

**ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
ИНГИБИТОРОВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2
И ПРЕДСКАЗАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

**А.М. Андрианов¹, К.В. Фурс², А.М. Юшкевич²,
А.В. Гончар², А.В. Тузиков²**

¹*Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси,
ул. ак. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь,
alexande.andriano@yandex.ru*

²*Объединенный институт проблем информатики, Национальная академия наук
Беларуси, 220012, ул. Сурганова, 6, Минск, Республика Беларусь,
tuzikov@newman.bas-net.by*

С целью обнаружения потенциальных ингибиторов коронавируса SARS-CoV-2 сформирована виртуальная молекулярная библиотека, включающая 28 860 химических соединений из баз данных DrugBank, Zinc15 и Selleck Chemicals, которые находятся на разных стадиях биомедицинских испытаний или используются в клинической практике. Методами молекулярного моделирования проведена оценка аффинности связывания этих соединений с тримером HR1 S-белка SARS-CoV-2, который участвует в образовании 6-ти спирального пучка 6-HB (six-helix bundle), инициирующего механизм слияния мембран вируса и клетки хозяина. В результате проведенных исследований идентифицированы 12 молекул, характеризующихся высоким химическим сродством к этому функционально важному участку оболочки вируса. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования этих соединений в работах по созданию новых противовирусных препаратов – ингибиторов слияния SARS-CoV-2, способных блокировать проникновение вируса в клетку хозяина.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; белок S; тример HR1; ингибиторы слияния SARS-CoV-2; молекулярное моделирование; противовирусные препараты.

**VIRTUAL SCREENING OF POTENTIAL SARS-CoV-2 INHIBITORS
AND PREDICTION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY
BY MOLECULAR MODELING METHODS**

**A.M. Andrianov^a, K.V. Furs^b, A.M. Yushkevich^b,
A.V. Gonchar^b, A.V. Tuzikov^b**

^a*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ac. Kuprevich str., 5/2, Surganov str., Minsk, Republic of Belarus*

^b*United Institute of Informatics Problems, National Academy of Sciences of Belarus,
Surganov str., 6, Minsk, Republic of Belarus*

To identify potential SARS-CoV-2 inhibitors, a virtual molecular library containing 28 860 chemical compounds from the DrugBank, Zinc15 and Selleck Chemicals databases that are at the stages of biomedical research or application in the clinic was formed. The binding affinity of these compounds to the HR1 trimer of the SARS-CoV-2 spike protein which is involved in the formation of the six-helix bundle (6-HB) critically important for the virus-cell membrane fusion was evaluated using molecular modeling tools. As a result, 12 molecules exhibiting a high binding affinity to this functionally important site of the viral envelope were identified. The data obtained indicate the promise of using these compounds in the development of novel antiviral drugs presenting the SARS-CoV-2 fusion inhibitors able to block the virus entry into the host cell.

Keywords: SARS-CoV-2; protein S; trimer HR1; SARS-CoV-2 fusion inhibitors; molecular modeling; antiviral drugs.

Введение

Разработка ингибиторов коронавирусов, блокирующих их репликацию на различных этапах жизненного цикла, зависит от выявления консервативных и функционально важных целевых сайтов, которые могут быть использованы в качестве перспективных мишеней для создания противовирусных препаратов широкого спектра действия. Шиповидный белок оболочки коронавируса человека SARS-CoV-2 – этиологического агента COVID-19 – является трансмембранным гликопротеином класса I и включает две субъединицы S1 и S2, играющие ключевую роль в распознавании рецепторов, связывании, слиянии мембран и последующем проникновении вирусного генома в клетку-мишень [1]. Взаимодействие рецептор-связывающего сайта в субъединице S1 с клеточным рецептором ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) вызывает структурные изменения в субъединице S2, приводящие к обнажению пептида слияния и его внедрению в клеточную мембрану. Затем три спирали HR1 связываются друг с другом, образуя внутренний тример с тремя открытыми гидрофобными бороздками. Взаимодействие тримера HR1 со спиралью домена HR2 приводит к формированию консервативного 6-ти спирального пучка 6-НВ (six-helix bundle), инициирующего сближение мембран вируса и клетки-мишени [1]. Необходимо отметить, что образование 6-НВ, главным образом опосредованное областями HR1 и HR2 субъединицы S2 белка S, является общим для всех известных коронавирусов, включая доминирующий в настоящее время “омикрон”-штамм SARS-CoV-2 [2]. В связи с этим, представляется крайне перспективной стратегия создания противовирусных агентов широкого спектра действия, способных предотвращать образование 6-ти спирального пучка 6-НВ, критического для слияния мембран и инфективности вируса.

В настоящей работе методами виртуального скрининга идентифицированы малые молекулы, потенциально активные по отношению к домену HR1 белка S коронавируса. Для этого были проведены исследования, которые включали: 1) формирование виртуальной молекулярной библиотеки, содержащей соединения, находящиеся на стадиях лабораторных исследований, клинических испытаний или использования в медицинской практике; 2) молекулярный докинг этих соединений с доменом HR1 белка S SARS-CoV-2; 3) оценку аффинности связывания комплексов лиганд/HR1 с использованием оценочных функций AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>), RF-Score-4 (<https://pjballester.wordpress.com/software/>) и NNScore 2.0 (<https://git.durrantlab.pitt.edu/jdurrant/nnscore2>) с последующим расчетом экспоненциального консенсусного ранга [3]; 4) молекулярную динамику (МД) комплексов лиганд/HR1 и отбор соединений, перспективных для тестирования на противовирусную активность.

1. Материалы и методы

При формировании библиотеки биологически активных молекул учитывали следующие критерии: свободный академический доступ к данным, наличие структур соединений в формате файлов химических данных SDF (Structure Data File) (<https://www.fda.gov/media/151718/download>), активная поддержка баз данных и наличие информации о возможности синтеза и покупки молекулы. В соответствии с этими критериями были выбраны базы данных DrugBank (<https://go.drugbank.com/>), ZINC15 (<https://zinc.docking.org/>) и Selleck Chemicals (<https://www.selleckchem.com/>). В результате собранная виртуальная библиотека включала 28 806 соединений, потенциальную активность которых по отношению к домену HR1 SARS-CoV-2 оценивали методами молекулярного докинга.

Подготовку соединений для молекулярного докинга осуществляли с помощью программного пакета MGLTools (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/>). Докинг проводили с использованием программы AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>) в приближении жесткого рецептора и гибких лигандов. Структуру домена HR1 выделяли из его комплекса с доменом HR2 белка S SARS-CoV-2 в кристалле (PDB ID: 6LXT). Ячейка для докинга охватывала область белка S, которая включала сайт связывания пептида EK1 с доменом HR1 и имела следующие параметры: $\Delta X = 16,18 \text{ \AA}$, $\Delta Y = 13,62 \text{ \AA}$, $\Delta Z = 38,82 \text{ \AA}$ с центром в точках $X = -3,97 \text{ \AA}$, $Y = 1,81 \text{ \AA}$, $Z = -25,89 \text{ \AA}$. Параметр, характеризующий полноту

поиска (охват конформационного пространства), был задан равным 100 (<https://vina.scripps.edu>).

Молекулярную динамику комплексов лиганд/HR1 в воде выполняли в программном пакете Amber18 с использованием силовых полей Amber ff14SB (домен HR1) и GAFF (лиганды) (<https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>). Для задания парциальных зарядов атомов (модель AM1-BCC) использовали модуль Antechamber программного пакета AmberTools18 (<https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>). Атомы водорода добавляли с помощью программы tleap пакета AmberTools18. Комплексы помещали в кубическую коробку, заполняли растворителем (модель воды TIP3P; <https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>) и добавляли ионы Na^+ и Cl^- до значения ионной силы, равного 0,15 М. Систему минимизировали методами наискорейшего спуска (500 шагов) и сопряженных градиентов (500 шагов), нагревали от 0 К до 300 К в течение 50 *пс* в рамках статистического ансамбля NVT и термостата Ланжевена, а затем уравнивали в течение 50 *пс* и давлении 1,0 атм (ансамбль NPT, баростат Берендсена). На заключительном шаге систему уравнивали в течение 0,5 *нс* при постоянном объеме и проводили молекулярную динамику длительностью 150 *нс* в изобарно-изотермических условиях при температуре 300 К и давлении 1 атм.

2. Результаты и обсуждение

В результате анализа полученных данных были идентифицированы 12 соединений, лучших по значению экспоненциального консенсусного ранга и проявляющих высокое сродство к домену HR1 S-белка SARS-CoV-2. Поэтому эти соединения были отобраны в качестве наиболее перспективных кандидатов для разработки эффективных ингибиторов слияния коронавируса.

Исследование статических моделей комплексов лиганд/HR1 (рис.) показывает, что все идентифицированные соединения связываются с гидрофобной бороздкой между спиралями тримера и образуют широкую сеть межмолекулярных взаимодействий, включающую многочисленные ван-дер-ваальсовы контакты, водородные связи и катион-π взаимодействия. При этом доминирующую роль в стабилизации структурных комплексов домена HR1 SARS-CoV-2 с лигандами играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия, в которые вовлечены остатки, важные для образования 6-ти спирального пучка 6-НВ. Эффективность межмолекулярных взаимодей-

ствий обнаруженных соединений с доменом HR1 SARS-CoV-2 подтверждают низкие значения свободной энергии связывания, свидетельствующие о высоком химическом родстве этих лигандов к молекулярной мишени.

Данные молекулярной динамики согласуются с основными выводами, сделанными на основе анализа статических моделей комплексов лиганд/HR1. Эти комплексы относительно стабильны в течение МД расчетов, на что указывают средние значения свободной энергии связывания и соответствующие им стандартные отклонения (табл.). Вывод о стабильности динамических структур лиганд/HR1 подтверждают также данные о временных зависимостях свободной энергии связывания, свидетельствующие об отсутствии тенденции к увеличению значений ΔG с течением времени. Более того, комплексы соединений I–IV и VIII с доменом HR1 демонстрируют снижение средних значений энергии связывания на заключительных участках МД траекторий длительностью 50 *нс*, что является дополнительным свидетельством их конформационной стабильности.

Заключение

Таким образом, данные об аффинности связывания предсказанных соединений с тримером HR1, полученные с использованием разных оценочных функций, согласуются друг с другом, свидетельствуя о том, что вычислительный подход, примененный в данном исследовании, позволил избежать ложноположительных результатов и правильно оценить силу межмолекулярных взаимодействий.

В целом эти результаты обеспечивают убедительные доказательства того, что идентифицированные молекулы демонстрируют низкие значения свободной энергии связывания в комплексах с доменом HR1 и могут быть использованы в работах по созданию новых противовирусных препаратов – ингибиторов слияния SARS-CoV-2, блокирующих проникновение вируса в клетку хозяина.

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.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект X21COVID-003).

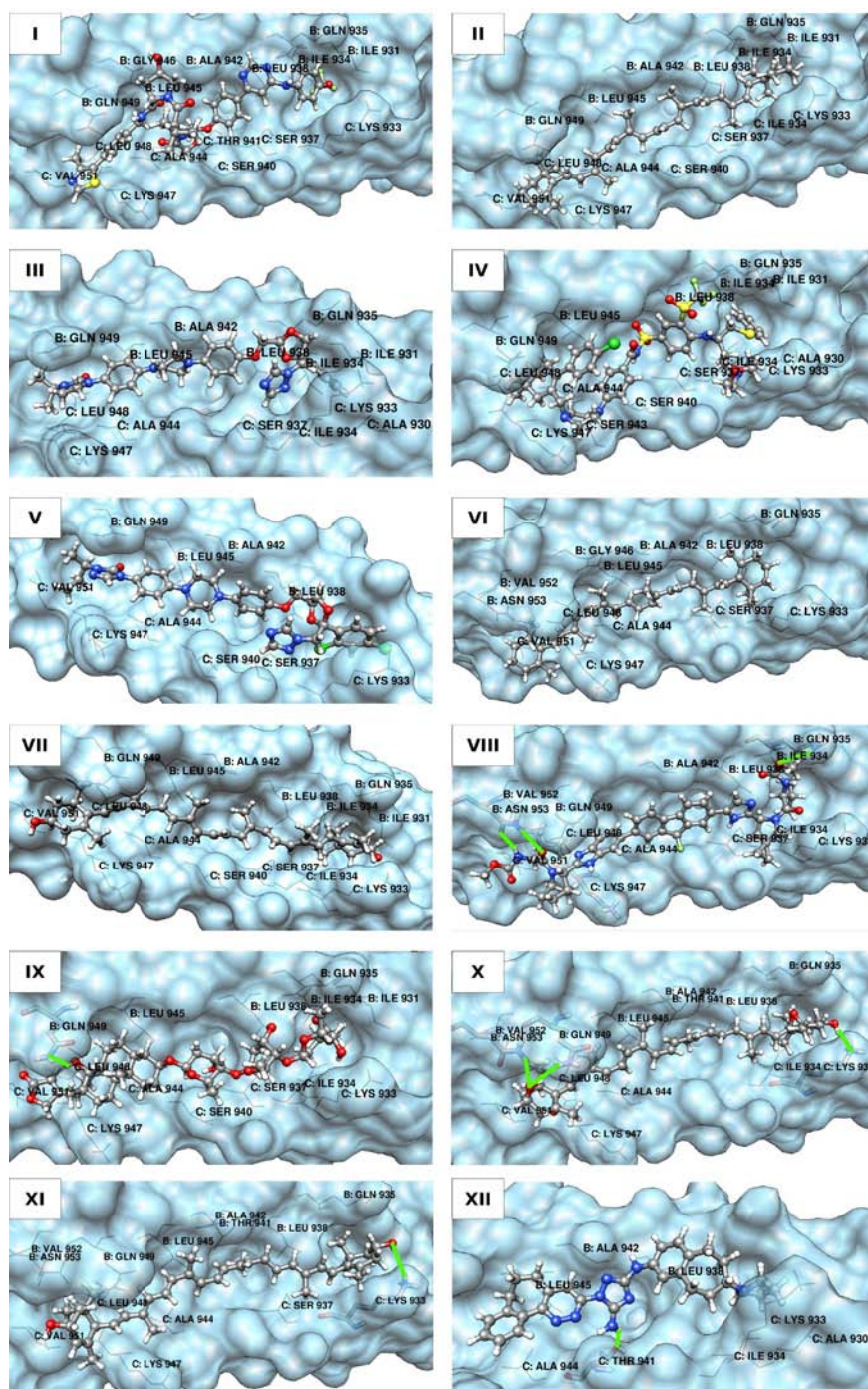


Рис. Структурные комплексы идентифицированных соединений с тримером HR1 S-белка SARS-CoV-2, построенные методом молекулярного докинга. Соединения представлены моделью “шарик-палочка”. Остатки HR1, образующие межатомные контакты с лигандами, указаны вместе с обозначениями соответствующих спиралей В и С в рентгеновской структуре тримера HR1 (PDB ID: 6LXT). Остатки HR1, участвующие в водородных связях, обозначены палочковой моделью. Водородные связи показаны сплошными зелеными линиями. Проволочная модель использована для обозначения остатков HR1, образующих ван-дер-ваальсовы контакты.

Таблица. Средние значения свободной энергии связывания $\langle \Delta G \rangle$ и соответствующие им стандартные отклонения ΔG_{STD} , рассчитанные для динамических моделей комплексов лиганд/HR1.

Лиганд	$\langle \Delta H \rangle$, ккал/моль	ΔH_{STD} , ккал/моль	$\langle T\Delta S \rangle$, ккал/моль	$(T\Delta S)_{\text{STD}}$, ккал/моль	$\langle \Delta G \rangle$, ккал/моль	ΔG_{STD} , ккал/моль
I	-39,36	4,40	-28,30	4,25	-12,98	4,23
II	-42,42	3,35	-28,93	2,74	-13,61	4,15
III	-37,35	5,10	-26,93	2,58	-10,80	5,43
IV	-36,22	5,99	-26,85	3,23	-9,25	6,68
V	-41,40	4,26	-28,42	2,83	-12,95	4,55
VI	-42,00	3,47	-29,65	3,34	-12,37	4,48
VII	-43,45	3,79	-30,73	3,21	-12,76	4,11
VIII	-36,50	5,56	-26,84	2,98	-9,44	5,14
IX	-41,55	4,94	-29,65	3,28	-11,47	4,67
X	-41,64	4,35	-30,47	3,19	-10,21	5,09
XI	-42,26	3,59	-30,75	3,14	-11,75	4,69
XII	-33,65	3,36	-23,88	2,72	-9,49	4,24

Библиографические ссылки

1. Wang X., Xia S., Zhu Y., Lu L., Jiang S. Pan-Coronavirus Fusion Inhibitors as the Hope for Today and Tomorrow // Protein Cell. 2021. № 12(2). P. 84–88.
2. Xia S., Chan J. F.-W., Wang L, Jiao F., Chik K. K.-H., Chu H., Lan Q., Xu W., Wang Q., Wang C., Yuen K.-Y., Lu L., Jiang S. Peptide-Based Pan-CoV Fusion Inhibitors Maintain High Potency Against SARS-CoV-2 Omicron Variant // Cell Res. 2022. P. 1–3. doi.org/10.1038/s41422-022-00617-x.
3. Palacio-Rodríguez K., Lans I., Cavasotto C. N., Cossio P. Exponential Consensus Ranking Improves the Outcome in Docking and Receptor Ensemble Docking // Sci. Rep. 2019. № 9 (1). P. 1–14.