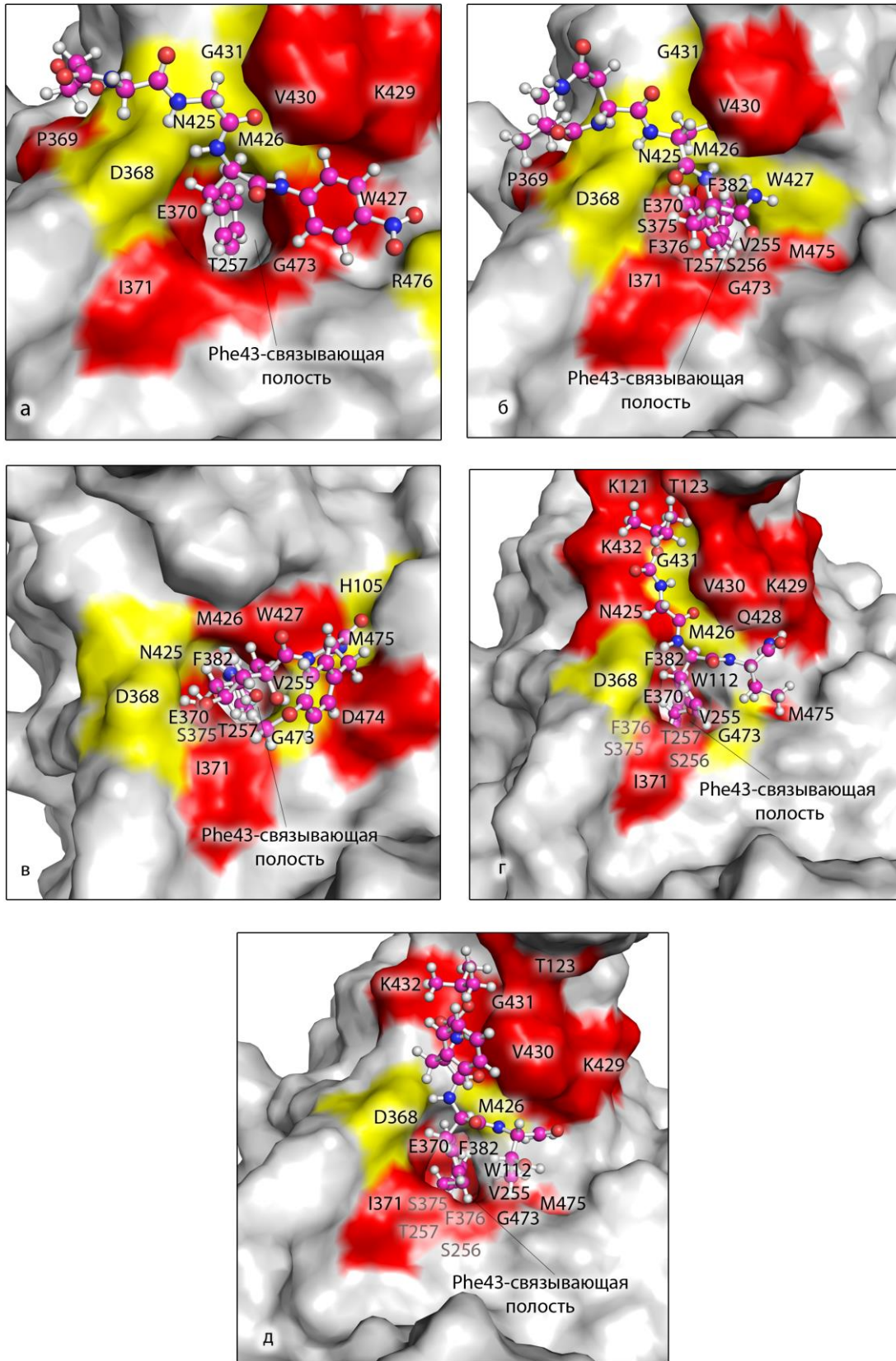


Рис. 2. Структурные комплексы химических соединений MMs03927209 (а), MMs01102125 (б), MMs00029542 (в), MMs01087500 (г) и MMs01087509 (д) с белком gp120 ВИЧ-1. Показан фрагмент белка gp120, формирующий сайт связывания для пептидомиметиков CD4. Отмечены аминокислотные остатки гликопротеина, образующие водородные связи и ван-дер-ваальсовы контакты с этими соединениями (табл. 3).

Таблица 3. Межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся в структурных комплексах химических соединений MMs03927209, MMs01102125, MMs00029542, MMs01087500 и MMs01087509 с белком gp120 ВИЧ-1

Пептидомиметик	Водородная связь ^{а, в}		Ван-дер-ваальсовы контакты ^{б, в}
	Статическая модель	Динамическая модель	
MMs03927209	N ₁ H ₁ ...O[M ₄₂₆] ¹ O ₁ ...HN*[R ₄₇₆] N ₂ H ₂ ...O _{D2} [D ₃₆₈] ¹ O ₂ ...HN[G ₄₃₁] N ₃ H ₃ ...O _{D2} [D ₃₆₈] ¹ N ₄ H ₄ ...O*[N ₄₂₅] ¹ O ₃ ...HN*[N ₄₂₅] ¹	N ₁ H ₁ ...O[M ₄₂₆] ¹ (80.5%) O ₂ ...HN[G ₄₃₁](75.0%) O ₃ ...HN*[N ₄₂₅] ¹ (63.8%) N ₄ H ₄ ...O _{D2} [D ₃₆₈] ¹ (56.0%) N ₃ H ₃ ...O _{D2} [D ₃₆₈] ¹ (40.5%) N ₄ H ₄ ...O _{D1} [D ₃₆₈] ¹ (40.3%) N ₂ H ₂ ...O _{D1} [D ₃₆₈] ¹ (36.9%) N ₂ H ₂ ...O _{D1} [D ₃₆₈] ¹ (32.1%)	T257, P369, E370 ¹ , I371 ¹ , W427 ¹ , K429, V430, G473 ¹
MMs01102125	N ₂ H ₄ ...O _{D2} [D ₃₆₈] ¹ N ₃ H ₅ ...O*[N ₄₂₅] ¹ O ₃ ...HN*[N ₄₂₅] ¹ O ₁ H ₃ ...O[M ₄₂₆] ¹ O ₁ ...HN[G ₄₃₁] N ₁ H ₁ ...O[M ₄₂₆] ¹ N ₁ H ₂ ...O[W ₄₂₇] ¹	N ₃ H ₅ ...O _{D2} [D ₃₆₈] ¹ (66.5%) O ₁ H ₃ ...O[M ₄₂₆] ¹ (59.7%) O ₂ ...HN[G ₄₃₁](58.7%) N ₃ H ₅ ...O _{D1} [D ₃₆₈] ¹ (34.2%) N ₂ H ₄ ...O _{D1} [D ₃₆₈] ¹ (30.6%)	V255, S256, T257, P369, E370 ¹ , I371 ¹ , S375, F376, F382, V430, G473 ¹ , M475
MMs00029542	N ₂ H ₂ ...O[G ₄₇₃] ¹ N ₁ H ₁ ...O[G ₄₇₃] ¹ N ₁ ...HN[M ₄₇₅] O ₁ ...HN*[H ₁₀₅] N ₃ H ₄ ...O[N ₄₂₅] ¹ N ₄ H ₅ ...O[N ₄₂₅] ¹ O ₂ H ₃ ...O _{D2} [D ₃₆₈] ¹	N ₄ H ₅ ...O[N ₄₂₅] ¹ (76.8%) N ₁ H ₁ ...O[G ₄₇₃] ¹ (61.1%) N ₃ H ₄ ...O[N ₄₂₅] ¹ (54.3%) O ₂ H ₃ ...O _{D2} [D ₃₆₈] ¹ (53.6%) N ₂ H ₂ ...O[G ₄₇₃] ¹ (48.3%) O ₂ H ₃ ...O _{D1} [D ₃₆₈] ¹ (38.8%)	V255, T257, E370 ¹ , I371 ¹ , S375, F382, M426 ¹ , W427 ¹ , D474
MMs01087500	N ₁ H ₂ ...O[M ₄₂₆] ¹ O ₁ H ₁ ...O[G ₄₇₃] ¹ N ₂ H ₃ ...O _{D2} [D ₃₆₈] ¹ O ₂ ...HN[G ₄₃₁] N ₃ H ₄ ...O[G ₄₃₁]	O ₁ H ₁ ...O[G ₄₇₃] ¹ (78.4%) N ₁ H ₂ ...O[M ₄₂₆] ¹ (52.2%) O ₂ ...HN[G ₄₃₁](46.5%) N ₃ H ₄ ...O[G ₄₃₁](30.1%)	W112, K121, T123, V255, S256, T257, E370 ¹ , I371 ¹ , S375, F376, F382, N425 ¹ , Q428, K429, V430, K432, M475
MMs01087509	N ₂ H ₂ ...O[M ₄₂₆] ¹ N ₁ H ₁ ...O _{D2} [D ₃₆₈] ¹	O ₁ ...HN[G ₄₃₁](67.1%)	W112, T123, V255, S256, T257, E370 ¹ , I371 ¹ , S375, F376, F382, K429, V430, G431, K432, G473 ¹ , M475

^аПервыми указаны доноры или акцепторы водородной связи, принадлежащие молекуле пептидомиметика, а вторыми – соответствующие функциональные группы аминокислотных остатков белка gp120, приведенных в квадратных скобках в однобуквенном коде. Звездочками отмечены атомы или группы, принадлежащие боковым цепям этих остатков. Нижние индексы атомов пептидомиметиков согласуются с их нумерацией, приведенной на рис. 1. В круглых скобках представлены частоты встречаемости водородных связей на МД траекториях структурных комплексов. Приведены водородные связи с частотой, превышающей 30%.

^бАминокислотные остатки белка gp120, образующие ван-дер-ваальсовы контакты с пептидомиметиками рецептора CD4.

^вНадстрочной цифрой 1 отмечены остатки белка gp120, критические для связывания ВИЧ-1 с молекулой CD4 [31].

Анализ межмолекулярных взаимодействий, реализующихся в статических моделях структурных комплексов найденных соединений с белком gp120, показывает (табл. 3), что существенный вклад в их стабилизацию вносят водородные связи с участием аминокислотных остатков gp120, критических для его связывания с первичным рецептором CD4. Так, согласно проведенным расчетам (табл. 3), все рассматриваемые соединения образуют водородные связи с Asp-368 белка gp120 – остатком, который, участвуя в донорно-акцепторных взаимодействиях с Arg-59 молекулы CD4, играет важную роль в связывании ВИЧ-1 с клеткой-мишенью [31]. Среди аминокислот белка gp120, формирующих водородные связи с пептидомиметиками CD4 (табл. 3), следует также отметить Asn-425 (соединения MMs03927209, MMs01102125, MMs00029542), Met-426 (MMs03927209, MMs01102125, MMs01087500, MMs01087509), Gly-473 (MMs00029542, MMs01087500) и Trp-427 (MMs01102125), используемые вирусом для взаимодействия с остатком Phe-43 клеточного рецептора CD4 [31].

Наряду с водородными связями, в структурных комплексах анализируемых соединений с белком gp120 реализуются ван-дер-ваальсовы взаимодействия, в которые вовлечены функционально важные аминокислоты CD4-связывающего участка гликопротеина (табл. 3). В частности, во всех рассматриваемых случаях образование ван-дер-ваальсовых контактов между пептидомиметиками и белком gp120 приводит к блокированию остатков Glu-370 и Pe-371, которые, как было отмечено выше, специфически взаимодействуют с Phe-43 молекулы CD4. Кроме этих двух остатков, в “блокаде” оказываются такие аминокислоты Phe-43-связывающей полости, как Gly-473 (соединения MMs03927209, MMs01102125 и MMs01087509), Asn-425 (MMs01087500), Met-426 (MMs00029542) и Trp-427 (MMs03927209 и MMs00029542).

Таким образом, проведенные расчеты показывают, что химические соединения, найденные в результате виртуального скрининга базы данных MMsINC, характеризуются близким механизмом взаимодействия с белком gp120 ВИЧ-1, основу которого формируют межмолекулярные водородные связи и ван-дер-ваальсовы контакты, приводящие к блокаде аминокислотных остатков гликопротеина, ответственных за специфическое связывание ВИЧ-1 с клеточным рецептором CD4 (табл. 3).

Данные МД моделирования структурных комплексов пептидомиметиков CD4 с белком gp120 подтверждают выводы, сделанные на основе анализа результатов молекулярного докинга. Согласно этим данным (табл. 3), на МД траекториях преобладают структуры, в которых присутствуют межмолекулярные водородные связи с участием критических для связывания с CD4 остатков gp120, таких как Asp-368 (соединения MMs03927209, MMs01102125, MMs00029542), Asn-425 (MMs03927209, MMs00029542), Met-426 (MMs03927209, MMs01102125, MMs01087500) и Gly-473 (MMs00029542, MMs01087500). Структурные комплексы, построенные методами молекулярного докинга, энергетически стабильны, о чем свидетельствуют средние значения свободной энергии их образования и соответствующие величины стандартных отклонений (табл. 4). Анализ данных табл. 4 показывает, что межмолекулярные взаимодействия соединений MMs03927209, MMs01102125 и MMs00029542 с белком gp120 характеризуются более низкими значениями энергии связывания по сравнению с величиной $-9,5 \pm 0,1$ ккал/моль, измеренной методом изотермической титрационной калориметрии для комплекса gp120/CD4 [48]. Близкие к этой экспериментальной величине значения свободной энергии предсказаны для соединений MMs01087500 и MMs01087509 (табл. 4).

Очевидно, что временной интервал, использованный нами для проведения МД расчетов, недостаточен для того, чтобы проанализировать все возможные структурные варианты комплексов химических соединений MMs03927209, MMs01102125, MMs00029542, MMs01087500 и MMs01087509 с белком gp120 ВИЧ-1. Однако результаты расчетов, выполненных для пяти стартовых моделей, представляющих

статические структуры комплексов пяти разных соединений с белком gp120 ВИЧ-1, показывают, что во всех рассматриваемых случаях они обладают сходными динамическими характеристиками. Это позволяет предполагать, что полученные с помощью молекулярной динамики результаты адекватно отражают основные динамические особенности исследованных надмолекулярных структур.

Таблица 4. Средние значения свободной энергии $\langle \Delta G \rangle$ образования комплексов пептидомиметиков CD4 с белком gp120 ВИЧ-1 и соответствующие им стандартные отклонения ΔG_{STD}

Пептидомиметик	$\langle \Delta H \rangle$ ккал/моль	$(\Delta H)_{STD}$ ккал/моль	$\langle T\Delta S \rangle$ ккал/моль	$(T\Delta S)_{STD}$ ккал/моль	$\langle \Delta G \rangle$ ккал/моль	ΔG_{STD} ккал/моль
MMs03927209	-47,4	4,1	-31,6	10,4	-15,8	6,5
MMs01102125	-39,9	4,3	-26,6	9,6	-13,3	6,4
MMs00029542	-36,1	5,6	-24,5	6,2	-11,6	5,9
MMs01087500	-38,7	5,7	-29,7	9,1	-9,0	6,9
MMs01087509	-39,1	5,3	-32,0	8,2	-7,1	6,6

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совместный анализ статических и динамических моделей структурных комплексов соединений MMs03927209, MMs01102125, MMs00029542, MMs01087500 и MMs01087509 с белком gp120 ВИЧ-1 свидетельствует о наличии специфических и эффективных взаимодействий между ними, приводящих к блокаде аминокислотных остатков гликопротеина, критических для связывания вируса с первичным рецептором CD4 клетки-мишени (рис. 2). По данным молекулярной динамики, комплексы этих соединений с белком gp120 не испытывают существенных структурных преобразований в течение МД расчетов и характеризуются низкими значениями свободной энергии образования надмолекулярных структур (табл. 4).

Таким образом, данные молекулярного моделирования указывают на то, что химические соединения, обнаруженные в результате компьютерного поиска в базе данных MMsINC, проявляют высокое сродство к функционально консервативному участку белка gp120 ВИЧ-1. Поэтому эти соединения должны пройти тестирование на биологическую активность против широкого набора генетически различающихся модификаций вируса.

В заключение отметим, что один из потенциальных пептидомиметиков CD4 – соединение MMs03927209 – полностью удовлетворяет “правилам пяти” Липинского [49], накладывающим на лиганд, взаимодействующий с молекулой-мишенью, условия подобия лекарству. В связи с этим данное соединение, лучшее по величине свободной энергии связывания с белком gp120 ВИЧ-1 (табл. 4), может рассматриваться в качестве первоочередного кандидата на роль базовой структуры для создания эффективных анти-ВИЧ препаратов нового поколения.

Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований “Конвергенция” (проект 3.2.05).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hartley O., Klasse P.J., Sattentau Q.J., Moore J.P. V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005. V. 21. P. 171–189.
2. Sirois S., Sing T., Chou K.C. HIV-1 gp120 V3 loop for structure-based drug design. *Curr. Protein Pept. Sci*. 2005. V. 6. P. 413–422.
3. Sirois S., Touaibia M., Chou K.C., Roy R. Glycosylation of HIV-1 gp120 V3 loop: towards the rational design of a synthetic carbohydrate vaccine. *Curr. Med. Chem*. 2007. V. 14. P. 3232–3242.
4. Andrianov A.M. HIV-1 gp120 V3 loop for anti-AIDS drug discovery: computer-aided approaches to the problem solving. *Expert Opin. Drug Discov*. 2011. V. 6. P. 419–435.
5. Hu W.S., Hughes S.H. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2012. V. 2. N 10. P. a006882.
6. Miller M.D., Farnet C.M., Bushman F.D. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol*. 1997. V. 71. N 7. P. 5382–5390.
7. Engelman A., Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat. Rev. Microbiol*. 2012. V. 10. N 4. P. 279–290.
8. Wei P., Garber M.E., Fang S.M., Fischer W.H., Jones K. A. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*. 1998. V. 92. N 4. P. 451–462.
9. Zimmerman C., Klein K.C., Kiser P.K., Singh A.R., Firestein B.L., Riba S.C., Lingappa J.R. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature*. 2002. V. 415. N. 6867. P. 88–92.
10. De Clercq E. New approaches toward anti-HIV chemotherapy. *J. Med. Chem*. 2005. V. 48. P. 1297–1313.
11. Este J.A. and Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet*. 2007. V. 370. P. 81–88.
12. Rusconi S., Scozzafava A., Mastrolorenzo A., Supuran C.T. An update in the development of HIV entry inhibitors. *Curr. Topics in Med. Chem*. 2007. V. 7. P. 1273–1289.
13. Ryser H.J.-P., Fluckiger R. Progress in targeting HIV-1 entry. *Drug Discov. Today*. 2005. V. 10. P. 1085–1094.
14. Adamson C.S., Freed E.O. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral Res*. 2010. V. 85. P. 119–141.
15. Tilton J.C., Doms R.W. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res*. 2010. V. 85. P. 91–100.
16. Arts E.J., Hazuda D.J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2012. V. 2. N 4. P. a007161.
17. Orsega S. Treatment of adult HIV infection: antiretroviral update and overview. *JNP*. 2007. V. 10. P. 612–624.
18. Vermeire K., Schols D., Bell T.W. Inhibitors of HIV infection via the cellular CD4 receptor. *Curr. Med. Chem*. 2006. V. 13. P. 731–743.
19. Este J.A., Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet*. 2007. V. 370. N 9581. P. 81–88.
20. Lin P.-F., Blair W., Wang T., Spicer T., Guo Q., Zhou N., Gong Y.-F., Wang H.-G. H., Rose R., Yamanaka G., Robinson B., Li C.-B., Fridell R., Deminie C., Demers G., Yang Z., Zadjura L., Meanwell N., Colonna R. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. N 19. P. 11013–11018.
21. Reimann K.A., Lin W., Bixler S., Browning B., Ehrenfels B.N., Lucci J., Miatkowski K., Olson D., Parish T.H., Rosa M.D., Oleson F.B., Hsu Y.M., Padlan E.A., Letvin N.L., Burkly L.C. A humanized form of a CD4-specific monoclonal antibody exhibits decreased antigenicity and prolonged plasma half-life in rhesus monkeys while retaining

- its unique biological and antiviral properties. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1997. V. 13. N 11. P. 933–943.
22. Lalezari J.P., Henry K., O'Hearn M., Montaner J.S.G., Piliero P.J., Trottier B., Walmsley S., Cohen C., Kuritzkes D.R., Eron J.J., Chung J., DeMasi R., Donatucci L., Drobnes C., Delehanty J., Salgo M. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N. Engl. J. Med.* 2003. V. 348. N 22. P. 2175–2185.
 23. Duffalo M.L., James C.W. Enfuvirtide: a novel agent for the treatment of HIV-1 infection. *Ann. Pharmacother.* 2003. V. 37. P.1448–1456.
 24. Hardy H., Skolnik P.R. Enfuvirtide, a new fusion inhibitor for therapy of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy*. 2004. V. 24. P.198–211.
 25. Dragic T., Trkola A., Thompson D.A.D., Cormier E.G., Kajumo F.A., Maxwell E., Lin S.W., Ying W., Smith S.O., Sakmar T.P., Moore J.P. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. N 10. P. 5639–5644.
 26. Tsamis F., Gavrilov S., Kajumo F., Seibert C., Kuhmann S., Ketas T., Trkola A., Palani A., Clader J.W., Tagat J.R., McCombie S., Baroudy B., Moore J.P., Sakmar T.P., Dragic T. Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. *J. Virol.* 2003. V. 77. N 9. P. 5201–5208.
 27. Meanwell N.A., Kadow J.F. Maraviroc, a chemokine CCR5 receptor antagonist for the treatment of HIV infection and AIDS. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2007. V. 8. P. 669–681.
 28. Briz V., Poveda E., Soriano V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006. V. 57. P. 619–627.
 29. Haim H., Si Z., Madani N., Wang L., Courter J.R., Princiotta A., Kassa A., DeGrace M., McGee-Estrada K., Mefford M., Dana Gabuzda D., Smith A.B., Sodroski J. Soluble CD4 and CD4-mimetic compounds inhibit HIV-1 infection by induction of a short-lived activated state. *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. N 4. P. e1000360.
 30. Curreli F., Choudhury S., Pyatkin I., Zagorodnikov V.P., Bulay A.K., Altieri A., Do Kwon Y., Kwong P.D., Debnath A.K. Design, synthesis and antiviral activity of entry inhibitors that target the CD4-binding site of HIV-1. *J. Med. Chem.* 2012. V. 55. P. 4764–4775.
 31. 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. V. 393. P. 648–659.
 32. Floris M., Masciocchi J., Fanton M., Moro S. Swimming into peptidomimetic chemical space using pepMMsMIMIC. *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. 261–269.
 33. Masciocchi J., Frau G., Fanton M., Sturlese M., Floris M., Pireddu L., Palla P., Cedrati F., Rodriguez-Tome P., Moro S. MMsINC: a large-scale chemoinformatics database. *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. D284–D290.
 34. Ballester P.J., Richards W.G. Ultrafast shape recognition to search compound databases for similar molecular shapes. *J. Comput. Chem.* 2007. V. 28. P. 1711–1723.
 35. Mason J.S., Morize I., Menard P.R., Cheney D.L., Hulme C., Labaudiniere R.F. New 4-point pharmacophore method for molecular similarity and diversity applications: overview of the method and applications, including a novel approach to the design of combinatorial libraries containing privileged substructures. *J. Med. Chem.* 1999. V. 42. P. 3251–3264.
 36. Karnachi P., Kulkarni A. Application of pharmacophore fingerprints to structure-based design and data mining. In: *Pharmacophores and Pharmacophore Searches*. Eds. Langer T., Hoffmann R.D. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2006. P. 193–206.

37. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. P. 455–461.
38. Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B., Meyer E.F., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. The protein data bank. A computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 1977. V. 112. P. 535–542.
39. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 235–242.
40. Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Crowley M., Walker R.C., Zhang W., K. Merz K.M., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Kolossváry I., Wong K.F., Paesani F., Vanicek J., Wu X., Brozell S.R., Steinbrecher T., Gohlke H., Yang L., Tan C., Mongan J., Hornak V., Cui G., Mathews D.H., Seetin M.G., Sagui C., Babin V., Kollman P.A. *AMBER 11*. San Francisco: University of California, 2010.
41. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 1983. V. 79. P. 926–935.
42. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. P. 1157–1174.
43. Ryckaert J.P., Ciccotti G., Berendsen H.J.C. Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* 1977. V. 23. P. 327–341.
44. Massova I., Kollman P.A. Computational alanine scanning to probe protein-protein interactions: a novel approach to evaluate binding free energies. *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 121. P. 8133–8143.
45. Durranta J.D., McCammon J.A. BINANA: A novel algorithm for ligand-binding characterization. *J. Mol. Graph. Model.* 2011. V. 29. P. 888–893.
46. McDonald I.K., Thornton J.M. Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J. Mol. Biol.* 1994. V. 238. P. 777–793.
47. Абламейко С.В., Абрамов С.М., Анищенко В.В., Медведев С.В., Парамонов Н.Н., Чиж О.П. *Суперкомпьютерные конфигурации СКИФ*. Минск: Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, 2005. 170 с.
48. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 9026–9031.
49. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2001. V. 46. P. 3–26.

Материал поступил в редакцию 04.08.2014, опубликован 15.10.2014.