

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.218, 577.32

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БЛОКАТОРЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ ВИРУСОВ ГРИППА А И SARS-CoV-2

© 2024 г. Ю. Н. Воробьев^а, *

^аИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: ynvorob@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 14.11.2023 г.

После доработки 07.02.2024 г.

Принята к публикации 15.02.2024 г.

Предложены молекулы, блокирующие функциональный цикл вирусов гриппа А и SARS-CoV-2. Молекулы-блокаторы, эффективно связывающиеся в каналах М2 и Е вирусов гриппа А и SARS-CoV-2 и блокирующие диффузию ионов H^+/K^+ , разрушают жизненный цикл вирусов. Предложено семейство положительно заряженных, +2 е.и., молекул-блокаторов диффузии ионов H^+/K^+ через М2- и Е-каналы. Изучено сродство молекул-блокаторов, производных диазабициклооктана, к связыванию белков каналов М2 и Е. Проведено моделирование тепловой динамики нативных и мутантных структур каналов и связывание молекул-блокаторов методом исчерпывающего докинга. Расчеты энергии связывания показали, что белки М2- и Е-каналов имеют внутриканальные, блокирующие и внеканальные сайты связывания. Предложены молекулы-блокаторы с преимущественным сродством к блокирующим модам связывания. Рассмотрены наиболее вероятные мутации аминокислот белка М2 и Е каналов, проанализирована эффективность блокирования каналов и предложены оптимальные структуры молекул-блокаторов.

Ключевые слова: вирусы гриппа А и SARS-CoV-2, белки ионных каналов М2 и Е, молекулярная динамика, блокаторы ионных каналов М2 и Е, производные диазабициклооктана, связывание и блокирование каналов М2 и Е

DOI: 10.31857/S0026898424040125, EDN: IMBPHX

ВВЕДЕНИЕ

Последнее столетие (1918–2019 гг.) известно серьезными эпидемиями гриппа А (<https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1918-commemoration/1918-pandemic-history.html>) (испанка: 1918–1922 гг.) и атипичной пневмонии (ковид-19: 2019–2023 гг.), вызванные вирусами H1N1 [1] и SARS-CoV-2 (<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/SARS-CoV-2-evolution>) соответственно. Поэтому разработка эффективных противовирусных препаратов остается задачей большой важности из-за способности этих вирусов быстро инфицировать большие популяции, преодолевая межвидовые барьеры путем быстрых мутаций. Известно значительное количество мутантных форм мембранного белка M^{pro} , формирующего поверхностные шипы вирусов гриппа А H1N1 [1, 2], и белка M^{pro} вируса SARS-CoV-2 [3, 4]. Лекарственный препарат, эффективный в том числе против мутантных штаммов, должен воздействовать на функционально значимые, но структурно консервативные элементы вируса. Консервативным структурным функционально значимым элементом вирусов являются

ионные каналы — М2 вируса гриппа А и Е-канал вируса SARS-CoV-2. Известны атомные структуры высокого разрешения ионных каналов вирусов гриппа А, канал М2 (код PDB2KAD) [5, 6] и канал Е вирусов SARS-CoV-2 (PDB код 5X29), что дает возможность конструировать молекулы блокаторов этих каналов [7, 8]. Функциональная значимость каналов М2 и Е состоит в транспорте ионов H^+/K^+ через липидную мембрану вирусов гриппа А и SARS-CoV-2. Диаметр М2-канала вируса гриппа А составляет 4–6 Å, тогда как диаметр Е-канала SARS-CoV-2 варьирует в пределах 4–9 Å.

Важность функциональности ионных каналов для вирулентности показана на нескольких вирусах. Например, активность протонного канала белка М2 вируса гриппа А имеет решающее значение для проникновения вируса через клеточную мембрану и инфицирования клетки [9]. Активность канала белка Е коронавируса SARS-CoV-2 необходима для инфицирования живой клетки [10]. А патогенность вируса инфекционного бронхита значительно снижается, когда трансмембранный сегмент белка Е заменяли гетерологичным доменом, у которого отсутствовала активность ионного

канала [10]. Важность Е-каналов для вирулентности и способности вызывать заболевание показана на нескольких вирусах: после эндоцитоза Е-канал облегчает перенос ионов H^+ и K^+ во внутренний объем вируса [11], позволяя вирусной РНК иницировать репликацию. Показано, что канальная активность белка Е имеет решающее значение для инфекционности РНК коронавирусов [12]. Оказалось также, что вирусы SARS-CoV-1, у которых блокирована активность белка Е, были гораздо менее заразными [11, 12]. Белок Е участвует в сборке, высвобождении и патогенезе вируса [13, 14]. В целом, каналы М2 и Е это небольшие гидрофобные вирусные белки, которые встраиваются в клеточную мембрану, облегчая тем самым высвобождение вируса из инфицированных клеток. Показано, что активность Е-каналов нескольких коронавирусов, включая SARS-CoV-1 [15–17], коронавирус MERS [18], коронавирус HCoV-225 человека, вирус гепатита мыши и вирус инфекционного бронхита [19], может быть заблокирована гексаметиленамилоридом [20, 21]. Активность М2- или Е-каналов вирусов гриппа А и SARS-CoV-2 имеет решающее значение для процесса заражения живой клетки [22–24]. Диффузия протонов H^+ через М2- и Е-каналы может быть стерически блокирована связыванием электронеutralной молекулы блокатора внутри ионного канала [25, 26]. Более эффективное блокирование может быть достигнуто путем связывания положительно заряженной молекулы, создающей как стерическое блокирование, так и дополнительный электростатический барьер для положительно заряженных ионов H^+ и K^+ [27–29].

В настоящей работе суммированы результаты наших работ [6, 27–29], в которых предложена серия молекул, блокирующих ионные каналы нативных и наивероятных мутантных белков М2 вируса гриппа А и белка Е вирусов SARS-CoV-2. Показано, что молекулы, производные 1,4-диазабицикло-[2.2.2]октана (DABCO), эффективно связываются внутри М2- и Е-каналов вирусов гриппа А и SARS-CoV-2, блокируют проницаемость для протонов и ионов K^+ как стерически, так и электростатически, нарушая транспорт ионов и жизне-способность вирусов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Метод моделирования. Атомную структуру и тепловую динамику белков М2 и Е при физиологической температуре (308 К) моделировали, исходя из известных экспериментальных данных. Моделирование равновесной структуры нативных белков М2 и Е, в также их наивероятных мутантных форм выполнено методом молекулярной динамики (МД).

Моделирование равновесных тепловых флуктуаций трехмерных структур выполнено программным комплексом BioPASED [30–32] с неявной

моделью среды, описываемой обобщенной корректированной моделью Борна GB-MSR6c [33, 34].

Энергия биополимера в растворе U :

$$U = E_{\text{bond}} + E_{\text{angel}} + E_{\text{tors}} + E^{\text{14}}_{\text{vdw}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{elect}} + E_{\text{Hbond}} + E_{\text{solv}},$$

где E_{bond} , E_{angel} и E_{tors} описывают энергию деформации валентных связей; $E^{\text{14}}_{\text{vdw}}$ и E_{vdw} описывают парные Ван-дер-Ваальсовы (ВДВ) взаимодействия атомов, разделенных тремя и более валентными связями; энергии электростатических взаимодействий (E_{elec}) пар атомов, разделенных тремя и более валентными связями, отличные от нуля в радиусе 15 Å, рассчитаны методом обобщенного поля реакции; энергия водородных связей E_{Hbond} рассчитывается как $X-H \cdots Y$ между атомом водорода Н, присоединенным к электроотрицательному атому Х-Н, и электроотрицательным атомом-акцептором Y. Функциональная форма включает зависимость от угла между $X-H$ и $H-Y$, уменьшаясь при искривлении водородной связи; энергию сольватации (E_{solv}) вычисляют по модели гауссовских гидратных оболочек, вычислительно эффективной и разумно точной.

Структура М2-канала с молекулой амантадина, связанной в канале, получена методом ЯМР, код 2KAD, при $T = 243\text{K}$, pH 7.5. Молекулу амантадина удалили из ионного канала М2, затем структуру канала оптимизировали методом симуляции отжига, т.е. выполняли нескольких циклов медленного разогрева системы до 400K и охлаждения до 300K.

Динамическая структура М2-канала получена как серия структур вдоль равновесной МД траектории длительностью 25 нс с временным интервалом 100 пс. Эта серия структур позволяет моделировать динамическое связывание молекул блокаторов флуктуирующей структурой М2-канала. Отметим, что при комнатных температурах позиционные флуктуации атомов белка более 1Å, как это следует из серии структур, полученных методом ЯМР, код 2KAD. Равновесные МД траектории при постоянном нейтральном pH 6.5 моделировали с периодическим уточнением ионизационных состояний ионизируемых аминокислотных остатков молекулы белка М2, содержащей четыре остатка гистидина, pK_0 которых близка к физиологическому интервалу величин pH организма человека.

Структура Е-канала вируса SARS-CoV-2, PDB код 5X29, получена методом ЯМР при температуре 308K, pH 5.5 – 16 моделей, которые отражают тепловую динамику среднеквадратичным отклонением атомов в пределах 2.6 Å, т.е. умеренную тепловую динамику молекулы при физиологических температурах. Динамическая структура Е-канала для моделирования взаимодействия с молекулами блокаторов получена как серия структур вдоль

равновесной траектории метода МД длительно-стью 100 нс.

Расчеты значений констант ионизации pK_a и степени ионизации в зависимости от pH растворителя выполнены методами FAMBE и FAMBE-pH [31, 32]. Расчет степени ионизации аминокислот белков в растворе основан на минимизации энергии молекулы белка в данной конформации, зависимой от степени ионизации, по ее величине. Достоверность метода расчета pK_a в пределах 1.0 ед. показана для 297 ионизируемых групп в 32 белках [34].

Расчеты энергии межатомных взаимодействий выполнены в силовом поле AMBER94 и AMBER-GAFF [35–37]. Выполнен слепой исчерпывающий докинг молекул, который состоит из нескольких этапов [38]: (1) предварительный поиск всех возможных сайтов связывания на поверхности белка, доступной для молекулы лиганда; (2) селекция этих сайтов по контактному рангу, числу атомов белка, находящихся в контакте с атомами лиганда; (3) для всех сайтов с большим контактным рангом выполняется глобальная оптимизация полной энергии связывания лиганда по положению, ориентации и конформации лиганда, локальной структуре белка. Глобальная оптимизация структуры белка со связанным лигандом достигается стартом из 72 ориентаций лиганда, равномерно распределенных в пространстве ориентаций, методом симуляции отжига, т.е. выполняется МД комплекса белок-лиганд с несколькими циклами медленного нагревания до 400–500 К и охлаждения до целевой температуры.

Белки, образующие M2- и E-каналы, встроены в липидную мембрану клетки, моделированную эффективной средой. Экспериментальные данные показывают, что диэлектрическая проницаемость липидной мембраны (т.е. вне объема белка E или M2), D_{out} равна ~30 [39]. При моделировании электростатических взаимодействий атомов структур каналов внутренний объем каналов M2 и E рассматривается как объем белка с диэлектрической проницаемостью D_{in} , равной 12 [40–43].

Ингибиторы ионных каналов белков M2 и E. Трехмерные структуры белков M2 (код PDB2KAD) и E-каналов (код PDB5X29) определены методом ЯМР и содержат все атомы водорода. Структура M2-канала образована четырьмя α -спиралями — остатки 22–46 каждой из цепей A, B, C, D [5]. Наиболее известными блокаторами ионного канала M2 являются амантадин и ремантадин [44, 45]. Существуют блокаторы ионного канала с более сложными структурами, например, производные пикротоксина [46], производные адамантана и спиро-адамантиламин [47]. МД-моделирование показало, что профиль свободной энергии иона H^+ при движении вдоль ионного канала M2 имеет энергетический барьер ~5 ккал/моль [48]. Моделирование методом МД потенциальной энергии

связывания амантадина с неявной моделью растворителя и окружающей среды, т.е. объема клеточной мембраны, предсказывает величину энергии связывания ~ 4 ккал/моль, что удовлетворительно соответствует экспериментальным данным [49].

Новый класс молекулярных ингибиторов M2- и E-каналов сконструирован на основе базовой молекулы диазабициклооктана (DABCO), рис. 1а, которая служит первичным соединением [24]. Предложенные модификации DABCO значительно увеличивают вероятность связывания внутри M2- и E-каналов вирусов гриппа А и SARS-CoV-2.

Полициклические производные диазабициклооктана. Полициклические производные молекулы DABCO, рис. 1а, состоят из большего числа атомов, чем исходная молекула, поэтому они могут иметь более сильные Ван-дер-Ваальсовы и электростатические взаимодействия с внутренней поверхностью каналов M2 и E. Рассмотрен набор молекул блокаторов, состоящих из большего числа атомов, чем в молекуле DABCO. Молекулы диазабициклооктанбензола (DABCOB), рис. 1б, и диазабициклооктаннафталина (DABCON), рис. 1г. Более объемные молекулы, диазабициклооктан-3-бензол (DABCO3B) и диазабициклооктан-3-толуол (DABCO3N), рис. 1в и рис. 1д, получены модификацией циклической структуры корневой молекулы DABCO в трех симметричных направлениях.

Следует отметить, что конструирование ингибитора M2- и E-каналов как жесткой полициклической структуры более предпочтительно, по сравнению с гибкой структурой, поскольку при связывании и дополнительном ограничении конформационной подвижности молекулы лекарственного препарата наблюдается меньшая потеря конформационной энтропии по сравнению с подвижностью свободной молекулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Связывание DABCO и его производных с нативным M2 каналом

Ионный канал M2 образован сегментами аминокислотных остатков 24–46 каждой из четырех α -спиралей (A, B, C, D) с центральным продольным каналом [46, 47]. Вероятность транспорта протона через канал M2 незначительно меняется в области значений pH 5.4–7.0 [48]. Структурные данные показывают, что аминокислотные остатки Val27, Ala30, Ser31 и Gly34, важные для транспорта протона и взаимодействия с молекулой амантадина, блокирующей канал M2, лежат на внешней стороне каждой из α -спиралей (A, B, C, D) [50, 51]. Мутация этих остатков с большой вероятностью будет влиять на транспорт протона через канал M2.

Известны несколько атомных структур пустого канала M2 (PDB коды 2H95, 2L0J, 4QKL, 4QKM

и 2KAD), полученных методами ЯМР и рентгено-структурного анализа. ЯМР-структура (PDB код 2KAD), полученная при 243K и pH 7.5 [52–54], включает все атомы водорода, т.е. дает полную информацию об ионизационном состоянии остатков и типе таутомера нейтральных остатков гистидина. Вход в ионный канал M2 образован четырьмя остатками серина, Ser31A, Ser31B, Ser31C и Ser31D, которые контролируют диффузию ионов H^+ через канал. Четыре остатка гистидина – His37A, His37B, His37C и His37D – лежат в одной плоскости, перпендикулярной к оси ионных каналов M2, и находятся в форме нейтрального таутомера HE2 (или HIE, как принято в структурном моделировании). Средняя потенциальная энергия белка M2 вдоль равновесной МД траектории для ионизированного и нейтральных состояний четырех остатков гистидина приведена в табл. 1–3. Видно, что различия средних потенциальных энергий $\langle E_{\text{pot}} \rangle_{\text{MD}}$ белка M2 для ионизированного состояния HIS^+ и нейтрального состояния HIE составляет ~ 6 ккал/моль. Средняя величина тепловых флуктуаций энергии таутомера HIE по равновесной МД траектории длительностью 25 нс, равна ~ 12 ккал/моль.

Заселенности заряженных и нейтральных состояний четырех остатков гистидина заметно флуктуируют вдоль МД траектории (рис. 2).

Однако средние значения долей заселенностей ионизированного и нейтральных форм остатков His37A, His37B, His37C и His37D равны в пределах 0.04–0.06 (табл. 3). Ионизированное состояние остатков гистидина, HIS^+ и нейтральный таутомер HIE при pH 6.5, реализуются с вероятностями 0.64 и 0.32 соответственно (табл. 3). Средняя потенциальная энергия $\langle E_{\text{pot}} \rangle_{\text{MD}}$ белка M2 с нейтральным таутомером HIE значительно больше (на ~ 50 ккал/моль) энергии состояний остатков гистидина HIS^+ и HIE (табл. 3), а вероятность состояний HIE мала ~ 0.02 –0.04. Средняя пространственная структура нейтрального состояния канала M2 незначительно отличается, в пределах амплитуды тепловых флуктуаций ~ 0.9 Å, от экспериментальной структуры канала M2 (PDB2KAD). Можно отметить, что среднеквадратичное отклонение (RMSD) для положений атомов $O\gamma$ остатков Ser31A, Ser31B, Ser31C, Ser31D для структуры канала M2 вдоль траектории МД не превышало 1.1 Å. Например, расстояния между атомами $O\gamma$ остатков Ser31A/Ser31C и Ser31B/Ser31D

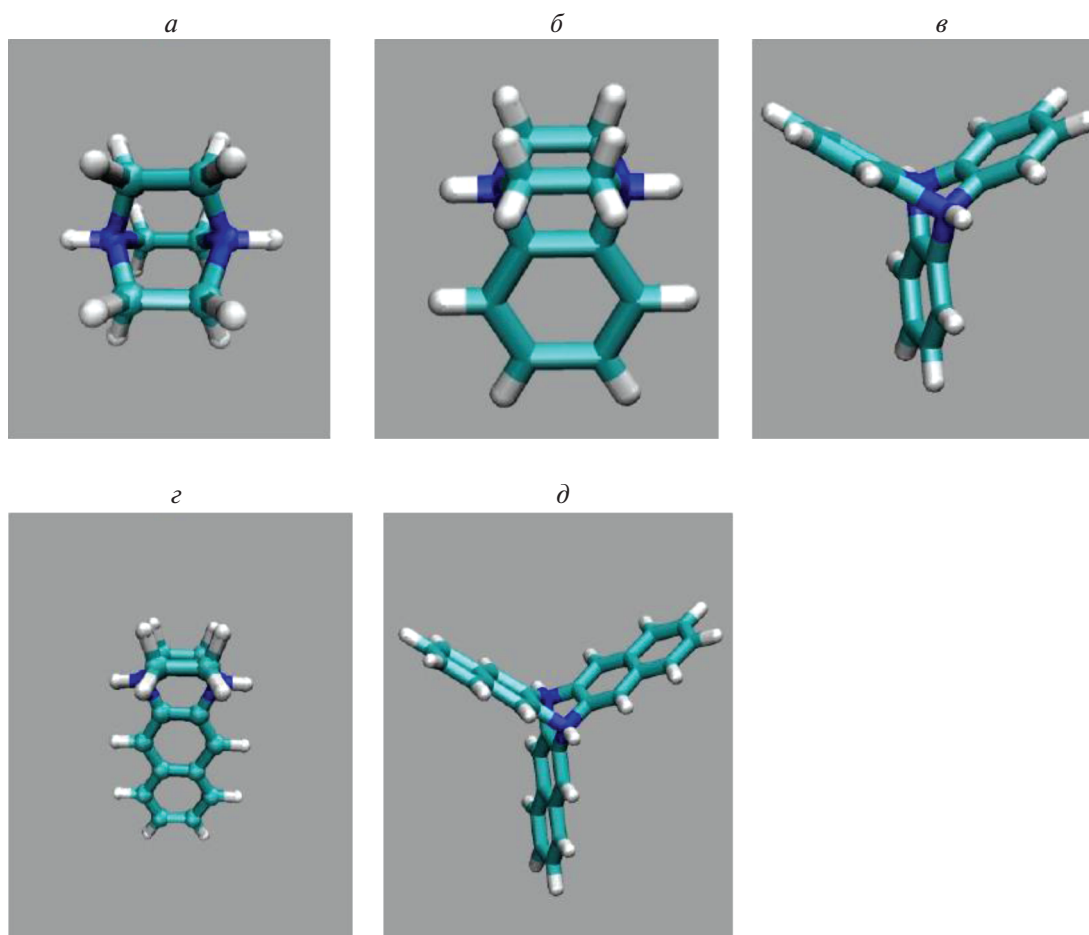


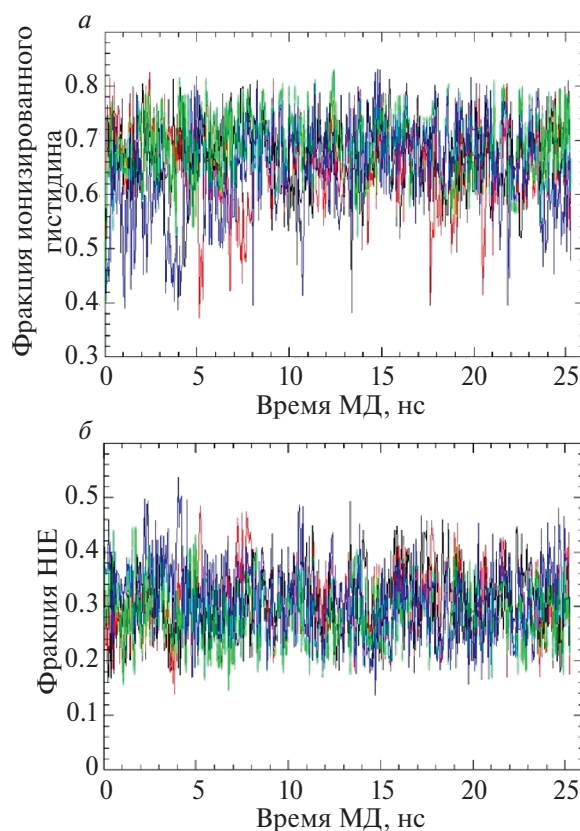
Рис. 1. Структура молекул блокаторов E- и M2- каналов. а – DABCO; б – DABCOB; в – DABCO3B; г – DABCON; д – DABCO3N.

Таблица 1. Средняя заселенность ионизационных состояний остатков гистидина (His34A, His34B, His34C, His34D) белка M2

pH	Ионизационное состояние		
	HIS ⁺	HIE	HID
6.0	0.83 (0.03)	0.16 (0.02)	0.01 (0.01)
6.25	0.76 (0.03)	0.22 (0.02)	0.02 (0.01)
6.50	0.65 (0.04)	0.33 (0.03)	0.02 (0.01)
6.75	0.57 (0.04)	0.40 (0.03)	0.03 (0.01)
7.0	0.46 (0.04)	0.50 (0.030)	0.03 (0.01)
7.25	0.35 (0.03)	0.60 (0.02)	0.05 (0.02)
7.5	0.26 (0.03)	0.67 (0.02)	0.07 (0.02)

Примечание. Приведена средняя заселенность ионизационных состояний остатков гистидина; в скобках — величины среднеквадратичных (RMSD) флуктуаций.

колеблются в пределах 8.4–9.5 Å. Выход из канала M2 контролируется остатками гистидина His37A, His37B, His37C, His37D и характеризуется флуктуациями попарных расстояний между ближайшими атомами C₁ и N₂ в парах His37A–His37B, His37B–His37C, His37C–His37D, His37D–His37A, в диапазоне 4.5–5.4 Å. Средние значения pK_a (табл. 3) остатков гистидина смещены на 0.3 единицы в сторону высоких значений pH, <pK_a> ~6.8, (pK₀ = 6.5). Следовательно, остатки гистидина имеют незначительный отрицательный электростатический потенциал, который стабилизирует ионизованное состояние H⁺ на ~8 ккал/моль (табл. 2). Значительные величины тепловых флуктуации энергий состояний HIS⁺

**Рис. 2.** Ионизированная HIS⁺-фракция остатков гистидина (а) и фракции нейтрального таутомера HIE (б). His37A (черный цвет), His37B (красный), His37C (синий), His37D (зеленый), белка M2 при pH 6.5, T=300K, вдоль равновесной МД траектории в 25 нс.**Таблица 2.** Энергии молекулы белка M2 при ионизированном и нейтральном состоянии остатков гистидина, T = 300K

Состояние ионизации	<E _{pot} > _{MD}	<E _{VDW} > _{MD}	<E _{COL} > _{MD}	<E _{Hbond} > _{MD}	<E _{Solv} > _{MD}
HIS ⁺	–1344.5(15.2)	–423.7(13.6)	–495.1(6.6)	–331.2(7.0)	–98.3(7.1)
HIE	–1336.5(12.1)	–416.8(10.9)	–489.5(4.2)	–323.2(5.6)	–106.1(8.3)
HID	–1289.7(10.9)	–413.7(9.3)	–477.2(4.4)	–294.7(5.5)	–133.2(7.2)

E_{pot}—Средняя потенциальная энергия вдоль равновесной МД-траектории, ккал/моль.

E_{VDW}— Энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.

E_{COL}— Энергия электростатических взаимодействий.

E_{Hbond}— Энергия водородных связей.

E_{Solv}— Энергия взаимодействия с окружающей средой.

Таблица 3. Средние значения pK_a и доли фракций ионизированных и нейтральных таутомеров остатков гистидина белка M2 вдоль равновесной МД траектории при pH 6.5, T = 300K

Остаток His	Ионизационное состояние			pK _a
	HIS ⁺	HID	HIE	
His37A	0.65(0.04) ^д	0.03(0.01) ^д	0.32(0.03)	6.80(0.14)
His37B	0.63(0.06)	0.04(0.02)	0.33(0.03)	6.80(0.09)
His37C	0.66(0.03)	0.05(0.01)	0.29(0.02)	6.82(0.16)
His37D	0.62(0.05)	0.05(0.03)	0.32(0.04)	6.78(0.18)
Доля	0.64	0.04	0.32	6.80

Примечание. Приведены средние значения; в скобках — величины RMSD флуктуаций.

Таблица 4. Энергия оптимальных сайтов связывания производных молекулы-блокатора DABCO с нативным M2-каналом

Молекула	ePL	eVDW	eCoul	eHb	Y...HX	Расстояние, Å	eSolv	in(out)
DABCO ^a	-9.6 -9.4 -9.2	-8.2 -7.9 -11.0	4.7 4.3 1.2	-9.2 -9.1 -6.0	SER31A-O _γ ...HN1	2.12	-8.1 -8.4 -4.6	<i>in</i> <i>in</i> <i>out</i>
					SER31C-O _γ ...HN2	2.28		
					HIE37A-ND1...HN1	2.21		
					HIE37C-ND1...HN2	2.26		
					LEU36A-O...HN1	2.34		
					LEU46B-O...HN2	2.38		
DABCOB	-18.3 -18.2 -18.1	-14.1 -26.8 -16.3	1.2 3.7 2.5	-9.0 -7.6 -9.6	SER31A-O _γ ...HN1	2.13	-7.9 0.3 -3.4	<i>in</i> <i>in</i> <i>out</i>
					SER31C-O _γ ...HN2	2.29		
					HIE37A-ND1...HN1	2.28 2.34		
					HIE37C-ND1...HN2	2.19		
					LEU36A-O...HN1	2.17		
					LEU46B-OXT...HN2	2.17		
DABCON	-27.4 -21.3	-21.5 -19.7	-5.3 1.5	-9.8 -8.7	ASP44A-OD1...HN1	2.17	-5.1 -7.6	<i>out</i> <i>in</i>
					LYU46C-OXT...HN2	2.15		
					SER31A-O _γ ...HN1	2.24 2.26		
					SER31C-O _γ ...HN2	2.24 2.26		

Примечание. ePL — полная энергия связывания с белком M2, ккал/моль;
eVDW— энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий;
eCoul — энергия электростатических взаимодействий;
eHb — энергия водородных связей;
Y —акцептор водородной связи молекулы блокатора с атомами M2-канала;
HX — донор водородной связи;
eSolv — взаимодействие с растворителем;
in(out) — позиция связывания лиганда внутри/вне M2-канала.

и HIE, ~15 и 12 ккал/моль (табл. 2), способствуют процессу переноса протона через “гистидиновый затвор” — квартет остатков His37A, His37B, His37C, His37D ионного канала M2. Параметры связывания молекул блокаторов, производных DABCOB, с ионным каналом M2, приведены в табл. 4.

Оптимальная мода связывания, блокирующая M2-канал, приведена на рис. 3. Эти данные

показывают, что оптимальная молекула-блокатор DABCOB имеет высокую энергию связывания внутри M2-канала с образованием двух сильных водородных связей (рис. 3) остатками SER31A(C) либо HIE37A(D). Связывание вне канала M2 может происходить с вероятностью ~ 0.32.

Оценочная вероятность мутации остатков SER31A(B, C, D) канала M2 в отличный от SER остаток, влияющий на свойства канала, достаточно высока ~ 0.14 [57]. Мутации остатков SER31 в четырех альфа-цепях белка M2, образующих внутреннюю поверхность канала M2, в остатки THR, ASN, ALA, GLU, CYS, случаются с вероятностями 38, 34, 28, 17 и 16 × 10⁻⁴ соответственно [55]. Расчеты энергий связывания молекул-блокаторов с мутантными M2-каналами приведены в табл. 5. Видно, что оптимальным сайтом связывания остается блокирующая позиция внутри канала M2, аналогичная позиции в нативном M2-канале. Энергии связывания незначительно (~ 1.5–2.0 ккал/моль) выше, чем в нативном M2- канале (табл. 5).

Связывание DABCO и его производных с E-каналом

Подготовка набора оптимизированных низко-энергетических белковых структур E-канала к моделированию связывания молекул блокаторов выполнена методом, описанным, в разделе *Метод моделирования*.

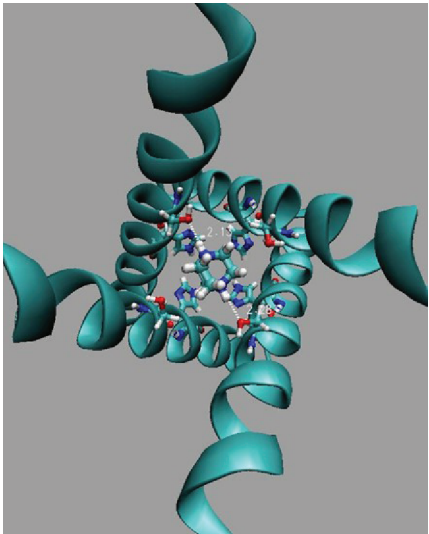


Рис. 3. Основной сайт связывания молекул DABCOB с нативным M2-каналом.

Таблица 5. Энергии связывания оптимального блокатора DABCOB с нативными и мутантными структурами M2-канала

Мутант Ser31	ePL	eVDW	eCoul	eHb	Y...HX	Расстояние, Å	eSolv	in/out	вр
Mut1/Thr31	−19.8 −17.9	−29.5 −7.6	3.4 −7.4	−7.4 −4.8	HIE37A-ND1...HN1	1.92	1.5 −9.4	<i>in</i> <i>out</i>	38
					HIE37C-ND1...HN2	2.03			
					ASP44A -OD1...HN1	2.02			
					ASP44C-OD1...HN2	1.91			
Mut2/Asn31	−19.6 −17.1	−28.1 −12.6	3.4 −3.9	−6.8 −5.0	HIE37A-ND1...HN1	1.99	0.7 −7.5	<i>in</i> <i>out</i>	34
					HIE37C-ND1...HN2	2.01			
					LEU46A-OXT...HN1	2.12			
					LEU46C-OXT...HN2	2.16			
Mut3/Ala31	−19.8 −16.9	−28.5 −11.9	4.1 −5.6	v7.1 −5.0	HIE37A-ND1...HN1	1.97	−0.1 −6.4	<i>in</i> <i>out</i>	28
					HIE37C-ND1...HN2	2.01			
					OXT-LEU46A...HN1	2.17			
					OXT-LEU46C...HN2	2.21			
Mut4/Gly31	−18.4 −14.4	−28.8 −13.9	4.5 −1.1	−7.2 5.0	HIE37A-ND1...HN1	1.95	1.0 −6.8	<i>in</i> <i>out</i>	16
					HIE37C-ND1...HN2	2.01			
					ASP44A-OD1...HN1	2.02			
					ASP44A-OD1...HN2	1.94			
Mut5/Cys31	−20.0 −8.9	−27.2 −21.4	2.9 6.7	−7.9 −4.7	HIE37A-ND1...HN1	1.94	−0.1 −2.3	<i>in</i> <i>in</i>	11
					HIE37C-ND1...HN2	2.03			
					CYS31A-O...HN1	2.12			
					CYS31C-O...HN2	2.08			

Примечание. ePL — полная энергия связывания лиганда с белком M2, ккал/моль;

eVDW — энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий;

eCoul — энергия электростатических взаимодействий;

eHb — энергия водородных связей;

Y — акцептор водородной связи молекулы-блокатора с атомами M2-канала;

HX — донор водородной связи;

eSolv — взаимодействие с растворителем;

in/out — позиция связывания лиганда внутри/вне M2-канала;

вр — вероятность мутации $\times 10^4$.

Рассмотрены нативная и две мутантные структуры белка E, нативная, *mut0*, содержащая GLU8A(B, C, D, E) и ASN15A(B, C, D, E), *mut1* с остатками GLU8A(B, C, D, E), ASP15A(B, C, D, E) и *mut2* с остатками GLN8A(B, C, D, E) и ASN15A(B, C, D, E). Мутантные структуры позволили выяснить влияние кислотных, отрицательно заряженных остатков на структуру входа в E-канал. Равновесные МД траектории при комнатной температуре, 308K, длительностью 100 нс для нативной и мутантных форм E-канала показаны на рис. 4. В табл. 6 приведены значения средних энергий и амплитуды флуктуаций потенциальной энергии структур. Средние амплитуды флуктуаций находятся в пределах 53.2 (*mut0*), 50.1 (*mut1*), 44.3 (*mut2*), ккал/моль для нативной и двух мутантных структур. Видно, что нативная структура, *mut0*, с GLU8A(B, C, D, E) и ASN15A(B, C, D, E) имеет минимальную потенциальную энергию вдоль равновесной МД траектории по сравнению с мутантными *mut1* с GLU8A(B, C, D, E), ASP15A(B, C, D, E) и *mut2* с остатками GLN8A(B, C, D, E) и ASN15A(B, C, D, E). Средние значения энергии

с мутантных структур *mut1* и *mut2* больше на 30.1 и 94.4 ккал/моль соответственно.

Флуктуирующие потенциальные энергии нативной структуры *mut0* и мутантных структур *mut1*

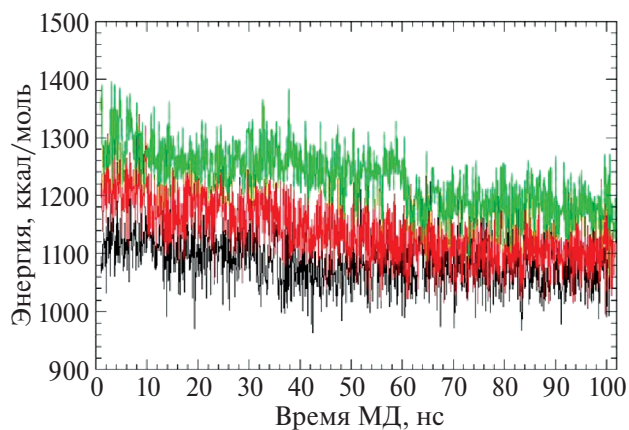


Рис. 4. Флуктуации потенциальной энергии нативной и мутантных структур E-канала при $T=308\text{K}$, $\text{pH } 6.5$; черный — нативная структура, красный — *mut1*, зеленый — *mut2*.

Таблица 6. Средние энергии нативной и мутантных структур Е-белка при T= 308K

Мутантный белок	eP	eVDW	eCoul	eHb	eDef	delta	eRMSD
Нативный/mut0	1075.5	−1078.4	−1441.5	−1073.5	5194.1	0.0	53.2
mut1	1106.2	−1082.1	−1429.2	−1042.8	5170.5	30.7	52.1
mut2	1171.1	−1074.1	−1391.6	−1066.7	5205.6	94.4	49.3

Примечание. eP— средняя энергия нативного Е-белка и его мутантных форм, ккал/моль;
eVDW— энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий;
eCoul — энергия электростатических взаимодействий;
eHb — энергия водородных связей;
eDef — энергия тепловых деформаций структуры;
delta — энергия относительно нативной структуры;
eRMSD — энергия тепловых флуктуаций.

Таблица 7. Сайты связывания производных DABCO с нативным, *mut0*, Е-белком вируса SARS-CoV-2 [Glu8[−]Asn15(A, B, C, D, E)]

Молекула-блокатор	ePL	eVDW	eCoul	eHb	Y…HX	Расстояние, Å	eSolv	in(out)
DABCO ^a	−24.3 −23.8 −23.5	−8.1 −10.2 −11.8	−2.9 −0.3 4.9	−9.9 −9.8 −9.7	GLU8A-OE2…HN1	1.91	−4.4 −3.5 −5.2	<i>in</i> <i>out</i> <i>in</i>
					GLU8E-OE1…HN2	2.00		
					VAL24C-O…HN2	2.09		
					LEUE65-OXT…HN1	1.94		
					GLU8A.-OE1…HN1	1.92		
					ASN15A-OD1…HN2	2.06		
DABCOB	−34.4 −33.4 −33.4	−13.9 −16.4 −13.8	−6.9 −1.1 −7.0	−9.9 −9.8 −9.9	LEU65B-O…HN1	2.09	−3.7 −6.4 −2.7	<i>out</i> <i>in</i> <i>out</i>
					VAL47C-O…HN2	2.03		
					ASN15C-OD1…HN1	2.14		
					GLU8E-OE1…HN2	2.08		
					LEU9C-OXT…HN2	1.97		
					VAL47C-O…HN1	1.98		
DABCO3B	−46.5 −44.9 −44.4	−28.4 −31.0 −28.6	−4.9 −3.7 −5.3	−8.9 −9.9 −9.6	GLU8E-OE1…HN2	2.25	−3.2 −0.2 −0.9	<i>in</i> <i>out</i> <i>out</i>
					ASN15C-OD1…HN1	2.12		
					LEU65A-OXT…HN1	2.10		
					LEU21C-O…HN2	2.18		
					LEU65B-OXT…HN1	2.01		
					VAL47C-O…HN2	1.98		
DABCON	−38.8 −35.9 −35.9	−16.0 −17.3 −24.1	−3.2 −4.4 2.9	−9.7 −9.9 −9.7	GLU8A-OE2…HN1	2.06	−9.9 −4.3 −4.9	<i>in</i> <i>out</i> <i>out</i>
					ASN15C-OD1…HN2	2.14		
					PHE20D-O…HN1	2.07		
					LEU65C-OXT…HN2	1.93		
					SER50B-O…HN1	2.12		
					TYNB-OH…HN2	2.08		
DABCO3N	−58.1 −52.3 −51.9	−34.1 −38.1 −40.1	−6.8 −3.4 −0.2	−9.1 −5.0 −4.8	ASN15C-OD1…HN1	2.19	−8.1 −5.8 −5.9	<i>in</i> <i>out</i> <i>out</i>
					GLU8E-OE1…HN2	2.15		
					LEU65C-OXT…HN1	2.01		
					GLU8A-OE1…HN1	2.03		

Примечание. ePL —полная энергия связывания блокатора с белком Е, ккал/моль;
eVDW — энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий;
eCoul— энергия электростатических взаимодействий;
eHb— энергия водородных связей;
Y — акцептор водородной связи молекулы блокатора с атомами Е-канала;
HX— донор водородной связи;
eSolv— взаимодействие с растворителем;
in(out) — позиция связывания лиганда, внутри/вне Е-канала.

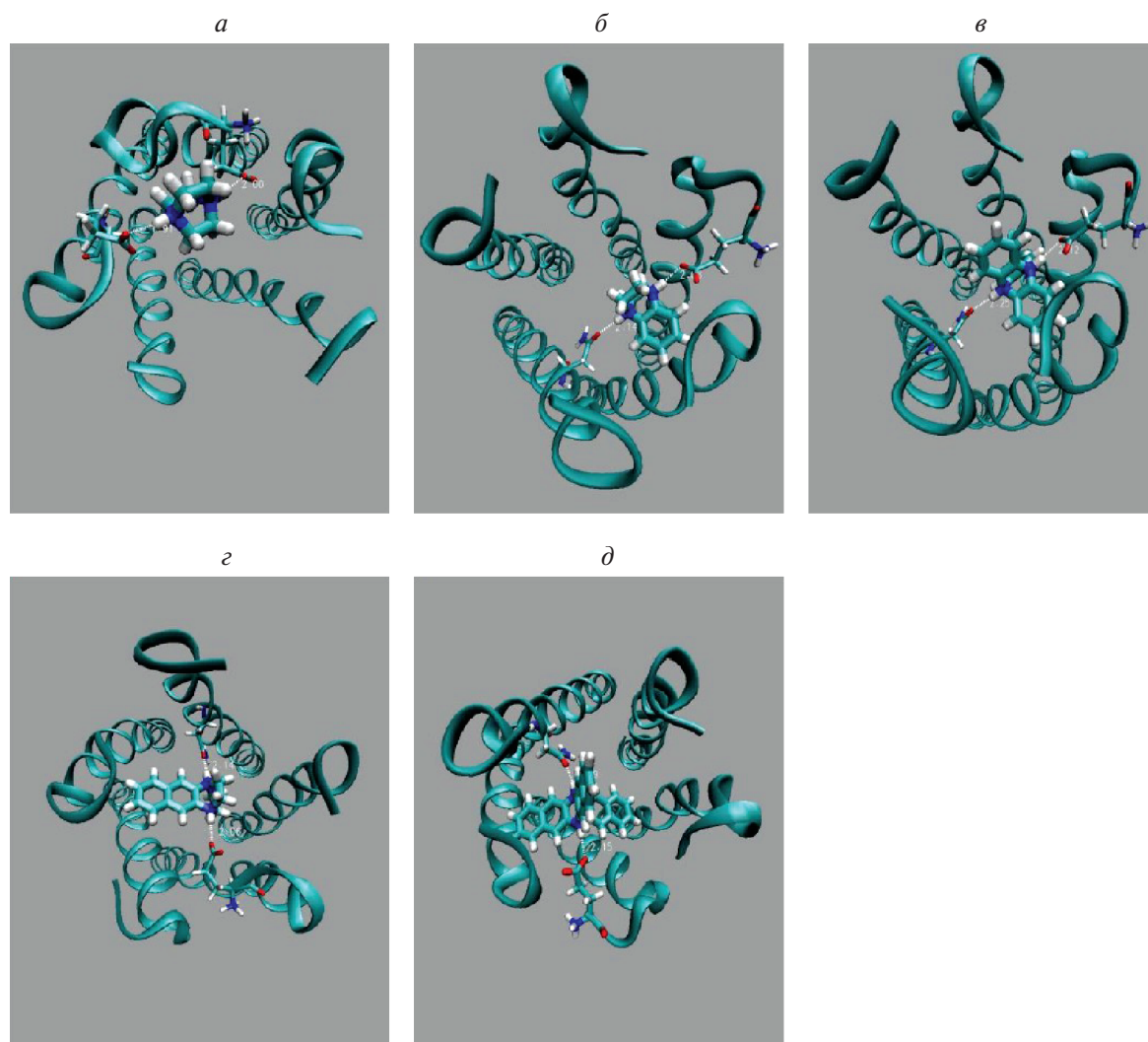


Рис. 5. Структура наивероятных, с наибольшей энергией связи, комплексов нативного Е-канала с оптимально связанными молекулами блокаторов: DABCO (а); DABCOB (б); DABCO3B (в); DABCON (г); DABCO3N (д).

демонстрируют наибольшую степень взаимного перекрытия (рис. 4). Значительное перекрытие потенциальных энергий вдоль МД траекторий показывает, что нейтральные остатки ASN15A(B, C, D, E) могут с большой вероятностью спонтанно превращаться в отрицательно заряженный аминокислотный остаток ASP15A(B, C, D, E).

Переход между нейтральным и заряженным состояниями остатков может происходить в различных комбинациях, ионизированный/нейтральный в каждой из пяти субъединиц. Следовательно, появляется новая степень свободы, т.е. состояние ионизации ASN/ASP, у пяти остатков ASP15A(B, C, D, E), что приводит к уменьшению энтропии ионизационного состояния на $\sim -kT \times \ln N_{iz}$, где $N_{iz} = 2^5$ — это количество ионизационных состояний пяти остатков ASN15/ASP15(A, B, C, D, E). Большое перекрытие флуктуаций энергий нативных, *mut0*, и мутантных, *mut1*, структур, повышает вероятность спонтанных переходов между

нативной структурой и *mut1*. Перекрытие энергий между нативным и мутантными, *mut2*, состояниями мало, поэтому спонтанные переходы в нейтральное состояние остатков GLU8A(B, C, D, E) при нейтральных остатках ASN15A(B, C, D, E) маловероятно. Результаты докинга бициклических и трициклических производных DABCO на нативный белок Е показаны на рис. 5 и в табл. 7.

Связывание полициклических производных DABCO с мутантными структурами Е-каналов

Мутации аминокислотных остатков белка Е, образующих внутреннюю поверхность канала, ASN15/ASP15 и GLU8/GLN8 случаются с вероятностями 42×10^{-4} и 35×10^{-4} соответственно [55]. Рассмотрены два наивероятных мутанта нативного Е-канала, *mut1*, мутация ASN15/ASP15 во всех цепях (A, D, C, D, E) белка Е и мутант *mut2*, GLU8/GLN8. Мутантные структуры стабильны при длительном моделировании методом МД (рис. 4).

Средние энергии по траекториям МД обеих мутантных структур выше, чем у нативного белка Е, *mut1* менее выгодна на 30.1, а мутант *mut2* на 94.4 ккал/моль (табл. 6). Амплитуды тепловых флуктуаций потенциальных энергий, по траекториям МД, составляют 53.2 (для *mut0*), 50.1 (*mut1*), 47.3 (*mut2*), ккал/моль. Достаточно большие амплитуды тепловых флуктуаций потенциальных энергий структур *mut0* и *mut1* и их перекрытие (рис. 4) свидетельствуют, что мутанты *mut0* и *mut1* могут спонтанно переходить один в другой, ASN15/ASP15, с высокой вероятностью при комнатной температуре.

Основные моды связывания молекул блокаторов DABCO, DABCOB, DABCO3B, DABCON и DABCO3N с белком Е и энергии их взаимодействия с мутантом *mut1* приведены на рис. 6 и в табл. 8. Отметим, что наиболее сильной модой связывания для всех пяти лигандов (рис. 1) являются структуры с лигандом внутри Е-канала. Энергии связывания молекул блокаторов с мутантом *mut1* (ASN15/ASP15) больше на ~5–11 ккал/моль, по

сравнению с энергиями связывания с нативным белком Е. Это связано с положительным зарядом лигандов (+2 е.е.), производных DABCO и возрастания электростатических взаимодействий с мутантными отрицательно заряженными остатками ASP15(A, B, C, D, E). Основные сайты связывания характеризуются образованием двух водородных связей между ASP15 из двух разных белковых цепей Е-канала (табл. 8) с двумя атомами азота молекул лигандов (рис. 6). Табл. 8 показывает, что молекулы DABCO3B и DABCO3N связываются наиболее сильно со внутренней поверхностью канала Е, тогда как более простые DABCOB и DABCON связаны заметно слабее, на 13–15 ккал/моль. Увеличение энергии связывания внутри Е-канала обусловлено более сильными электростатическими и Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями положительно заряженных молекул блокатора с мутантным, *mut1* ASN15/ASP15, Е-каналом (табл. 8).

Второй вероятный мутант Е-канала, *mut2*, GLU8/GLN8, во всех пяти цепях А, В, С, D, Е

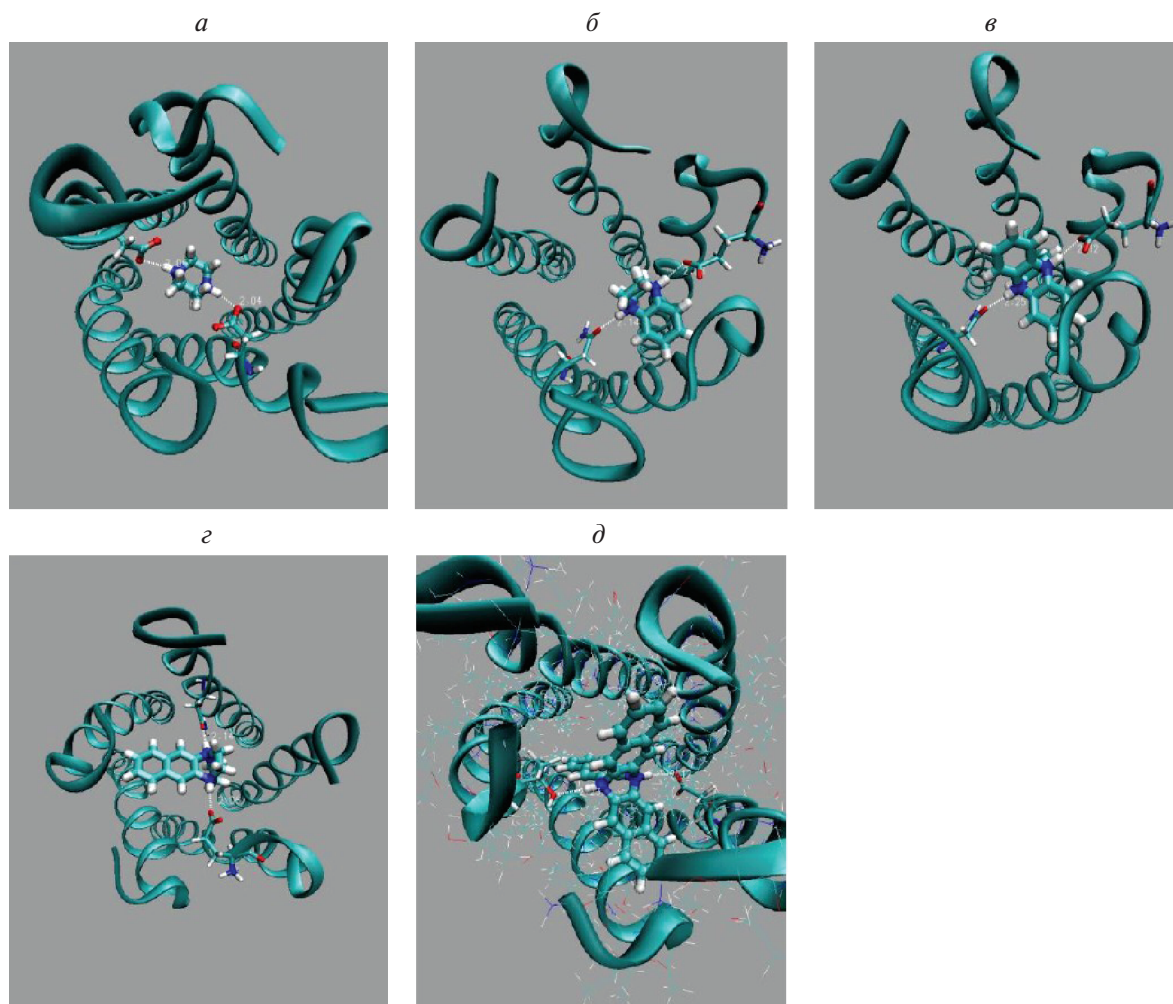


Рис. 6. Структура наиболее вероятных комплексов мутантного, *mut1*, Е-канала с оптимально связанными молекулами блокаторов: DABCO (а), DABCOB (б), DABCO3B (в), DABCON (г), DABCO3N (д).

Таблица 8. Сайты связывания производных DABCO с мутантным, *mut1*, Е-белком вируса SARS-CoV-2 [Glu8-Asp¹⁵(A, B, C, D, E)]

Молекула-блокатор	ePL	eVDW	eCoul	eHb	Y...HX	Расстояние, Å	eSolv	in(out)
DABCO ^a	-36.5 -35.3 -30.3	-10.2 -10.5 -15.1	-15.1 -12.7 -6.0	-9.8 -10.0 -9.8	ASP15A-OD1...HN1	2.04	-1.4 -1.1 0.3	<i>in</i> <i>in</i> <i>in</i>
					ASP15C-OD2...HN2	2.06		
					ASP15A-OD2...HN1	1.88		
					ASP15C-OD1...HN2	2.0		
					ASP15A-OD1...HN1	2.05		
					THR11B-OG1 HN2...	2.06		
DABCOB	-43.0 -38.4 -36.6	-15.8 -18.9 -18.5	-16.8 -8.0 -10.2	-9.9 -10.0 -8.6	ASP15A-OD1...HN1	1.90	-0.8 -1.4 0.7	<i>in</i> <i>in</i> <i>in</i>
					ASP15C-OD1...HN2	2.04		
					ASP15A-OD1...HN1	1.93		
					THR11D-OG1 HN2	2.04		
					ASP15B-OG1...HN2	1.99		
					LEU12A-O...HN1	2.26		
DABCO3B	-56.5 -47.2 -46.2	-32.3 -29.8 -32.9	-17.4 -11.0 -4.9	-9.7 -9.4 -9.7	ASP15A-OD2...HN1	2.09	2.8 3.0 1.3	<i>in</i> <i>in</i> <i>in</i>
					ASP15D-OD1...HN2	2.05		
					ASP15A-OD1...HN1	2.13		
					THR11D-OG1...HN2	2.11		
					ASP15A-OD1...HN1	2.02		
					THR11B-O...HN2	2.10		
DABCON	-45.2 -42.4 -38.6	-19.7 -19.3 -23.5	-16.1 -11.9 -5.7	-9.9 -10.1 -9.1	ASP15A-OD1...HD1	1.95	0.6 -1.1 -0.3	<i>in</i> <i>in</i> <i>in</i>
					ASP15C-OD1...HN2	2.04		
					ASP15A-OD1...HN1	1.95		
					ASP15C-OD1...HN2	2.04		
					ASP8-OD1...HN1	1.95		
					LEU63-O...HN2	2.12		
DABCO3N	-60.5 -57.3 -57.7	-47.0 -45.0 -54.1	-5.3 -9.8 3.4	-8.9 -4.8 -9.1	ASP15A-OD2...HN1	2.12	0.7 2.3 2.0	<i>in</i> <i>in</i> <i>in</i>
					THR11D-OG1...HN2	2.23		
					ASP15A-OG1... HN1	2.04		
					THR11B-O ...HN2	2.40		
					SER60D-OG...HN1	2.21		
					ALA43A-O...HN2	2.15		

Примечание. ePL — полная энергия связывания блокатора с белком Е, ккал/моль;

eVDW — энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий;

eCoul — энергия электростатических взаимодействий;

eHb^a — энергия водородных связей;

Y — акцептор водородной связи молекулы блокатора с атомами Е-канала;

HX — донор водородной связи;

eSolv — взаимодействие с растворителем;

in(out) — позиция связывания лиганда, in/out — внутри/вне Е-канала.

характеризуется заменой заряженных кислотных остатков GLU8 (A, B, C, D, E) на нейтральные GLN8. Моделирование мутанта GLU8/GLN8 показывает заметное увеличение энергии структуры *mut2* на ~ 60 ккал/моль относительно энергии мутанта *mut1* и на ~90 ккал/моль относительно нативного белка Е. Структуры сайтов, предпочтительных по энергии связывания, для пяти молекул лигандов DABCO, DABCOB, DABCO3B, DABCON, DABCO3N, с мутантом *mut2* Е-канала приведены в табл. 9. Наиболее предпочтительные структуры связывания пяти молекул блокаторов с мутантным, *mut2*, Е-каналом показаны на рис. 7. Видно, что только молекула блокатора, DABCO3N, имеет сайт

связывания внутри канала Е (табл. 9) с энергией, близкой к энергии оптимального сайта связывания вне канала. То есть молекула блокатора DABCO3N, связываясь в Е-канале, может блокировать канал с вероятностью ~1/2.

Анализ результатов для мутанта Е-канала, *mut2*, табл. 9 и сравнение с расчетами для нативной, *mut0*, структуры с зарядом 1 е.и., мутантом *mut1* с зарядом 2 е.и., показывает, что нейтральный мутант, *mut2*, Е-канала обладает наименьшей вероятностью связывания молекул блокаторов внутри Е-канала. Можно отметить, что энергия связывания молекулы лиганда DABCO3N линейно коррелирует с зарядами остатков, формирующих вход в Е-канал,

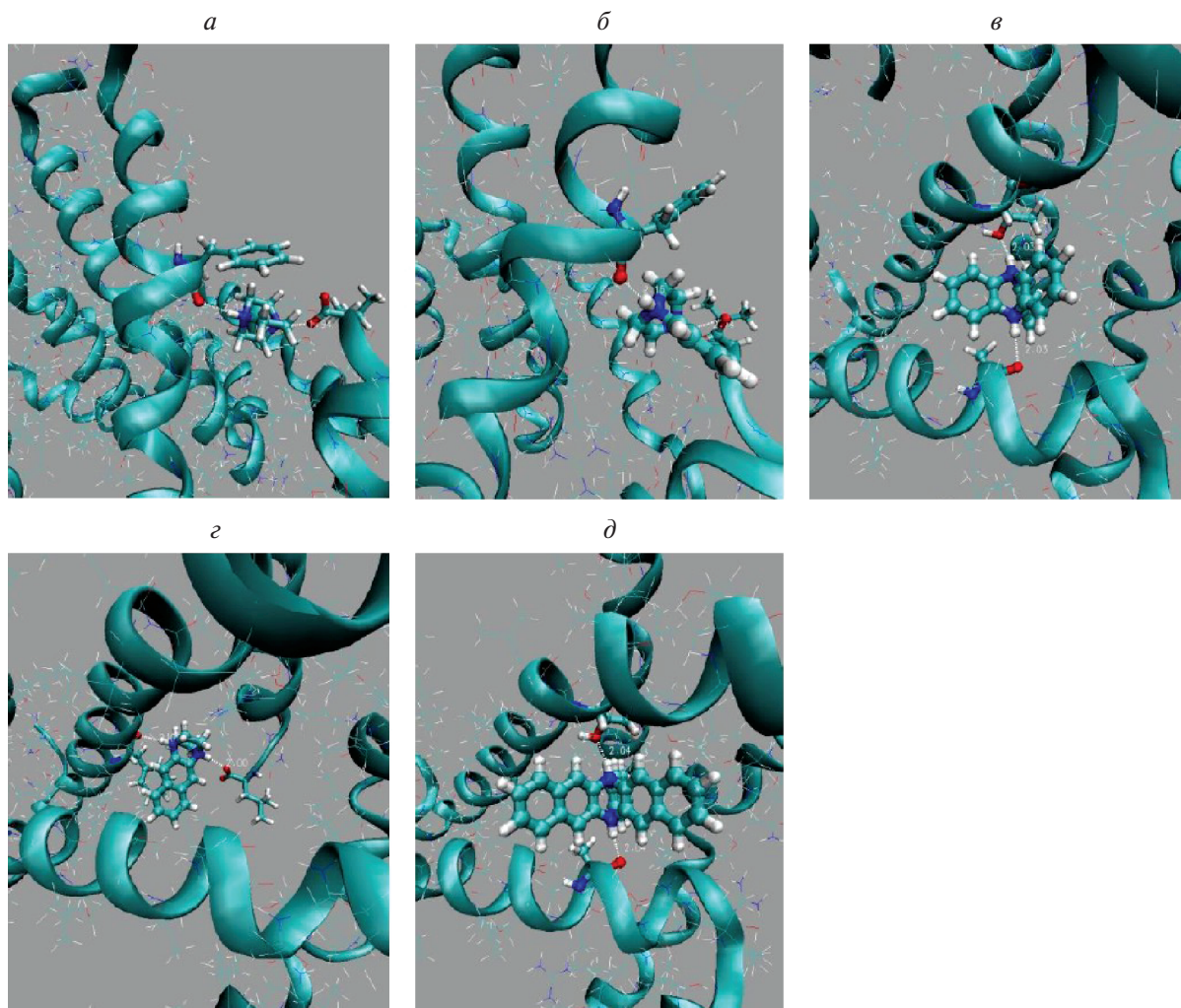


Рис. 7. Структура наивероятных комплексов мутанта Е канала, *mut2*, с молекулами блокаторов: (а) DABCO; (б) DABCOB; (в) DABCO3B; (г) DABCON; (д) DABCO3N.

энергии равны -61.5 , -58.1 и -54.6 ккал/моль, соответственно, для структур *mut1*, *mut0*, *mut2*, имеющих заряды -2 , -1 и 0 е.у. соответственно.

Анализ результатов, представленных в табл. 6–9, показывает, что для положительно заряженных $+2$ е.у., молекул блокаторов DABCO, DABCOB, DABCO3B, DABCON, DABCO3N критически важны электростатические взаимодействия с нативной и мутантными структурами ионного канала Е. Вероятность захвата ионов H^+/K^+ в канал Е с последующей диффузией ионов вдоль канала будет значительно снижена для нейтрального мутанта *mut2*, по сравнению со связыванием для заряженных нативной, -1 е.у., и *mut1*, -2 е.у., структур Е-канала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлены результаты конструирования молекул лекарственных препаратов, положительно, $+2$ е.у., заряженных производных

диазабициклооктана, которые могут эффективно связываться внутри М2- и Е-каналов вирусов гриппа А и SARS-CoV-2 и блокировать транспорт ионов H^+/K^+ через клеточную мембрану, нарушая функционирование вирусов. В физиологических условиях проведено моделирование тепловой динамики структур нативных белков, формирующих М2- и Е-каналы, а также наиболее вероятных мутантных структур каналов. Методом исчерпывающего докинга определены наиболее вероятные позиции и энергии связывания серии положительно заряженных молекул блокаторов с нативными и мутантными структурами М2- и Е-каналов в физиологических условиях. Определены оптимальные структуры молекул блокаторов, связывающихся в М2- и Е-каналах с высокой энергией, 30 – 50 ккал/моль.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-04-00005-а и бюджетным проектом, финансируемым Правительством Российской Федерации для Института химической

Таблица 9. Сайты связывания производных DABCO с мутантным, *mut2*, E-каналом вируса SARS-CoV-2 [Gln8Asn15]

Молекула блокатор	ePL	eVDW	eCoul	eHb	Y ... HX Dist, Å	eSolv	in(out)
DABCO	–25.6 –25.3 –18.5	–17.7 –11.9 –13.6	8.1 0.1 8.3	–9.8 –9.7 –9.5	THR35C-OG1...HN1 2.09 ASN45B-OD1...HN2 2.06 LEU65C-OXT...HN1 1.94 PHE20D-O...HN2 2.14 ASN15B-OD1...HN1 2.11 ASN15C-OD1...HN2 2.10	–6.8 –3.8 –3.7	out out in
DABCOB	–32.9 –32.6 –28.9	–14.7 –18.9 –19.6	–4.3 2.5 3.0	–9.7 –9.8 –9.6	PHE20D-O...HN1 2.15 LEU65C-O...HN2 1.87 ASN45B-OD1...HN1 2.03 THR35C-O...HN2 2.15 ASN15C-OD1...HN1 2.04 ASN15B-OD1...HN2 2.10	–4.3 –6.4 –2.7	out out in
DABCO3B	–43.6 –41.0 –31.1	–35.3 –33.5 –24.1	0.8 1.3 5.7	–9.4 –8.2 –9.8	ALA24E-O...HN1 2.03 THR30D-OE1...HN2 2.02 LEU37D-O...HN1 2.30 ASN45C-OD1...HN2 2.03 GLN10A-O...HN1 2.07 THR9B-OG1...HN2 2.15	0.2 –0.6 –2.9	out out in
DABCON	–37.4 –33.8 –33.9	–21.1 –18.8 –25.7	–1.8 0.2 2.4	–9.8 –9.8 –9.7	PHE20D-O...HN1 2.08 LEU65C-OXT...HN2 2.03 LEU65B-O...HN1 1.90 THR55C-OG1...HN2 2.13 ASN15C-OG1...HN1 2.06 ASN15C-OG1...HN2 2.12	–4.7 –5.4 –0.9	out out in
DABCO3N	–54.6 –53.7 –45.3	–45.3 –40.4 –50.9	1.5 1.9 2.4	–9.3 –9.0 –5.0	ALA32E-O...HN1 2.04 THR30D-OG1H...N2 2.04 ASN45C-OD1...HN1 2.10 THR35C-OG1...HN1 2.25 ASN64C-OD1...HN1 1.98	–1.5 –6.2 –1.4	in out out

Примечание. ePL — полная энергия связывания лиганда с белком E, ккал/моль;

eVDW — энергия электростатических взаимодействий;

eCoul — энергия электростатических взаимодействий;

eHb — энергия водородных связей;

Y — акцептор водородной связи молекулы блокатора с атомами E-канала;

HX — донор водородной связи;

eSolv — взаимодействие с растворителем;

in/out — позиция связывания лиганда, внутри/вне E-канала.

биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук: № AAAA-A17-117020210022-4.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rudneva I., Ignatieva A., Timofeeva T., Shilov A., Kushch A., Masalova O., Klimova R., Bovin N., Mochalova L., Kaverin N. (2012) Escape mutants of pandemic influenza A/H1N12009 virus: variations in antigenic specificity and receptor affinity of the hemagglutinin. *Virus Res.* **166**, 61–67. doi: 10.1016/j.virusres.2012.03.003
- Wever P.C., Bergen L. (2014) Death from 1918 pandemic influenza during the First World War: a perspective from personal and anecdotal evidence. *Influenza Other Respir. Viruses.* **8**, 538–546. doi:10.1111/irv.12267
- Ullrich S., Ekanayake K.B., Otting G., Nitsche C. (2022) Main protease mutants of SARS-CoV-2 variants remain susceptible. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **62**, 128629. doi:10.1016/j.bmcl.2022.128629
- Wang Q., Ye S.B., Zhou Z.J., Song A.L., Zhu X., Peng J.M., Liang R.M., Yang C.H., Yu X.W., Huang X., Yu J., Qiu Y., Ge X.Y. (2022) Key mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 affecting neutralization resistance and viral internalization. *J. Med Virol.* **95**, e28407. https://doi.org/10.1002/jmv.28407
- Stouffer A.L., Acharya R., Salom D., Levine A.S., Costanzo L.D., Soto C.S., Tereshko V., Nanda V., Staybrook S., DeGrado W.E. (2008) Structural basis for the function

- and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature*. **451**(7178), 596–599. doi:10.1038/nature06528
6. Vorobiev Y.N. (2021) An effective molecular blocker of ion channel of M2 protein as anti-influenza drug. *J. Biomol. Struct. Dynamics*. **39**(7), 2352–2363. doi.org/10.1080/07391102.2020.1747550
 7. Mandala V.S., McKay M.J., Shcherbakov A.A., Dregni A.J., Kolocouris A., Hang M. (2022) Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27**, 1202–1208. doi:10.1038/s41594-020-00536-8
 8. Surya W., Li Y., Torres J. (2018) Structural model of the SARS coronavirus E channel in LMPG micelles. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860**, 1309–1317. doi.org/10.1016/j.bbmem.2018.02.017
 9. Pinto L.H., Holsinger L.J., Lamb R.A. (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*. **69**(3), 517–528. doi.org/10.1016/0092-8674(92)90452-I
 10. Ruch T.R., Machamer C.E. (2011) The hydrophobic domain of infectious bronchitis virus E protein alters the host secretory pathway and is important for release of infectious virus. *J. Virol.* **85**, 675–685. doi: 10.1128/JVI.01570-10
 11. Nieto-Torres J.L., DeDiego D.I., Verdiá-Báguena C., Jimenez-Guardeño J.M., Regla-Nava J.A., Fernandez-Delgado R., Castaño-Rodríguez C., Alcaraz A., Torres J., Aguilera V.M., Enjuanes L. (2014) Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog.* **10**(5), e1004077. doi:10.1371/journal.ppat.1004077
 12. Singh Tomar P.P., Arkin I.T. (2020) SARS-CoV-2 E protein is a potential ion channel that can be inhibited by Gliclazide and Memantine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **530**, 10–14. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.05.206
 13. Gurumallappa, Arun Renganathan R.R., Hema M.K., Karthik C.S., Rani S., Nethaji M., Jayanth H.S., Mallu P., Lokanath N.K., Ravishankar Rai V. (2021) 4-acetamido-3-nitrobenzoic acid — structural quantum chemical studies, ADMET and molecular docking studies of SARS-CoV2. *J. Biomol. Struct. Dynamics*. **40**(14), 6656–6670. doi:10.1080/07391102.2021.1889664
 14. Schoeman D., Fielding B.C. (2019) Coronavirus envelope protein: current knowledge. *J. Virol.* **16**, 69–91. doi:10.1186/s12985-019-1182-0
 15. DeDiego M.L., Alvarez E., Almazán F., Rojas M.T., Lami-rande E., Roberts A., Shieh W.-J., Zaki S.R., Subbarao K., Enjuanes L. (2007) A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J. Virol.* **81**, 1701–1713. doi:10.1128/JVI.01467-06
 16. Torres J., Maheswari U., Parthasarathy K., Lifang Ng, Liu D.X., Gong X. (2007) Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein. *Protein Sci.* **16**, 2065–2071. doi:10.1110/ps.062730007
 17. Verdiá-Báguena C., Nieto-Torres J.L., Alcaraz A., DeDiego M.L., Torres J., Aguilera V.M., Enjuanes L. (2012) Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids. *Virology*. **432**, 485–494. doi:10.1016/j.virol.2012.07.005
 18. Surya W., Li Y., Verdiá-Báguena C., Aguilera V.M., Torres J. (2015) MERS coronavirus envelope protein has a single transmembrane domain that forms pentameric ion channels. *Virus Res.* **201**, 61–66. doi:10.1016/j.virusres.2015.02.023
 19. Wilson L., Gage P., Ewart G. (2006) Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology*. **353**, 294–306. doi:10.1016/j.virol.2006.05.028
 20. To J., Surya W., Fung T.S., Li W., Verdiá-Báguena C., Queralt-Martin M., Aguilera V.M., Liu D.X., Torres J. (2017) Channel-inactivating mutations and their revertant mutants in the envelope protein of infectious bronchitis virus. *J. Virol.* **91**, e02158–16. doi:10.1128/JVI.02158-16
 21. Pervushin K., Tan E., Parthasarathy K., Lin X., Jiang F.L., Yu D., Vararattanavech A., Soong T.W., Liu D.X., Torres J. (2009) Structure and inhibition of the SARS coronavirus envelope protein ion channel. *PLoS Pathog.* **5**, e1000511. doi:10.1371/journal.ppat.1000511
 22. Torres J., Parthasarathy K., Lin X., Saravanan R., Kukol A., Liu D.X. (2009) Model of a putative pore: the pentameric alpha-helical bundle of SARS coronavirus E protein in lipid bilayers. *Biophys. J.* **91**, 938–947. doi:10.1529/biophysj.105.080119
 23. Mandala V.S., McKay M.J., Shcherbakov A.A., Dregni A.J., Kolocouris A., Hong M. (2020) Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27**, 1202–1208. https://doi.org/10.1038/s41594-020-00536-8
 24. Parthasarathy K., Ng L., Lin X., Liu D.X., Pervushin K., Gong X., Torres J. (2008) Structural flexibility of the pentameric SARS coronavirus envelope protein ion channel. *Biophys. J.* **95**, L39–L41. doi:10.1529/biophysj.108.133041
 25. Hanning Chen, Yujie Wu, Voth G.A. (2007) Proton transport behavior through the influenza A M2 channel: Insights from molecular simulation. *Biophys. J.* **93**, 3470–3479. doi: 10.1529/biophysj.107.105742
 26. Tang Y., Zaitseva F., Lamb R.A., Pinto L.H. (2002) The gate of the influenza virus M2 proton channel is formed by a single tryptophan residue. *J. Biol. Chem.* **277**, 39880–39886. doi:10.1074/jbc.M206582200
 27. Воробьев Ю.Н. (2020) Конструирование эффективного ингибитора ионного канала белка M2 вируса гриппа А. *Молекуляр. биология*. **54**, 321–332.
 28. Vorobiev Y.N. (2021) Design of effective molecular blocker of e protein channel as anti SARS-CoV-2 virus. *Drug Des.* **10**, 183.
 29. Vorobiev Y.N. (2022) Molecular blocker of native and mutant E protein ion channel of SARS-CoV-2 virus. *Drug Des.* **11**, 205.
 30. Попов А.В., Воробьев Ю.Н. (2010) Программа GUI-BioPASED для моделирования молекулярной биополимеров с графическим пользовательским интерфейсом. *Молекуляр. биология*. **44**(4), 735–742.
 31. Vorobiev Y.N., Almagro J.C., Hermans J. (1998) Discrimination between native and intentionally misfolded conformations of proteins: ES/IS, a new method for calculating conformational free energy that uses both dynamics

- simulations with an explicit solvent and an implicit solvent continuum model. *Proteins*. **32**, 399–413.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980901\)32:4<399::AID-PROT1>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980901)32:4<399::AID-PROT1>3.0.CO;2-C)
32. Vorobjev Y.N. (2011) Advances in implicit models of water solvent to compute conformational free energy and molecular dynamics of proteins at constant pH. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **85**, 281–322.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386485-7.00008-9>
 33. Vorobjev Y.N. (2014) Modeling of Electrostatic Effects in Macromolecules. Ed. Liwo A. In: *Computational Methods to Study the Structure and Dynamics of Biomolecules and Biomolecular Processes: From Bioinformatics to Molecular Quantum Mechanics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1, pp. 151–194. doi: 10.1007/978-3-642-28554-7_6
 34. Vorobjev Y.N., Scheraga H.A., Vila J.A. (2018) Coupled molecular dynamics and continuum electrostatic method to compute the ionization pK_a's of proteins as a function of pH. Test on a large set of proteins. *J. Biomol. Struct. Dynamics*. 563–574.
 doi:10.1080/07391102.2017.1288169
 35. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. (1995) A second generation for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179–5197.
 doi: 10.1021/ja00124a002
 36. Wang J., Cieplak P., Kollman P.A. (2000) How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **21**, 1049–1074.
[doi.org/10.1002/1096-987X\(200009\)21:12%3C1049::AID-JCC3%3E3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1096-987X(200009)21:12%3C1049::AID-JCC3%3E3.0.CO;2-F)
 37. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. (2004) Development and testing of a general amber force fields. *J. Comput. Chem.* **27**, 1157–1174. doi:10.1002/jcc.20035
 38. Vorobjev Y.N. (2010) Blind docking method combining search of low-resolution binding sites with ligand pose refinement by molecular dynamics-based global optimization. *J. Comp. Chem.* **31**, 1080–1092.
 doi: 10.1002/jcc.21394
 39. Mohga F.M., Youssef A.A.A. (2001) Dielectric permittivity and AC conductivity investigation for the new model lipid bilayer material: (CH₂)₁₀ (NH₃)₂CdCl₄ *Z. Naturforsch.* **56A**, 568–578.
 40. Vorobjev Y.N., Hermans J. (1997) SIMS, computation of a smooth invariant molecular surface. *Biophysical J.* **73**, 722–732.
 doi: 10.1016/S0006-3495(97)78105-0
 41. Löffler G., Schreiber H. (1997) The frequency-dependent conductivity of a saturated solution of ZnBr₂ in water: A molecular dynamics simulation. *J. Chem. Phys.* **107**, 3135–3143.
doi.org/10.1063/1.474703
 42. Li C., Li L., Zhang J., Alexov E. (2012) Highly efficient and exact method for parallelization of grid-based algorithms and its implementation in DelPhi. *J. Comput. Chem.* **33**, 1960–1966.
 doi:10.1002/jcc.23033
 43. Li L., Li C., Zhang Z., Alexov E. (2013) On the dielectric “Constant” of proteins: smooth dielectric function for macromolecular modeling and its implementation in DelPhi. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 2126–2136.
<https://doi.org/10.1021/ct400065j>
 44. Moffat J.S., Vijayvergiya V., Gao P.F., Cross T.A., Woodbury D.J., Busath D.D. (2008) Proton transport through influenza A virus M2 protein reconstituted in vesicles. *Biophys. J.* **94**, 434–445.
 doi: 10.1529/biophysj.107.109082
 45. Hari Z.S., Moorthy N., Poongavanam V., Pratheepa V. (2014) Viral M2 Ion channel protein: a promising target for anti-influenza drug discovery. *Med. Chem.* **14**, 819–830.
 doi: 10.2174/138955751410141020150822
 46. Olsen R.W. (2006) Picrotoxin-like channel blockers of GABA_A receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **103**, 6081–6082.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601121103
 47. Thomaston J.L., Polizzi N.F., Konstantinidi A., Wang J., Kolocouris A., DeGrado W.F. (2018) Inhibitors of the M2 proton channel engage and disrupt transmembrane networks of hydrogen-bonded waters. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 15219–15226.
 doi: 10.1021/jacs.8b06741
 48. Mustafa M., Henderson D.J., Busath D.D. (2009) Free-energy profiles for ions in the influenza M2-TMD channel. *Proteins*. **76**, 794–807.
 doi:10.1002/prot.22376
 49. Homeyer N., Ioannidis H., Kolarov F., Gauglitz G., Zikos C., Kolocouris A., Gohlke H. (2016) Interpreting thermodynamic profiles of aminoadamantane compounds inhibiting the m2 proton channel of influenza A by free energy calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **56**, 110–126.
 doi: 10.1021/acs.jcim.5b00467
 50. Holsinger L.J., Nichani D., Pinto L.H., Lamb R.A. (1994) Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. *J. Virol.* **68**, 1551–1563.
 doi: 10.1128/jvi.68.3.1551-1563.1994
 51. Wang J., Kim S., Kovacs F., Cross T.A. (2001) Structure of the trans membrane region of the M2 protein H⁺ channel. *Protein Sci.* **10**, 2241–2250.
 doi:10.1110/ps.17901
 52. Cady S.D., Mishanina T.V., Hong M. (2009) Structure of amantadine-bound M2 transmembrane peptide of influenza A in lipid bilayers from magic-angle-spinning solid-state NMR: the role of Ser31 in amantadine binding. *J. Mol. Biol.* **385**, 1127–1141.
doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.022
 53. Cady S.D., Schmidt-Rohr K., Wang J., Soto C.S., DeGrado W.F., Hong M. (2010) Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature*. **463**, 689–692.
<https://doi.org/10.1038/nature08722>
 54. Hong M., DeGrado W.F. (2012) Structural basis for proton conduction and inhibition by the influenza M2 protein. *Protein Sci.* **21**, 1620–1633.
 doi: 10.1002/pro.2158
 55. PAM1 Mutation Matrix (1978) Atlas of protein sequence and structure. **5**(Suppl. 3).
<http://profs.scienze.univr.it/~liptak/ACB/files/PAMMutationMatrices.pdf>

Molecular Ion Channel Blockers of Influenza A and SARS-CoV-2 Viruses

Yu. N. Vorobjev^{1, *}

*¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: ynvorob@niboch.nsc.ru*

Drug molecules that block the functional cycle of influenza A and SARS-CoV-2 viruses are proposed. The blocker molecules effectively binding inside the M2 and E-channels of influenza A and SARS-CoV-2 viruses and blocking the diffusion of H⁺/K⁺ ions destroy the functional cycle of viruses. A family of positively charged, +2 e.u., molecular blockers of H⁺ /K⁺ ion diffusion through M2 and E-channels is proposed. The blocker molecules, derivatives of diazabicyclooctane, was investigated for its binding affinity to the channels M2 and E. Thermal dynamics and binding affinity were modeled by the exhaustive docking method sites. Blocker molecules with higher affinity for the blocking sites were proposed. The most probable mutations of amino acids of protein M2 and E channels are considered, the effectiveness of channel blocking are analyzed and optimal structures of blocker molecules are proposed.

Keywords: influenza A and SARS-CoV-2 viruses, M2 and E protein ion channel, molecular dynamics, M2 and E ion channel blockers, diazabicyclooctane derivatives, binding and blocking of M2 and E channels