

А.И. Рунейский

**ИССЛЕДОВАНИЕ IN SILICO ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ
ПРОИЗВОДНЫХ ДИХЛОРОФЕНИЛПИРИДИНА**

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. А.В. Волчек

Кафедра фармакологии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A.I. Runeiski

**IN SILICO STUDY OF ANTI-VIRAL ACTIVITY OF
DICHLOROPHENYLPYRIDINE DERIVATIVES**

Tutor: associate professor A.V. Vauchok

Department of Pharmacology

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. SARS-CoV-2 — новый коронавирус. Имеет в своем шиповом белке сайт расщепления фурина, который отсутствует у других коронавирусов. В работе на основе дихлорфенилпиридина выполнен дизайн различных его производных *in silico* и проведен молекулярный докинг с фурином. Выявлен наилучший лиганд, проанализированы его пространственная структура и характер взаимодействий с рецептором.

Ключевые слова: фурин, SARS-CoV-2, докинг.

Resume. SARS-CoV-2 is a new coronavirus. It has a furin cleavage site in its spike protein, which is absent in other coronaviruses. In this work, based on dichlorophenylpyridine, various of its derivatives were designed in silico and molecular docking with furin was carried out. The best ligand was identified, its spatial structure and the nature of interactions with the receptor were analyzed.

Keywords: furin, SARS-CoV-2, docking

Актуальность. Коронавирус SARS Covid-19 вызывает острую инфекцию с воздушно-капельным распространением. В настоящее время не существует эффективного этиологического лечения данного заболевания. Установлено, что проникновение вируса в клетку требует гидролиза S белка в конкретных сайтах расщепления, характеризующихся определенной последовательностью аминокислот основного характера. Полагают, что эти сайты расщепляются пропротеинконвертазой фурином, что способствует слиянию мембран и инфицированию клетки вирусом. Расщепление S протеина вируса на субъединицы S1 и S2 фурином имеет важнейшее значение для эффективной репликации, передачи и патогенности вируса в дыхательных путях [3]. Фурин является Ca^{2+} -зависимой сериновой протеиназой, участвующей в посттрансляционной модификации различных белков в аппарате Гольджи, в том числе спайк гликопротеина SARS Covid-19. Было показано, что ингибиторы фурина могут использоваться для уменьшения распространения вируса [7]. Однако, для разработки потенциального лекарственного средства необходимо создать соединение, выполняющее ряд требований: оно должно обладать устойчивостью, способностью проникать через клеточные мембраны, низкой токсичностью и приемлемыми побочными эффектами [4]. Таким образом, фурин является перспективной мишенью для разработки лекарственных средств для лечения пациентов с SARS Covid-19 [5].

Цель: исследование *in silico* эффективности связывания производных дихлорфенилпиридина с белком-мишенью фурином для выявления наиболее качественных в отношении противовирусной активности образцов.

Задачи:

1. Провести молекулярный докинг и показать характеристики связывания различных производных дихлорофенилпиридина с фурином.

2. Установить наиболее перспективный лиганд в отношении противовирусной активности.

3. Провести сравнительную характеристику взаимодействий, обеспечивающих связывание с рецептором, наиболее успешного лиганда и референтной структуры.

Материалы и методы. Дизайн лигандов выполнен с использованием пакета программ ChemOffice. Трёхмерная структура комплекса фурина и ингибитора 1 (3-(4-(5-(4-((4-(ацетамидометил) пиперидин-1-иум-1-ил)метил)-6-(3,5-бис(хлоранил)фенил) пиридин-2-ил)оксипиримидин-2-ил)пиперазин-1-иум-1-ил)пропаноата) с установленным ингибирующим действием была взята из базы данных Protein Data Bank [1,2] (7QXY). Для молекулярного докинга *in silico* использовался ряд специализированных программ: AutoDock 4 [6] – для подготовки к стыковке рецептора и лиганд-белковых взаимодействий; онлайн-сервисы Proteins Plus, PLIP и программа PyMOL - для визуализации полученных соединений, а также для дальнейшего анализа архитектуры и энергетической составляющей полученного комплекса; программа OpenBabelGUI применяли в качестве конвертера различных форматов, требуемых программой AutoDock 4. Для оценки и сравнения полученных результатов использовались два основных показателя взаимодействия белка и малых молекул: величина свободной энергии Гиббса, энергия связывания (E_b) и константа ингибирования (K_i).

Результаты и их обсуждение. Полученный из базы данных комплекс фурина и ингибитора 1 [2] был проанализирован при помощи средств визуализации и проведен молекулярный докинг. Энергия связывания ингибитора 1 с фурином составила -12,11 ккал/моль. Координаты аминокислот, выстилающих сайт связывания, использованы для расчёта центра стыковки. Последний необходим для проведения докинга с другими лигандами в ограниченной области молекулы протеина. В Autodock Tools при подготовке структуры к стыковке были выставлены следующие параметры связывания: 60 x 60 x 60; 46,003; -32,230; -5,664.

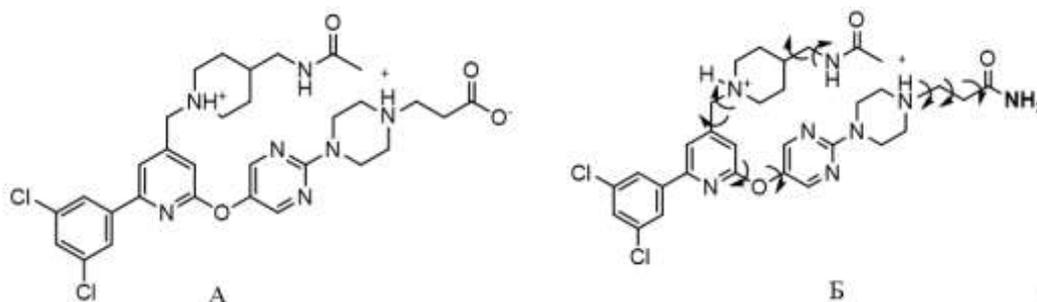
При помощи ChemOffice нами произведено проектирование 10-ти структур, являющихся производными ингибитора 1, полученными путем введения или удаления отдельных функциональных групп в пиперазиновый, пиперидиновый, фенильный фрагменты, а также в концевые карбоксильную и ацетамидную группы (Табл.1).

Табл. 1. Характеристики взаимодействия (энергия связывания E_b и константа ингибирования K_i) производных дихлорофенилпиридина с рецептором

№	Формула	E_b	K_i	№	Формула	E_b	K_i
2		-13,32	171,46 пМ	7		-12,82	399,23 пМ
3		-12,92	336,48 пМ	8		-11,44	4,14 нМ
4		-12,91	346,19 пМ	9		-13,33	169,27 пМ
5		-13,65	98,78 пМ	10		-14,34	30,74 пМ
6		-11,51	3,66 нМ	11		-13,82	73,80 пМ

Был произведен молекулярный докинг с использованием генетического алгоритма с числом пробегов 100 и размером популяции 150. В результате моделирования *in silico* установлена исключительно важная роль гидрофобных взаимодействий в формировании сродства всех лигандов к рецептору. Отмечается также образование полярных связей всех обсуждаемых структур с Glu236, Asp258 и Asp264 белка-мишени.

Выявлен лиганд (№ 10), наиболее эффективно связывающийся с фурином. K_i составила 30,74 пМ при энергии связывания $E_b = -14,34$ ккал/моль.

**Рис. 1** – Формулы ингибитора 1 (А) и лиганда 10 (Б). Стрелки указывают на возможность вращения вокруг сигма-связей

Так как молекула имеет высокую конформационную подвижность (Рис.1), то докинг выявил большое число кластеров (65), характеризующихся различной конформацией и позицией лиганда по отношению к протеину. Только 19 из них подтверждаются более, чем одним прогоном докинга. На рисунке 2 представлены два варианта стыковки лиганда 10 с фурином: более вероятный ($E_{св.}$ -14,34 ккал/моль) и менее вероятный ($E_{св.}$ -14,11 ккал/моль). Следует отметить, что пиперидиновый конец молекулы в обоих случаях связывается с теми же аминокислотными остатками, а пиперазиновый, по-видимому, отличается большей конформационной подвижностью.

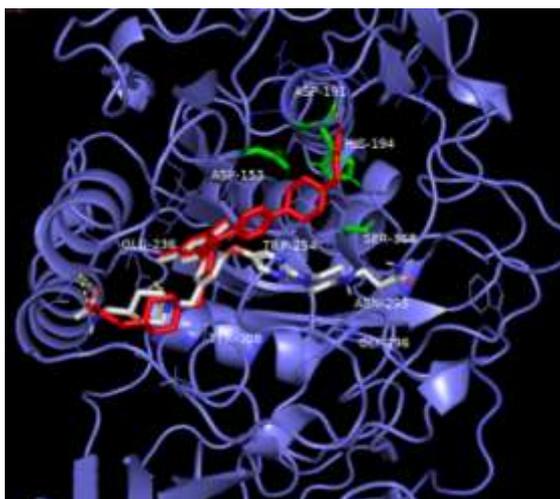


Рис. 2 – Наложение двух вероятных конформаций лиганда комплексов 1 (обозначен белым) и 2 (обозначен красным); зеленым обозначены остатки аминокислот, участвующие в протеолитической реакции фурина (PyMOL)

Проведен анализ характера взаимодействий данного образца с фурином (Табл. 2, Рис. 3). Молекула данного лиганда, в отличие от большинства образцов, не имеет отрицательного заряда на концевой карбоксильной группе.

Табл. 2. Виды взаимодействий лиганда 10 с протеином

Аминокислота	Вид взаимодействия	Межатомное расстояние
227-Leu	Гидрофобное	3,83
233-Asp	Водородная связь	2,22-2,92
236-Glu	Гидрофобное	3,41
	Ионное	3,33
240-Leu	Гидрофобное	3,65
252-Ala	Гидрофобное	3,46
255-Gly	Водородная связь	2,99-3,84
258-Asp	Гидрофобное	3,95
	Ионное	4,26
264-Asp	Гидрофобное	3,83
291-Trp	Водородная связь	2,22-2,92

Такая высокая эффективность взаимодействия, возможно, обусловлена большим вкладом гидрофобных контактов, что при связывании с рецептором может быть энергетически более выгодно.

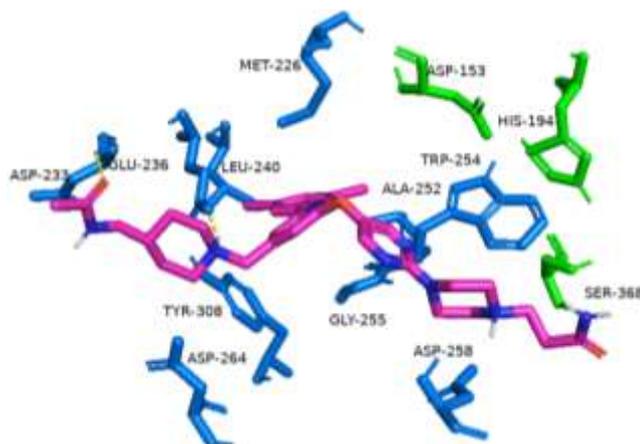


Рис. 3 – Взаимодействия лиганда и протеина: пурпурным цветом обозначен лиганд, синим и зеленым – аминокислотные остатки сайта связывания протеина, зеленым – аминокислотные остатки, участвующие с протеолитической реакции фурина (PyMOL)

Выводы: полученные результаты дают основание прогнозировать высокую ингибирующую активность 2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона в отношении фурина и позволяют планировать дальнейшие исследования данного образца *in vitro* и *in vivo*.

Литература

1. Berman, H. M. The Protein Data Bank / H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng [et al] // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28. – P. 235-242.
2. Dahms SO, Schnapp G, Winter M, Büttner FH, Schlepütz M, Gnamm C, Pautsch A, Brandstetter H. Dichlorophenylpyridine-Based Molecules Inhibit Furin through an Induced-Fit Mechanism. *ACS Chem Biol*. 2022 Apr 15;17(4):816-821. doi: 10.1021/acscchembio.2c00103. Epub 2022 Apr 4. PMID: 35377598; PMCID: PMC9016704.
3. Furin: A Potential Therapeutic Target for COVID-19/ Canrong Wu, Mengzhu Zheng, Yueying Yang// *iScience* 23, 101642 October 23, 2020
4. Furin and COVID-19: Structure, Function and Chemoinformatic Analysis of Representative Active Site Inhibitors/ Bruno O. Villoutreix, Iker Badiola, Abdel-Majid Khatib // *frontiers in drug discovery* 10 2022
5. Henrich S., Cameron A., Bourenkov G., Kiefersauer R., Huber R., Lindberg I., Bode W., Than M.E. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, 10, 520-526.
6. Morris, G. M. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson // *Computational Chemistry*. – 2009. – №16. – P. 2785-2791.
7. Paleyanda R.K., Drews R., Lee T.K., Luboc H. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 15270-15274