

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ»

УДК 54.05:539.19:547.915.5:577.322

КОРНОУШЕНКО
ЮРИЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ВИЧ-1
НА ОСНОВЕ ГЛИКОСФИНГОЛИПИДОВ МЕТОДАМИ
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Минск 2016 г.

Работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель:

Андрианов Александр Михайлович,
доктор химических наук, главный
научный сотрудник лаборатории
белковой инженерии Института
биоорганической химии НАН Беларуси

Официальные оппоненты:

Шадыро Олег Иосифович,
доктор химических наук, профессор,
заведующий кафедрой радиационной
химии и химико-фармацевтических
технологий химического факультета
БГУ

Дромашко Сергей Евгеньевич,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией
моделирования генетических
процессов Института генетики и
цитологии НАН Беларуси

Оппонирующая организация:

Институт физико-органической химии
НАН Беларуси

Защита состоится «28» февраля 2017 г. в 13.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5/2, в зале заседаний Ученого Совета, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by, тел. (017) 267-85-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан « » января 2017 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук



С.В. Бабицкая

ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), впервые обнаруженный в 1983 г., является непосредственной причиной развития синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). По состоянию на 2015 г., количество ВИЧ-инфицированных пациентов в мире составило около 35 миллионов человек, причем большинство случаев заражения ВИЧ-инфекцией приходится на страны Азии, Африки и Южной Америки. Более высокий уровень заболеваемости и распространенности ВИЧ-инфекции в этих странах не снижает актуальности проблемы ВИЧ/СПИД для государств Северной Америки и Европы. В частности, это касается и Республики Беларусь. По состоянию на 1 июля 2015 г. (за период с 1987 – по 2015 г.) в Республике Беларусь было зарегистрировано 18 703 случаев ВИЧ-инфекции. Эти же показатели на 1 июня 2014 года составили 16 457 случаев. Хотя по состоянию на 2015 год темпы развития пандемии ВИЧ в мире снизились, все равно данная проблема требует экстренного решения. Для укрепления достижений в области терапии ВИЧ-инфекции и прогресса в создании более эффективных лекарственных препаратов необходимо глубокое понимание иммунопатогенеза заболевания, детальное изучение структурно-функциональных свойств вируса и качественно новые подходы в рациональном конструировании лекарственных препаратов против ВИЧ.

В последние годы для терапии ВИЧ-1 в клинической практике используются более 25 лекарственных препаратов, которые в зависимости от механизма действия делятся на классы, включающие ингибиторы обратной транскриптазы, протеазы, интегразы и ингибиторы проникновения. Однако высокая генетическая изменчивость ВИЧ-1 приводит к выработке устойчивости к определенному препарату через некоторое время после начала его применения. С 1995 года для лечения ВИЧ-инфекции широко используется метод высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), основной целью которого является преодоление устойчивости вируса к отдельным антиретровирусным препаратам на основе комбинации высокоактивных лекарственных средств, обладающих различными механизмами действия. В настоящее время ВААРТ формирует методологическую основу лечения больных с ВИЧ-инфекцией. Применение ВААРТ значительно увеличило продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов и повысило ее качество, снизило количество летальных исходов, уменьшило частоту развития СПИДа и ассоциированных с ним состояний. Тем не менее, стандартные схемы ВААРТ имеют ряд серьезных недостатков, к числу которых в первую очередь следует отнести токсичность используемых препаратов, часто вызывающую тяжелые побочные эффекты (вплоть до индивидуальной непереносимости), появление и передачу резистентных штаммов, взаимодействие лекарств между собой и их высокую

стоимость. Необходимость пожизненного непрерывного применения нескольких терапевтических препаратов и связанные с этим токсичность и возникновение резистентности требуют разработки новых анти-ВИЧ агентов с новыми механизмами действия. Большинство из применяемых в ВААРТ препаратов нацелены на вирусные ферменты: обратную транскриптазу и протеазу, однако они не могут предотвращать проникновение вируса в клетку-мишень, что повышает внимание к ингибиторам проникновения ВИЧ-1, которые способны вмешиваться в ранние стадии жизненного цикла вируса путем блокирования процессов адсорбции и слияния мембран. К преимуществам этих соединений можно отнести создание ими препятствия проникновению вируса в новые целевые клетки, уменьшение числа латентных резервуаров ВИЧ, возможность совместного использования с другими агентами, замедление общей скорости внедрения ВИЧ, что делает вирус более чувствительным к другим ингибиторам.

Для проникновения ВИЧ-1 в макрофаги и Т-лимфоциты необходимо связывание поверхностного белка gp120 оболочки вируса с клеточным рецептором CD4, а затем с хемокиновыми корецепторами CCR5 или CXCR4. После этого начинается процесс слияния мембран и проникновение вирусного генома в клетку-мишень. Петля V3 белка gp120 образует главную мишень для нейтрализующих антител, отвечает за связывание вируса с корецепторами CCR5 или CXCR4 и определяет предпочтения вируса по отношению к макрофагам и Т-лимфоцитам. В связи с этим, весьма актуальным представляется поиск химических соединений, способных нейтрализовать этот вариабельный домен белка gp120 ВИЧ-1. Согласно данным литературы, к таким соединениям можно отнести гликофинголипид β -галактозилцерамид (β -GalCer), который образует в некоторых чувствительных клетках первичный рецептор для ВИЧ-1, альтернативный молекуле CD4, используемой вирусом для проникновения в макрофаги и Т-лимфоциты. Применение этого гликолипида в качестве противовирусного препарата проблематично из-за его нерастворимости в воде. Однако аналоги β -GalCer, потенциально способные образовывать устойчивые коллоидные системы выше критической концентрации мицеллообразования («водорастворимые» аналоги), могут быть использованы как перспективные базовые структуры для создания новых ингибиторов проникновения ВИЧ-1, механизм действия которых основан на блокаде функционально важного участка оболочки вируса – петли V3 белка gp120.

В настоящей диссертационной работе методами молекулярного моделирования сконструирован ряд «растворимых» аналогов β -GalCer, проведена оценка их потенциальной нейтрализующей активности и осуществлен синтез двух производных гликолипида – потенциальных анти-ВИЧ агентов с широким спектром нейтрализующего действия.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Диссертационная работа выполнена в Институте биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси в рамках следующих проектов: задание 2.17 «Выяснение роли монооксигеназ в окислительном стрессе и лекарственной резистентности опухолевых клеток» Государственной программы научных исследований на 2011-2015 годы «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» (подпрограмма 2 «Синтез и получение биологически активных соединений для производства реагентов и лекарственных средств», Химфармсинтез, № г.р. 20114747); задание 4.22 «Новые рациональные подходы к разработке противоопухолевых и противовирусных препаратов на основе количественной оценки их воздействия на макромолекулы-мишени» Государственной программы научных исследований на 2011-2015 годы «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал (подпрограмма 2 «Синтез и получение биологически активных соединений для производства реагентов и лекарственных средств, Химфармсинтез, № г.р. 20143354); задание 3.2.05 «Исследование структурных свойств и мутаций вируса СПИДа на основе компьютерного моделирования, химического синтеза и медицинского тестирования)» Государственной программы научных исследований на 2011-2015 годы «Конвергенция» (№ г.р. 20130278); проект X12-022 Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований «Конструирование ингибиторов репликации ВИЧ-1 на основе β -галактозилцерамида методами молекулярного моделирования и химического синтеза» (№ г.р. 20122287); проект X15-022 Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований «Скрининг и молекулярное моделирование новых потенциальных ингибиторов ВИЧ-1 на основе моноклонального антитела 10e8, обладающего широким спектром нейтрализующей активности» (№ г.р. 20150985).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: Осуществить *in silico* дизайн и оценку потенциальной активности новых ингибиторов проникновения ВИЧ-1 на основе гликофинголипидов и синтезировать соединения, перспективные для разработки эффективных лекарственных препаратов с широкой вирусной нейтрализацией.

Задачи исследования:

1. Моделирование трехмерных структур петли V3 белка gp120 ВИЧ-1 для четырех различающихся по генетическим свойствам модификаций вируса, выделенных в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии от ВИЧ-позитивных пациентов.

2. Компьютерное конструирование аналогов β -GalCer, содержащих различные заместители остатка жирной кислоты по аминокгруппе агликона, и квантово-химические расчеты их трехмерных структур.

3. Построение структурных комплексов этих гликолипидов с петлей V3 ВИЧ-1 и идентификация типов межмолекулярных взаимодействий, ответственных за их энергетическую стабилизацию.

4. Получение β -галактозилсфингозина – деацилированного аналога β -GalCer – и его тестирование на противовирусную активность.

5. Разработка методики синтеза «растворимых» аналогов β -GalCer и ее апробация на примере N-(L- α -тирозинил)- β -галактозилсфингозина – потенциального ингибитора проникновения ВИЧ, сконструированного методами молекулярного моделирования.

Объект исследования – «растворимые» аналоги β -галактозилцерамида.

Предмет исследования – механизм взаимодействия аналогов β -GalCer с петлей V3 белка gp120 ВИЧ-1.

Научная новизна

В настоящее время методом рентгеноструктурного анализа определены трехмерные структуры нескольких гликолипидов в комплексах с белками, включая β -GalCer. Однако структуры их комплексов с петлей V3 белка gp120 ВИЧ-1 не установлены до сих пор, что, вероятно, связано с рядом технических трудностей, таких как проблема кристаллизации, сложность и дороговизна этого экспериментального метода. В связи с этим альтернативным подходом к решению проблемы является использование методов компьютерного молекулярного моделирования. В диссертационной работе впервые с помощью этих методов сконструированы 12 «растворимых» аналогов β -GalCer, рассчитаны их трехмерные структуры, построены комплексы гликолипидов с петлей V3 ВИЧ-1 и исследованы их динамические характеристики. Это позволило обнаружить два вероятных сайта связывания гликолипидов с V3-доменом ВИЧ-1, идентифицировать типы межмолекулярных взаимодействий, реализующихся при связывании гликолипидов с белком gp120, и предсказать на основе анализа полученных результатов потенциальную нейтрализующую активность сконструированных химических соединений. Впервые показано, что полученный в работе деацилированный аналог β -GalCer (β -галактозилсфингозин) обладает анти-ВИЧ активными свойствами и формирует перспективную базовую структуру для разработки его более эффективных модифицированных форм. Предложена и апробирована оригинальная методика синтеза таких соединений, включающая получение β -галактозилсфингозина и последующее его ацилирование остатками растворимых кислот по аминокгруппе сфингозинового основания.

Положения, выносимые на защиту

1. Расчет методом гомологичного моделирования трехмерных структур петли V3 белка gp120 ВИЧ-1 для четырех различающихся по генетическим свойствам модификаций вируса, которые представляют собой корректные молекулярные мишени для разработки новых ингибиторов проникновения ВИЧ с широким спектром нейтрализующего действия.

2. Сконструированные методами молекулярного моделирования аналоги β -GalCer, которые способны к специфическим и эффективным взаимодействиям с консервативными элементами структуры петли V3 белка gp120 ВИЧ-1.

3. Получение из церебровидов мозга свиньи домашней деацелированного аналога β -GalCer – β -галактозилсфингозина, ВИЧ-ингибирующие свойства которого предсказаны методами молекулярного моделирования и подтверждены в результате биологических испытаний.

4. Первый синтез аналога β -GalCer – N-(L- α -тирозинил)- β -галактозилсфингозина, ключевой стадией которого является ацилирование β -галактозилсфингозина по аминогруппе агликона.

Личный вклад соискателя

Все основные результаты, изложенные в диссертационной работе, получены автором самостоятельно. Определение темы и целей диссертационной работы, выбор методов исследования, анализ и обобщение полученных результатов проведены совместно с научным руководителем д.х.н. Андриановым А.М. Соавторами оказана консультационная (д.ф.-м.н., профессор, чл.-корр. Тузиков А.В.) и техническая (к.т.н Анищенко И.В., н.с. Кашин И.А.) помощь в выполнении теоретической части работы. Соавторы отдельных публикаций (д.х.н., профессор Кисель М.А., н.с. Николаевич В.А., н.с. Адамчик С.В.) оказали консультационную помощь в проведении химического синтеза. Тестирование β -галактозилсфингозина на анти-ВИЧ активность выполнено в РНЦ эпидемиологии и микробиологии (д.м.н., доцент Еремин В.Ф., д.м.н. Кучеров И.И.).

Апробация результатов диссертации

Основные результаты диссертации были представлены на Международных конференциях: «Молодежь в науке» (Беларусь, Минск, 2011, 2015), «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Россия, Казань, 2011), «Moscow Conference on Computational Molecular Biology» (Россия, Москва, 2011, 2013), «Conversation in Biomolecular Stereodynamics» (Олбани, США, 2013), «Суперкомпьютерные системы и их применение» (Беларусь, Минск, 2012), «Структура и функция биомолекул» (Беларусь, Минск, 2012, 2014), «Россия –

Беларусь – Сколково: единое инновационное пространство» (Беларусь, Минск, 2012), «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». X съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Беларусь, Минск, 2012), «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». XI съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Беларусь, Минск, 2014), «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». XII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Беларусь, Минск, 2016), «Современные проблемы биохимии». I Белорусский биохимический конгресс (Беларусь, Гродно, 2016), 12th International Symposium on Bioinformatics Research and Applications (Belarus, Minsk, 2016) и в финале Республиканского конкурса «100 идей для Беларуси» (Беларусь, Минск, 2016). Лауреат конкурса Белорусского профсоюза работников НАН Беларуси в номинации «Лучшая первая научная работа» (2012 год). Лауреат стипендии Президента Республики Беларусь для аспирантов (2013 год). Результаты диссертации вошли в цикл научных работ «Компьютерный скрининг и молекулярное моделирование новых потенциальных лекарственных препаратов против ВИЧ/СПИД», включенный в ТОП-10 результатов деятельности ученых НАН Беларуси в области фундаментальных и прикладных исследований за 2015 год.

Опубликование результатов диссертации

Основные результаты диссертации изложены в 29 печатных работах, включающих 9 статей в рецензируемых научных журналах, 9 статей в сборниках конференций и тезисы 11 докладов. Общее количество страниц опубликованных материалов – 151 (8 авторских листов, из них 5,1 авторских листа – статьи в рецензируемых журналах).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, списка цитируемой литературы, включающего 285 источников, списка публикаций автора, содержащего 29 источников, и четырех приложений. Работа изложена на 132 страницах машинописного текста и содержит 16 рисунков, 13 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен аналитический обзор литературы по теме диссертационной работы. Приведены общие сведения о структуре и репликационном цикле ВИЧ-1, его этиологии и морфологических характеристиках. Описан генетический аппарат и иммунопатогенез ВИЧ-1. Рассмотрены этапы проникновения вируса в клетку-мишень и выполнен анализ причин его супрессорного действия на иммунную систему организма, приводящих к развитию у ВИЧ-позитивных людей синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа). Представлен объект исследования – «растворимые» аналоги β -GalCer. Рассмотрена роль петли V3 в репликационном цикле ВИЧ-1, которая образует главную мишень для нейтрализующих антител, отвечает за связывание вируса с корецепторами CCR5 или CXCR4 и определяет предпочтения вируса по отношению к макрофагам и Т-лимфоцитам. Приведена информация о структуре, функции, антигенности и иммуногенности третьего переменного домена белка gp120 ВИЧ-1. Проанализирован предмет исследования – механизм взаимодействия петли V3 ВИЧ-1 с гликофинголипидами. Показано, что большая часть молекулы β -GalCer погружена в липидный бислой плазматической мембраны клетки, а основным элементом структуры, выступающим наружу, является остаток галактозы, который образует потенциальный участок связывания с сегментом петли V3, ответственным за специфические взаимодействия белка gp120 с корецепторами CCR5 и/или CXCR4 клетки-мишени. При этом критическим для взаимодействия является образование нестандартных СН... π -водородных связей между пиранозным кольцом остатка галактозы β -GalCer и π -сопряженной системой консервативного остатка фенилаланина. Приведен обзор ингибиторов ВИЧ-1 различных классов, представляющих профилактические и терапевтические анти-ВИЧ препараты, и рассмотрены основные принципы антиретровирусной терапии. На основе анализа данных литературы сделан вывод о том, что одно из перспективных направлений предполагает поиск низкомолекулярных химических соединений – ингибиторов проникновения ВИЧ-1, способных нейтрализовать инфекцию на ранней стадии ее развития. Описаны современные подходы к созданию потенциальных лекарственных препаратов с помощью методов молекулярного моделирования. Приведены общая схема конструирования биологически активных соединений и основные методы, используемые для компьютерного конструирования лекарств. Отмечено, что с развитием вычислительной техники, программного обеспечения и методов компьютерного конструирования лекарств появилась возможность значительно уменьшить границы поиска структур-кандидатов биологически активных соединений среди миллионов разнообразных химических веществ. Это

обстоятельство существенно снижает объем работ и финансовые затраты, что в конечном итоге позволяет значительно облегчить и оптимизировать процесс разработки новых лекарственных препаратов.

В результате анализа данных литературы показано, что гликофинголипиды представляют перспективную группу мембранных липидов для разработки на их основе новых эффективных лекарственных препаратов против ВИЧ-1, способных блокировать проникновение вируса в клетку-мишень путем специфического связывания с петлей V3 белка gp120 оболочки вируса.

В главе 2 приведены результаты моделирования пространственной структуры петли V3 белка gp120 для четырех различающихся по генетическим свойствам вариантов ВИЧ-1 (рисунок 1), выделенных от ВИЧ-позитивных людей в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, и проведен их сравнительный анализ, направленный на выявление закономерностей в пространственной организации этого функционально важного участка оболочки вируса. Для решения этой задачи были проведены следующие исследования: 1. Построены статические и динамические модели трехмерной структуры петли V3 для исследуемых модификаций ВИЧ-1 [1, 4, 5, 12, 14, 16, 18]. 2. Во всех случаях идентифицированы элементы вторичной структуры и нерегулярные участки петли V3 [2, 10, 23, 25]. 3. Проведено сопоставление расчетных структур в геометрических пространствах двугранных углов и декартовых координат атомов и установлены консервативные сегменты V3-домена ВИЧ-1 [2, 10, 23, 25].

Вариант ВИЧ-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
N249-env-10	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	I	N	M	G	P	G	K	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	N	C
Moc-Det-Mn-10	C	I	R	P	N	N	N	T	R	T	S	I	R	I	G	P	G	Q	T	F	Y	A	L	G	G	V	I	G	D	I	R	R	A	N	C
N304-env	C	I	R	P	N	N	N	T	R	T	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	G	V	I	G	E	P	R	K	A	N	C
Scab-env-10	C	T	R	P	Y	N	N	T	R	K	G	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	N	C

Выделены консервативные остатки петли V3 [1, 2, 5 – 7]

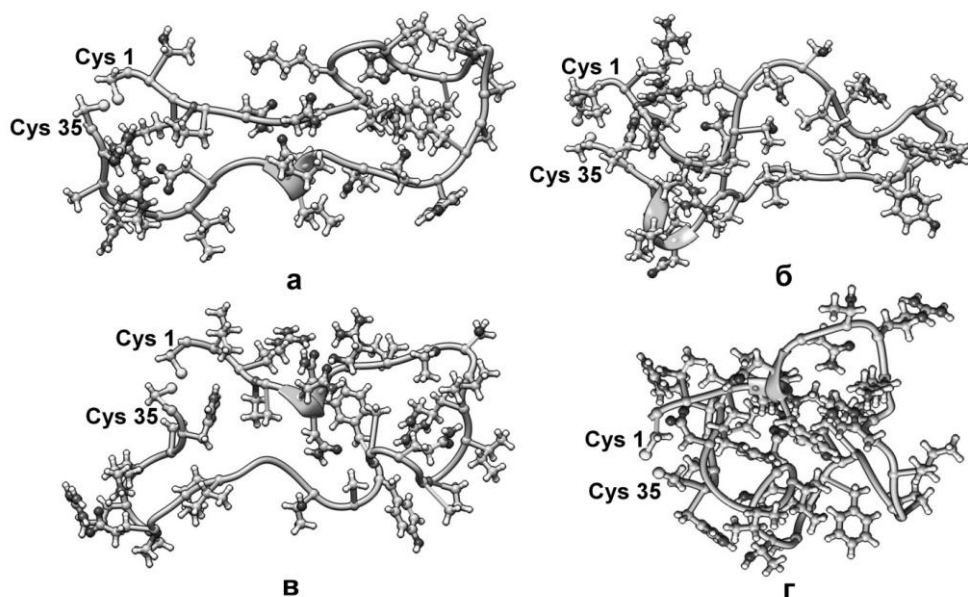
Рисунок 1. – Аминокислотные последовательности петли V3 для вариантов N249-env-10 (подтип B), Moc-Det-Mn-10 (уникальная рекомбинантная форма), N304-env (подтип A) и Scab-env-10 (рекомбинантная форма CRF03_AB) ВИЧ-1

Моделирование пространственных структур петли V3 белка gp120 для рассматриваемых модификаций ВИЧ-1 (рисунок 1) проводили методом гомологичного моделирования с помощью компьютерной программы MODELLER (<https://salilab.org/modeller>). Затем лучшие по значению оценочной функции структуры уточняли методом имитации теплового отжига (набор параметров ff03 силового поля Amber) с использованием пакета Amber 10 (<http://ambermd.org>). Для оценки качества построенных моделей привлекали

программный комплекс PROCHECK (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>). Молекулярно-динамические (МД) расчеты проводили в пакете Amber 10 (<http://ambermd.org>; силовое поле Amber ff03). В качестве начального приближения привлекали статические трехмерные структуры петли V3, построенные для модификаций N304-env, N249-env-10, Scab-env-10 и Moc-Det-Mn-10 ВИЧ-1 методами гомологичного моделирования и имитации теплового отжига.

На рисунке 2 приведены наиболее вероятные трехмерные структуры петли V3 для вариантов N304-env, N249-env-10, Scab-env-10 и Moc-Det-Mn-10 ВИЧ-1, построенные методами молекулярного моделирования на основе экспериментальных данных о ее аминокислотных последовательностях в этих модификациях вируса. Анализ расчетных структур свидетельствует о том, что они расположены в низкоэнергетических минимумах потенциальной поверхности петли V3 и удовлетворяют пространственным ограничениям на геометрию дисульфидного мостика Cys-1 – Cys-35, отвечая при этом общим критериям, традиционно используемым для оценки качества локальной структуры белковых молекул.

**Рисунок 2. –
Трехмерные
структуры
петли V3 для
вариантов N249-
env-10 (а),
Moc-Det-Mn-10
(б), N304-env (в)
и Scab-env-10 (г)
ВИЧ-1 [1, 2, 4 –
6]**



Сравнительный анализ структур в геометрических пространствах декартовых координат атомов и двугранных углов указывает на значительные расхождения между ними: величины среднеквадратичных отклонений по координатам атомов ($\langle cRMSD \rangle$) варьируют в интервале 5,1...8,7 Å, а соответствующие значения для двугранных углов ($\langle aRMSD \rangle$) изменяются в диапазоне 82...98° (таблица 1). Эти данные свидетельствуют о том, что в исследуемых вариантах ВИЧ-1 трехмерная структура петли V3 крайне чувствительна к мутациям нуклеотидной последовательности варибельного V3-

района гена *env*, инициирующим существенную структурную реорганизацию анализируемого участка белка gp120 оболочки вируса. Однако сопоставление трехмерных структур фрагментов различной длины петли V3 в сравниваемых моделях (рисунок 1) позволило идентифицировать три участка с близкой пространственной укладкой полипептидной цепи (таблица 2). Эти участки, расположенные в центральной области 15 – 20 петли V3 и на ее N- и C-концевых сегментах 3 – 7 и 28 – 32, формируют β -изгибы полипептидной цепи и содержат остатки белка gp120, критические для связывания ВИЧ-1 с корцепторами CCR5 и/или CXCR4.

Таблица 1. – Сравнительный анализ трехмерных структур петли V3 для вариантов N304-env, N249-env-10, Scab-env-10 и Moc-Det-Mn-10 ВИЧ-1

Вариант ВИЧ-1	Moc-Det-Mn-10	N249-env-10	N304-env	Scab-env-10
Moc-Det-Mn-10	—	82	83	93
N249-env-10	5,1	—	98	91
N304-env	7,2	6,2	—	91
Scab-env-10	8,2	8,7	7,5	—

Примечание – снизу от диагонали приведены величины cRMSD (Å), а сверху – соответствующие значения aRMSD (градусы)

Таблица 2. – Сравнительный анализ трехмерных структур фрагментов 3 – 7, 15 – 20 и 28 – 32 петли V3 для вариантов N304-env, N249-env-10, Scab-env-10 и Moc-Det-Mn-10 ВИЧ-1

Фрагмент петли V3	<cRMSD>	cRMSD _{STD}	<aRMSD>	aRMSD _{STD}
3 – 7	1,8	0,40	89	10
15 – 20	2,3	0,63	96	13
28 – 32	1,9	0,70	93	10

Примечание – <cRMSD> и <aRMSD> – соответственно величины cRMSD (Å) и aRMSD (градусы), усредненные по всем возможным парам сравниваемых структур; cRMSD_{STD} и aRMSD_{STD} – соответствующие этим величинам стандартные отклонения

Данные МД расчетов согласуются с заключением, вытекающим из сравнительного анализа статических моделей петли V3: функционально важные участки 3 – 7, 15 – 20, 28 – 32 V3-домена ВИЧ-1 образуют консервативные элементы структуры несмотря на высокую конформационную подвижность их индивидуальных аминокислотных остатков.

Структурные данные, полученные для исследованных вариантов ВИЧ-1, подтверждают результаты конформационного анализа «консенсусных» последовательностей петли V3 ВИЧ-1 подтипов А, В, С и D (А.М. Andrianov, I.V.

Anishchenko, A.V. Tuzikov // J. Chem. Inf. Model. 2011. Vol. 51. P. 2760–2767) и согласуются с выводами, сделанными при изучении ее структур методами спектроскопии ЯМР и рентгеновской кристаллографии. Объединив результаты исследований, выполненных разными методами для различных модификаций вируса, можно утверждать, что, несмотря на генетическое разнообразие ВИЧ-1, петля V3 образует три консервативных элемента структуры, включающих функционально важные остатки белка gp120, что объясняет ее важную роль в процессе проникновения ВИЧ-1 в клетку-мишень. Очевидно, что эти консервативные элементы структуры петли V3 ВИЧ-1 представляют собой слабые звенья в системе защиты вируса и, поэтому, могут рассматриваться как универсальные мишени для создания эффективных лекарственных препаратов с широким диапазоном нейтрализующего действия.

Таким образом, анализ конформационных характеристик построенных моделей (рисунок 1) и их сопоставление с экспериментальными структурами петли V3 ВИЧ-1 свидетельствуют о том, что они могут быть использованы в качестве молекулярных мишеней для компьютерного конструирования химических соединений – потенциальных ингибиторов ВИЧ-1, способных блокировать консервативные участки белка gp120, критические для связывания вируса с клеткой хозяина.

В главе 3 представлены результаты исследования, в котором осуществлен компьютерный дизайн двенадцати «растворимых» аналогов β -GalCer и проведена оценка их потенциальной нейтрализующей активности с последующим отбором структур-кандидатов, наиболее перспективных для разработки на их основе эффективных ингибиторов проникновения ВИЧ-1, блокирующих петлю V3 белка gp120 ВИЧ-1.

Исследование включало четыре последовательных этапа:

1. Конструирование с помощью методов молекулярного моделирования производных β -GalCer, содержащих различные заместители остатка жирной кислоты по аминогруппе агликона, и квантово-химические расчеты их трехмерных структур [3, 6, 7, 11, 15, 17, 19].

2. Молекулярный докинг структурных комплексов сконструированных гликолипидов с петлей V3 ВИЧ-1 и анализ межмолекулярных взаимодействий, ответственных за их энергетическую стабилизацию [3, 6, 7, 18, 28, 29].

3. Молекулярную динамику комплексов и расчет свободной энергии их образования (программный пакет Amber 11; <http://ambermd.org>; силовое поле Amber ff03) [3, 6, 7, 13, 20 – 22, 24].

4. Сравнительный анализ эффективности связывания гликолипидов с петлей V3 ВИЧ-1 с последующей идентификацией соединений-лидеров [3, 6, 7, 13].

Оптимизацию трехмерных структур гликолипидов проводили методами квантовой химии в пакете Gaussian (<http://www.gaussian.com/>). Для расчета

электронной конфигурации применяли метод самосогласованного поля Хартри-Фока с валентно-расщепленным базисом 6-31G*. Молекулярный докинг выполняли с помощью программы AutoDock Vina (<http://vina.scripps.edu>) с учетом конформационной подвижности гликолипида, перебирая все его возможные ориентации относительно молекулы-рецептора. МД расчеты осуществляли в программном пакете AMBER 11 в изобарно-изотермических условиях в силовом поле Amber с набором параметров ff10 в течение 30 нс. Для задания свойств растворителя использовали трехточечную модель воды TIP3P (<http://ambermd.org>).

В таблице 3 приведены кислоты, использованные в качестве заместителей остатка жирной кислоты по аминокгруппе агликона в полученных аналогах β -GalCer. Эти гликолипиды были разделены на две группы в зависимости от наличия и отсутствия в их составе ароматических колец. Выбор заместителей остатка жирной кислоты β -GalCer проводили с целью усиления специфичности и эффективности связывания за счет возможного π -стэкинга ароматических фрагментов гликолипидов с консервативными остатками Pro-4, Pro-16, Phe-20, Tyr-21 и His-34 петли V3 ВИЧ-1 (соединения группы I) и/или формирования дополнительных межмолекулярных водородных связей с участием их полярных групп (соединения группы II).

Анализ построенных методами молекулярного докинга структурных комплексов петли V3 с аналогами β -GalCer позволяет установить ряд закономерностей. Независимо от модификации ВИЧ-1, практически во всех рассматриваемых случаях остаток сахара гликолипидов образует нестандартные $\text{XH}\cdots\pi$ (X обозначает атомы C или O) водородные связи с перекрывающимися р-орбиталями боковых цепей остатков Phe-20/Tyr-21 или His-34, представляющих консервативные аминокислоты петли V3. Исключение составляет штамм Scab-env-10 ВИЧ-1, где в пятой позиции петли V3 имеет место редкая аминокислотная замена остатка аспарагина на тирозин (рисунок 1). Наряду с $\text{XH}\cdots\pi$ водородными связями для гликолипидов группы I, содержащих в боковой цепи ароматические фрагменты, в большинстве структурных комплексов наблюдается π -стэкинг с консервативными остатками Pro-4, Pro-16, Phe-20, Tyr-21 и His-34 петли V3. В случае штамма Scab-env-10 π -стэкинг наблюдается с остатками Tyr-5 и His-13. Кроме $\text{XH}\cdots\pi$ взаимодействий и π -стэкинга, существенный вклад в формирование комплексов гликолипидов с петлей V3 ВИЧ-1 вносят стандартные водородные связи с участием ее функционально важных аминокислотных остатков.

Таким образом, результаты молекулярного докинга показывают, что сконструированные гликолипиды способны к специфическим и эффективным взаимодействиям с петлей V3, принадлежащей различным модификациям ВИЧ-1.

Таблица 3. – Кислоты – заместители остатка жирной кислоты по аминогруппе агликона в сконструированных аналогах β -GalCer

Кислота (группа I)	Структурная формула	Кислота (группа II)	Структурная формула
1 2,4-динитро- фениламино- пропионовая кислота		1 5-амино- левулино- вая кислота	
2 Гистидин		2 3-окси- бутановая кислота	
3 Триптофан		3 Янтарная кислота	
4 Тирозин		4 Яблочная кислота	
5 Фенилуксусная кислота		5 Глицери- новая кислота	
6 Фенилаланин		6 Глутами- новая кислота	

Этот вывод подтверждают данные молекулярно-динамических расчетов структурных комплексов, согласно которым на их МД траекториях преобладают структуры, в которых сохраняются межмолекулярные водородные связи, наблюдаемые в статических моделях, а углеводная составляющая гликолипидов сближена в пространстве с боковыми цепями остатков петли V3 с π -

сопряженными системами на расстояния, благоприятные для реализации ХН...л взаимодействий. Структурные комплексы, построенные методами молекулярного докинга, энергетически стабильны, о чем свидетельствуют низкие величины свободной энергии их образования и соответствующие стандартные отклонения. Полученные на основе МД расчетов величины энергии связывания показывают, что в подавляющем большинстве случаев этот энергетический параметр принимает значения, сопоставимые (с учетом погрешности расчетов) с величиной $-10,9$ ккал/моль, вычисленной исходя из константы диссоциации комплекса β -GalCer с белком gp120 (J.M. Harouse [et al] // Science. – 1991. – Vol. 253, № 5017. – P. 320 – 323).

Анализ расчетных данных позволяет выделить в списке сконструированных производных β -GalCer соединения с остатками янтарной и глутаминовой кислот (таблица 3), формирующие более стабильные относительно контрольного гликолипида (β -галактозилсфингозина) комплексы со всеми использованными в расчетах V3-мишенями. Среди гликолипидов с ароматическими фрагментами следует отметить производные β -GalCer, содержащие остатки 2,4-динитрофениламинопропионовой кислоты и тирозина (таблица 3), которые, за исключением штамма Scab-env-10 ВИЧ-1, также демонстрируют в компьютерных экспериментах бóльшую эффективность связывания с петлей V3 по сравнению с разработанным ранее анти-ВИЧ агентом (И.В.Анищенко, А.В. Тузиков, А.М. Андрианов // Мат. биол. биоинф. – 2011. – Т. 6. – С. 161–172).

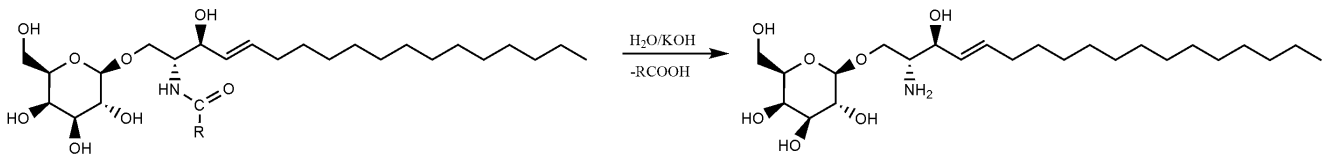
Таким образом, полученные данные показывают, что сконструированные в настоящей работе аналоги β -GalCer, которые, согласно данным компьютерного моделирования, способны к блокаде инвариантных элементов структуры петли V3, могут быть использованы как базовые соединения для создания новых эффективных лекарственных препаратов против широкого набора вариантов ВИЧ-1.

В главе 4 приведены результаты синтеза двух аналогов β -GalCer – β -галактозилсфингозина [3, 8, 18] и N-(L- α -тирозинил)- β -галактозилсфингозина [9, 28], которые, согласно расчетным данным, проявляют высокое сродство к консервативным элементам структуры петли V3 ВИЧ-1. Представлены результаты тестирования β -галактозилсфингозина на анти-ВИЧ активность, проведенного в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Описана оригинальная методика синтеза «растворимых» аналогов β -GalCer, апробированная на примере N-(L- α -тирозинил)- β -галактозилсфингозина.

В результате проведенных исследований получен деацилированный аналог β -GalCer – β -галактозилсфингозин (см. схему 1), ВИЧ-ингибирующие свойства которого были предсказаны ранее (И.В.Анищенко, А.В. Тузиков, А.М. Андрианов // Мат. биол. биоинф. – 2011. – Т. 6. – С. 161–172) и подтверждены в результате тестирования на противовирусную активность [3, 8]. Химиотерапевтический

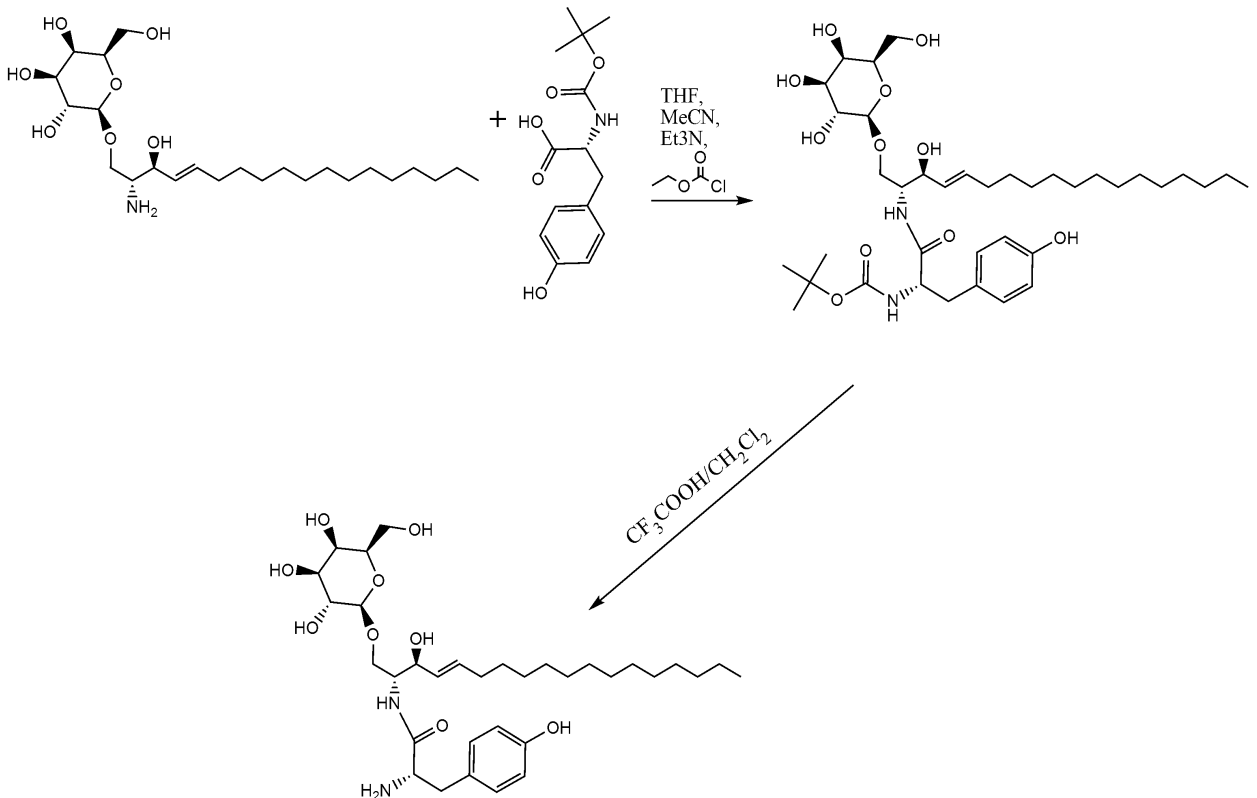
индекс, т.е. соотношение максимально переносимой концентрации и минимально активной концентрации соединения, составил 40,0 [8], что свидетельствует о высокой степени его анти-ВИЧ активности. Предложена оригинальная методика синтеза модифицированных форм этого гликолипида путем его ацилирования остатками кислот по аминогруппе сфингозинового основания. Методика апробирована на примере N-(L-α-тирозинил)-β-галактозилсфингозина [9] (см. схему 2) – одного из сконструированных методами молекулярного моделирования гликолипидов, который, согласно расчетным данным, эффективно и специфически взаимодействует с участками петли V3 ВИЧ-1, критическими для проникновения вируса в клетку-мишень.

Схема 1 [8]



где RCO – преимущественно остатки насыщенных, ненасыщенных и гидроксикислот с 24 атомами углерода.

Схема 2 [9]



Разработанная методика будет использована в дальнейших исследованиях для синтеза всех 12 полученных аналогов β -GalCer с целью их последующего тестирования на анти-ВИЧ активность и отбора соединений-лидеров – базовых структур для разработки новых эффективных лекарственных препаратов против ВИЧ-1, нейтрализующих инфекцию на ранней стадии ее развития.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Методами молекулярного моделирования построены пространственные структуры петли V3 белка gp120 ВИЧ-1 для четырех различающихся по генетическим свойствам вариантов вируса, циркулирующих в странах Восточной Европы, включая Республику Беларусь, и выполнен анализ их динамических характеристик. Идентифицированы элементы вторичной структуры петли V3 ВИЧ-1, общие для исследованных модификаций вируса. Установлено, что эти консервативные участки, локализованные в центральной области V3-домена (сегмент 15 – 20) и у его основания (сегменты 3 – 7 и 28 – 32), формируют β -изгибы полипептидной цепи, которые включают аминокислотные остатки белка gp120, критические для связывания вируса с корецепторами клетки-мишени [1, 2, 4, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 23, 25, 27].

2. С помощью методов молекулярного моделирования сконструированы 12 «растворимых» аналогов гликофинголипида β -GalCer – потенциальных лигандов петли V3 ВИЧ-1, содержащих элементы структуры, необходимые для обеспечения специфических взаимодействий с консервативными участками этого функционально важного домена белка gp120 оболочки вируса. Методами квантовой химии рассчитаны трехмерные структуры сконструированных производных β -GalCer [6, 7, 11, 15, 17, 19].

3. Методами молекулярного моделирования построены структурные комплексы гликолипидов с петлей V3 белка gp120 ВИЧ-1, проведена оценка их энергетической стабильности и осуществлен отбор структур, наиболее перспективных для синтеза и тестирования на анти-ВИЧ-активность. Обнаружено, что петля V3 использует два потенциальных сайта для связывания с гликолипидами, которые формируют консервативные элементы структуры, включающие аминокислотные остатки белка gp120, ответственные за связывание вируса с корецепторами CCR5 и/или CXCR4 клетки-мишени. Показано, что специфичность связывания гликолипидов с белком gp120 обусловлена нестандартными $\text{XH}\cdots\pi$ водородными связями пиранозного кольца остатка галактозы с π -сопряженными системами его консервативных остатков Phe-20/Tyr-21 или His-34.

Установлено, что сконструированные гликолипиды способны к специфическим и эффективным взаимодействиям с петлей V3 белка gp120 ВИЧ-

1, принадлежащей различным модификациям ВИЧ-1. Этот вывод подтвержден данными молекулярно-динамических расчетов структурных комплексов, согласно которым на их МД траекториях преобладают структуры, в которых сохраняются межмолекулярные водородные связи, наблюдаемые в статических моделях, а углеводная составляющая гликолипидов сближена в пространстве с π -сопряженными системами остатков Phe-20/Tyr-21 или His-34 петли V3 на расстоянии, благоприятные для реализации ХН \cdots л взаимодействий. Структурные комплексы, построенные методами молекулярного докинга, энергетически стабильны, о чем свидетельствуют низкие величины свободной энергии их образования. На основе анализа значений свободной энергии образования комплексов, идентифицированы гликолипиды, формирующие более стабильные относительно контрольного гликолипида (β -галактозилсфингозина) комплексы со всеми использованными в расчетах V3-мишенями [3, 6, 7, 11, 13, 15, 17 – 22, 24].

4. Получен β -галактозилсфингозин – деацелированный аналог β -GalCer, ВИЧ-ингибирующие свойства которого подтверждены в результате тестирования на противовирусную активность. Предложена оригинальная методика синтеза «растворимых» аналогов β -GalCer, апробированная на примере N-(L- α -тирозинил)- β -галактозилсфингозина – одного из сконструированных в настоящей работе гликолипидов [3, 8, 9, 13, 19, 26, 28, 29].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Практическое использование полученных в диссертационном исследовании результатов предусматривает реализацию следующих этапов: 1) синтез всех 12 сконструированных методами молекулярного моделирования аналогов β -GalCer с помощью разработанной методики и их тестирование на анти-ВИЧ активность против широкого набора модификаций вируса; 2) идентификацию соединений-лидеров согласно результатам тестирования; 3) оптимизацию структур базовых соединений и предсказание их противовирусной активности методами 3D-QSAR, позволяющими прогнозировать активность новых аналогов из полученного набора гомологичных структур; 4) синтез наиболее перспективных соединений и повторные медицинские испытания на анти-ВИЧ активность, токсичность, канцерогенность и т.д.; по результатам этих тестов возможен дополнительный цикл компьютерного моделирования для оптимизации структур с целью улучшения их фармакокинетических свойств.

В результате этих исследований могут быть получены новые модифицированные формы гликофинголипида β -GalCer, представляющие базовые структуры для разработки эффективных лекарственных препаратов против ВИЧ-1, терапевтическое действие которых основано на блокаде третьего переменного домена белка gp120 оболочки вируса.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Структурный анализ петли V3 белка gp120 ВИЧ-1 для вариантов вируса, циркулирующих в Республике Беларусь / Ю. В. Корноушенко, И. В. Анищенко, В. Ф. Еремин, А. М. Андрианов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2011. – Т. 55, № 6. – С. 79–86.
2. Определение инвариантных элементов структуры третьего переменного домена белка gp120 ВИЧ-1 методами молекулярного моделирования / Ю. В. Корноушенко, И. В. Анищенко, А. В. Тузилов, А. М. Андрианов // Мат. биология и биоинформатика. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 140–153.
3. Computer-aided design of novel HIV-1 entry inhibitors targeting the envelope gp120 V3 loop / A. M. Andrianov, I. V. Anishchenko, M. A. Kisel, Y. V. Kornoushenko, V. A. Nikolayevich, V. F. Eremin, I. I. Kucherov, A. V. Tuzikov // Biopolymers a. Cell. – 2012. – Vol. 28, № 6. – P. 468–476.
4. Оценка конформационной подвижности третьего переменного домена белка gp120 ВИЧ-1 методами молекулярной динамики / И. В. Анищенко, Ю. В. Корноушенко, А. В. Тузилов, А. М. Андрианов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2012. – Т. 56, № 5. – С. 48–53.
5. Structural analysis of the envelope gp120 V3 loop for some HIV-1 variants circulating in the countries of Eastern Europe / A. M. Andrianov, Y. V. Kornoushenko, I. V. Anishchenko, V. F. Eremin, A. V. Tuzikov // J. of Biomolecular Structure a. Dynamics. – 2013. – Vol. 31, № 7. – P. 665–683.
6. Компьютерное конструирование новых ингибиторов проникновения ВИЧ-1 на основе гликофинголипидов / А. М. Андрианов, Ю. В. Корноушенко, И. А. Кашин, А. В. Тузилов // Мат. биология и биоинформатика. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 88–105.
7. In *silico* design of novel broad anti-HIV-1 agents based on glycosphingolipid β -galactosylceramide, a high-affinity receptor for the envelope gp120 V3 loop / A. M. Andrianov, Y. V. Kornoushenko, I. A. Kashyn, M. A. Kisel, A. V. Tuzikov // J. of Biomolecular Structure a. Dynamics. – 2015. – Vol. 33, № 5. – P. 1051–1066.
8. Получение и анти-ВИЧ активность β -галактозилфингозина / Ю. В. Корноушенко, В. А. Николаевич, М. А. Кисель, А. М. Андрианов, С. В. Адамчик, И. И. Кучеров, В. Ф. Еремин // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2015. – № 1. – С. 85–88.
9. Корноушенко, Ю. В. Синтез N-(L- α -тирозинил)- β -галактозилфингозина – нового потенциального ингибитора ВИЧ-1 с широкой вирусной нейтрализацией / Ю. В. Корноушенко // Молодежь в науке – 2015 : прил. к журн. «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі» : материалы Междунар. науч.

конф. молодых ученых, Минск, 1–4 дек. 2015 г. : в 5 ч. / НАН Беларуси, Совет молодых ученых. – Минск, 2016. – Ч. 1 : Серия химических наук. – С. 33–36.

Статьи в сборниках трудов международных конференций

10. Идентификация консервативных структурных мотивов петли V3 белка gp120 ВИЧ-1 методами компьютерного моделирования / Ю. В. Корноушенко, И. В. Анищенко, А. В. Тузиков, А. М. Андрианов // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии : сб. тр. Междунар. интернет-конф., Казань, 10–12 нояб. 2011 г. / Каз. (Приволж.) Федер. ун-т ; редкол.: Е. Д. Изотова (отв. ред.) [и др.]. – Казань, 2011. – С. 251–254.

11. Компьютерный дизайн потенциальных ингибиторов адсорбции ВИЧ-1 на основе гликолипидов / И. В. Анищенко, Ю. В. Корноушенко, А. В. Тузиков, А. М. Андрианов // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии : сб. тр. Междунар. интернет-конф., Казань, 10–12 нояб. 2011 г. / Каз. (Приволж.) Федер. ун-т ; редкол.: Е. Д. Изотова (отв. ред.) [и др.]. – Казань, 2011. – С. 255–258.

12. Компьютерное моделирование пространственной структуры третьего переменного домена белка gp120 ВИЧ-1 для вариантов вируса, циркулирующих в странах Восточной Европы / Ю. В. Корноушенко, И. В. Анищенко, А. В. Тузиков, А. М. Андрианов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф., Минск, 19–21 июня 2012 г. : сб. ст. : в 2 ч. / Десятый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков [и др.] ; редкол.: И. Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 1. – С. 311–314.

13. Молекулярное моделирование и химический синтез ингибиторов репликации ВИЧ-1 на основе гликофинголипидов / А. М. Андрианов, И. В. Анищенко, М. А. Кисель, Ю. В. Корноушенко, В. А. Николаевич, В. Ф. Еремин, И. И. Кучеров, А. В. Тузиков // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф., Минск, 19–21 июня 2012 г. : сб. ст. : в 2 ч. / Десятый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков [и др.] ; редкол.: И. Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 1. – С. 235–237.

14. Молекулярно-динамические расчеты структуры третьего переменного домена белка gp120 ВИЧ-1 с использованием суперкомпьютера скиф / И. В. Анищенко, Ю. В. Корноушенко, А. В. Тузиков, А. М. Андрианов // Суперкомпьютерные системы и их применение : SSA'2012 : четвертая Междунар. науч. конф., Минск, 23–25 окт. 2012 г. : доклады / Объед. ин-т проблем информатики НАН Беларуси ; науч. ред. В. В. Анищенко. – Минск, 2012. – С. 203–207.

15. Компьютерный дизайн новых анти-ВИЧ агентов на основе гликофинголипидов и оценка их эффективности методами молекулярного моделирования / А. М. Андрианов, Ю. В. Корноушенко, И. А. Кашин, М. А.

Кисель, А. В. Тузиков // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф., Минск, 17–20 июня 2014 г. : сб. ст. : в 2 ч. / Одиннадцатый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков [и др.] ; редкол.: И. Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2014. – Ч. 1. – С. 236–238.

16. Молекулярная динамика третьего переменного домена белка gp120 ВИЧ-1 / Ю. В. Корноушенко, И. В. Анищенко, А. В. Тузиков, А. М. Андрианов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф., Минск, 17–20 июня 2014 г. : сб. ст. : в 2 ч. / Одиннадцатый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков [и др.] ; редкол.: И. Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2014. – Ч. 1. – С. 280–282.

17. Конструирование потенциальных ингибиторов ВИЧ-1 на основе гликофинголипидов методами молекулярного моделирования и химического синтеза / Ю. В. Корноушенко, М. А. Кисель, А. В. Тузиков, А. М. Андрианов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. науч. конф., Минск, 28–30 июня 2016 г. : сб. ст. : в 2 ч. / Двенадцатый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков [и др.] ; редкол.: И. Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2016. – Ч. 1. – С. 104–107.

18. β -Галактозилцерамид как базовая структура для разработки новых ингибиторов проникновения ВИЧ-1 / Ю. В. Корноушенко, М. А. Кисель, А. В. Тузиков, А. М. Андрианов // Современные проблемы биохимии : сб. науч. ст. I Белорус. биохим. конгр., Гродно, 5–6 июля 2016 г. : в 2 ч. / Ин-т биохимии биологически актив. соединений НАН Беларуси ; редкол.: Л. И. Надольник (гл. ред.) [и др.]. – Гродно, 2016. – Ч. 2. – С. 184–190.

Тезисы докладов

19. Anishchenko, I. V. Computer-assisted anti-AIDS drug development: cyclophilin B against the HIV-1 subtype A V3 loop / I. V. Anishchenko, Y. V. Kornoushenko, A. M. Andrianov // Computational molecular biology «MCCMB'2011» : proc. of the Intern. Moscow conf., Moscow, July 21–24 2011 / Inst. for Inform. Transmission Problems RAS ; ed. board: V. Skulachev (co-chair) [et al.]. – Moscow, 2011. – P. 43–44.

20. Исследование конформационной подвижности третьего переменного домена белка gp120 ВИЧ-1 методами молекулярной динамики / И. В. Анищенко, Ю. В. Корноушенко, А. В. Тузиков, А. М. Андрианов // Химия, структура и функция биомолекул : сб. материалов IV междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения акад. А. А. Ахрема, Минск, 17–19 окт. 2012 г. / НАН Беларуси [и др.]. – Минск, 2012. – С. 111–112.

21. Конструирование новых анти-ВИЧ агентов методами молекулярного моделирования и химического синтеза: гликолипиды и петля V3 белка gp120 оболочки вируса / А. М. Андрианов, И. В. Анищенко, М. А. Кисель, Ю. В.

Корноушенко, В. А. Николаевич, В. Ф. Еремин, И. И. Кучеров, А. В. Тузиков // Химия, структура и функция биомолекул : сб. материалов IV междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения акад. А. А. Ахрема, Минск, 17–19 окт. 2012 г. / НАН Беларуси [и др.]. – Минск, 2012. – С. 13–14.

22. Конструирование потенциальных лекарственных препаратов для терапии СПИДа на основе гликолипидов методами молекулярного моделирования и химического синтеза / А. М. Андрианов, И. В. Анищенко, М. А. Кисель, Ю. В. Корноушенко, В. А. Николаевич, В. Ф. Еремин, И. И. Кучеров, А. В. Тузиков // Россия – Беларусь – Сколково: единое инновационное пространство : тез. Междунар. науч. конф., Минск, 19 сент. 2012 г. / НАН Беларуси [и др.] ; редкол.: С. Я. Килин (пред.) [и др.]. – Минск, 2012. – С. 9–10.

23. Computer-aided design of novel HIV-1 entry inhibitors based on glycosphingolipids / А. М. Andrianov, Yu. V. Kornoushenko, I. A. Kashyn, A. V. Tuzikov // Conversation in biomolecular stereodynamics : proc. of the 18th Intern. conf., Albany, 2013 / publisher: «Taylor and Francis». – J. of Biomolecular Structure a. Dynamics. – Vol. 31, supplement 1. – P. 126.

24. Computer modeling of novel anti-HIV-1 agents presenting water-soluble analogs of glycosphingolipid β -galactosylceramide [Electronic resource] / А. М. Andrianov, Yu. V. Kornoushenko, I. A. Kashyn, A. V. Tuzikov // Computational molecular biology «MCCMB'2013» : proc. of the Intern. Moscow conf., Moscow, July 25–28 2013 / Inst. for Inform. Transmission Problems RAS ; ed. board: V. Skulachev (co-chair) [et al.]. – Moscow, 2013. – Mode of access: <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2013/abstracts/abstracts/137.pdf>. – Date of access: 22.12.2013.

25. Structural analysis of the envelope gp120 V3 loop for some HIV-1 variants circulating in the countries of Eastern Europe [Electronic resource] / А. М. Andrianov, Yu. V. Kornoushenko, I. V. Anishchenko, V. F. Eremin, A. V. Tuzikov // Computational molecular biology «MCCMB'2013» : proc. of the Intern. Moscow conf., Moscow, July 25–28 2013 / Inst. for Inform. Transmission Problems RAS ; ed. board: V. Skulachev (co-chair) [et al.]. – Moscow, 2013. – Mode of access: <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2013/abstracts/abstracts/139.pdf>. – Date of access: 22.12.2013.

26. *In silico* дизайн новых ингибиторов проникновения ВИЧ-1 на основе β -галактозилцерамида / А. М. Андрианов, Ю. В. Корноушенко, И. А. Кашин, А. В. Тузиков // Химия, структура и функция биомолекул : материалы V Междунар. науч. конф., посвящ. 40-летию Ин-та биоорг. химии и 85-летию Нац. акад. наук Беларуси, Минск, 4–6 июня 2014 г. / НАН Беларуси [и др.] ; редкол.: Ф. А. Лавич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 26–27.

27. Обнаружение консервативных элементов структуры петли V3 белка gp120 ВИЧ-1 методами молекулярного моделирования / Ю. В. Корноушенко, И.

В. Анищенко, А. В. Тузиков, А. М. Андрианов // Химия, структура и функция биомолекул : материалы V Междунар. науч. конф., посвящ. 40-летию Ин-та биоорган. химии и 85-летию Нац. акад. наук Беларуси, Минск, 4–6 июня 2014 г. / НАН Беларуси [и др.] ; редкол.: Ф. А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 110–111.

28. Корноушенко, Ю. В. Синтез N-(L- α -тирозинил)- β -галактозилсфингозина – нового потенциального ингибитора ВИЧ-1 с широкой вирусной нейтрализацией / Ю. В. Корноушенко // Молодежь в науке – 2015 : прил. к журн. «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі» : материалы Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 1–4 дек. 2015 г. : в 5 ч. / НАН Беларуси, Совет молодых ученых. – Минск, 2016. – Ч. 1 : Серия химических наук. – С. 319.

29. Computational design of entry inhibitor scaffolds targeting the third variable loop of HIV-1 gp120 / Y. V. Kornoushenko, I. A. Kashyn, A. V. Tuzikov, A. M. Andrianov // ISBRA 2016 : proc. of the 12th Intern. Symp., Minsk, June 5–8 2016 / Belarus. State Univ. ; ed. board: A. Bourgeois (co-chair) [et al.]. – Minsk, 2016. – Mode of access: <http://link.springer.com/openurl.asp?genre=issue&issn=0302-9743&volume=9683>. – Date of access: 1.07.2016.



РЕЗЮМЕ

Корноушенко Юрий Валерьевич

Конструирование потенциальных ингибиторов ВИЧ-1 на основе гликофинголипидов методами молекулярного моделирования и химического синтеза

Ключевые слова: ВИЧ-1, белок gp120, гликофинголипиды, молекулярное моделирование, химический синтез, ингибиторы ВИЧ-1.

Цель работы: Осуществить *in silico* дизайн и оценку потенциальной активности новых ингибиторов проникновения ВИЧ-1 на основе гликофинголипидов и синтезировать соединения, перспективные для разработки эффективных лекарственных препаратов с широкой вирусной нейтрализацией.

Методы исследования: Молекулярное моделирование, химический синтез, масс-спектрометрия, ЯМР-спектроскопия, ИК-спектроскопия, тонкослойная хроматография.

Результаты работы и их новизна: Впервые с помощью методов компьютерного моделирования сконструированы двенадцать «растворимых» аналогов β -GalCer – потенциальных ингибиторов проникновения ВИЧ-1, специфически и эффективно взаимодействующих с консервативными участками белка gp120 оболочки вируса, критическими для его связывания с корцепторами клетки-мишени. Получен деацилированный аналог β -GalCer, ВИЧ-ингибирующие свойства которого подтверждены в результате тестирования на противовирусную активность. Разработана методика синтеза «растворимых» аналогов β -GalCer, апробированная на примере N-(L- α -тирозинил)- β -галактозилсфингозина.

Рекомендации по использованию: Сконструированные аналоги β -GalCer могут быть использованы в качестве перспективных базовых структур для создания новых эффективных анти-ВИЧ препаратов, механизм действия которых основан на блокаде функционально важного участка оболочки вируса – петли V3 белка gp120.

Область применения: Биоорганическая химия, биофизика, биоинформатика, медицина.

РЭЗІЮМЭ

Карнаушанка Юрый Валер'евіч

Канструяванне патэнцыйных інгібітараў ВІЧ-1 на аснове глікасфінгаліпідаў метадамі малекулярнага мадэлявання і хімічнага сінтэзу

Ключавыя словы: ВІЧ-1, бялок gp120, глікасфінгаліпіды, малекулярнае мадэляванне, хімічны сінтэз, інгібітары ВІЧ-1.

Мэта даследавання: Ажыццявіць *in silico* дызайн і ацэнку патэнцыйнай актыўнасці новых інгібітараў пранікнення ВІЧ-1 на аснове глікасфінгаліпідаў і сінтэзаваць злучэнні, перспектыўныя для распрацоўкі эфектыўных лекавых прэпаратаў з шырокай віруснай нейтралізацыяй.

Метады даследавання: Малекулярнае мадэляванне, хімічны сінтэз, масс-спектраметрыя, ЯМР-спектраскапія, ІК-спектраскапія, тонкапластовая храматаграфія.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: Упершыню з дапамогай метадаў камп'ютарнага мадэлявання сканструяваны дванаццаць "растваральных" аналагаў β -GalCer – патэнцыйных інгібітараў пранікнення ВІЧ-1, здольных да спецыфічных і эфектыўных узаемадзеянняў з кансерватыўнымі ўчасткамі бялку gp120 абалонкі віруса, крытычнымі для яго звязвання з корэцэптарамі клеткі-мішэні. Атрыманы дэаціліраваны аналаг β -GalCer, ВІЧ-інгібіруючыя ўласцівасці якога пацверджаны ў выніку тэставання на супрацьвірусную актыўнасць. Распрацавана метадыка сінтэзу «растваральных» аналагаў β -GalCer, апрабаваная на прыкладзе N-(L- α -тыразініл)- β -галактазілсфінгазіна.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: Сканструяваныя аналагі β -GalCer могуць быць выкарыстаны ў якасці перспектыўных базавых структур для стварэння новых эфектыўных анты-ВІЧ прэпаратаў, механізм дзеяння якіх заснаваны на блакадзе функцыянальна важнага ўчастка абалонкі віруса – пятлі V3 бялка gp120.

Галіна ужывання: Біяарганічная хімія, біяфізіка, біяінфарматыка, медыцына.

SUMMARY

Kornoushenko Yury Valer'evich

Design of potential HIV-1 inhibitors based on glycosphingolipids by molecular modeling and chemical synthesis

Key words: HIV-1, gp120 protein, glycosphingolipids, molecular modeling, chemical synthesis, HIV-1 inhibitors.

Objective: To carry out *in silico* design and evaluation of potential activity of novel HIV-1 entry inhibitors based on glycosphingolipids and synthesize compounds promising for the development of effective and broad antiviral drugs.

Methods of the research: Molecular modeling, chemical synthesis, mass spectrometry, NMR spectroscopy, IR spectroscopy, thin-layer chromatography.

The results and their novelty: Design of twelve soluble β -GalCer analogs presenting potential HIV-1 entry inhibitors, which specifically and effectively interact with the conserved sites of the envelope gp120 protein critical for the virus binding to co-receptors of a target cell, was first carried out. Deacetylated β -GalCer analog was obtained and its HIV-1 inhibitory properties were validated by testing for antiviral activity. The method for synthesis of soluble β -GalCer analogs was developed and approved by obtaining N-(L- α -tyrosinyl)- β -galactosylsphingosine.

Recommendations for use: The designed β -GalCer analogs may be used as promising basic structures for the development of novel potent anti-HIV drugs with mechanism of action based on the blockade of the gp120 V3 loop, the functionally important site of the virus envelope.

Application guidelines: Bioorganic chemistry, biophysics, bioinformatics, medicine.