

Молекулярное моделирование механизма противовирусного действия новых конъюгатов 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептана и насыщенных N-гетероциклов, связанных 1,2,3-триазольным линкером, в отношении вируса Марбург

Баев Д.С., Соколова А.С., Яровая О.И., Толстикова Т.Г., Салахутдинов Н.Ф.

Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

* baev@nioch.nsc.ru

Ключевые слова: монотерпеноиды; филловирусы; ингибиторы; молекулярное моделирование

Мотивация и цель: в продолжение исследований производных монотерпеноидов, проявляющих противовирусное действие в отношении филловиров, было сделано предположение, что эти молекулы могут ингибировать вирусный гликопротеин вируса Марбург (MARV GP). По данным литературы[1], гомология по первичной последовательности между гликопротеином вируса Эбола (EBOV GP) и MARV GP составляет лишь 27%. Однако, известные ингибиторы EBOV GP, такие как торемифен, способны ингибировать MARV GP, хотя и в более высоких концентрациях[2]. Направленный мутагенез аминокислот сайта связывания EBOV GP, важных для взаимодействия с ингибиторами, приводит к появлению зависимости эффект/концентрация, характерной для ингибирования псевдовирусных частиц, содержащих MARV GP дикого типа. Таким образом, был сделан вывод о том, что на поверхности тримера вирусного гликопротеина филловиров существует дополнительный сайт связывания ингибиторов, который в случае MARV GP является основным. Такой сайт связывания может находиться в домене HR2 гликопротеинового тримера[3]. HR2 представляет собой преимущественно α -спиральный домен, который соединяет HR1 на N-конце домена GP2 с вирусной мембраной на C-конце. В процессе слияния домены HR1 и HR2 складываются и образуют трансмембранную структуру, состоящую из шести спиралей[4]. HR2-подобные структуры являются весьма консервативными и входят в состав поверхностных гликопротеинов большого числа вирусов разных классов, выполняя одинаковую функцию слияния мембран вирусов и клеток-хозяев. Целью исследования стало изучение теоретической аффинности новых производных к возможному сайту связывания в домене HR2 тримера MARV GP.

Методы и алгоритмы: молекулярный докинг осуществлялся в среде визуализации Schrodinger Maestro с использованием приложений из пакета Schrodinger Small Molecule Drug Discovery Suite 2020-2. Трехмерные структуры производных были получены эмпирически в приложении LigPrep с использованием силового поля OPLS4. Для расчетов применялась рентгеноструктурная модель гликопротеина вируса Марбург, сокристаллизованная с моноклональными антителами[5] (PDB ID 6BP2, разрешение 3,17 Å). Для моделирования возможного механизма связывания с выбранной мишенью выполнялся молекулярный докинг с использованием

протокола IFD[6] (induced fit docking), который использует программы Glide и Prime для предикции положений лигандов в сайте связывания с учетом их влияния на структуру мишени. Область поиска для расчетной функции докинга была выбрана вручную, исходя из положения кармана, образуемого С-концами α -спиралей доменов HR2 тримера MARV GP. Применялся алгоритм повышенной точности докинга XP (extra precision). Докинг проводился в сравнении с результатами IFD, полученными для ингибиторов торемифена и сертралина. Были применены следующие условия: гибкий белок и лиганды, размер области докинга 20 Å, аминокислоты в пределах 5 Å от лиганда учитывались для оптимизации его влияния. Свободную энергию (ΔG) образовавшихся в результате выполнения протокола IFD нековалентных комплексов рассчитывали методом MM/GBSA[7] с использованием Prime. Расчет рКа четвертичных атомов азота пирролидинового, пиперидинового и морфолинового цикла новых производных монотерпеноидов выполнялся с помощью графовой конволюционной нейронной сети веб-сервера MolGrKa[8]. Нековалентные взаимодействия соединений в сайте связывания визуализировались с помощью Schrodinger Maestro.

Результаты: предполагаемый сайт связывания домена HR2 тримера MARV GP представляет собой полость, образуемую тремя идентичными С-концами α -спиралей. Связывание лиганда в этой полости приводит к невозможности конформационных изменений, приводящих к слиянию мембран вируса и лизосомы клетки-хозяина. Центральная часть сайта связывания обладает преимущественно гидрофобным характером, а участки α -спиралей вблизи возможного пространства связывания лигандов насыщены полярными аминокислотами, способными формировать водородные связи с полярными атомами возможных ингибиторов, которые могут проникать в промежутки между α -спиралями.

Из проведенных расчетов рКа четвертичных атомов азота гетероциклов новых конъюгатов следует, что для всех новых соединений при уровне pH, характерном для внутренней среды лизосом, преобладают формы с протонированным четвертичным атомом азота гетероцикла. Появление атома кислорода в составе морфолинового цикла существенно снижает теоретическую аффинность соединений к домену HR2 тримера MARV GP. При этом соединение, обладающее самым длинным линкером, является наиболее активным среди соединений с морфолиновым циклом в результате молекулярного моделирования. Разброс расчетного параметра docking score среди рядов соединений с пиперидиновым и морфолиновым циклом не велик, однако, в ряду соединений с морфолиновым циклом наиболее активным ингибитором в результате расчетов является соединение, также выделяющееся самым длинным линкерным фрагментом.

Рассматривая особенности нековалентных взаимодействий соединений можно сделать вывод о том, что фармакофорная структура вероятных ингибиторов домена HR2 тримера MARV GP, состоящая из объемного гидрофобного ядра и линкерного участка с гидрофильным четвертичным атомом азота хорошо соответствует особенностям сайта связывания. Монотерпеноидное ядро новых соединений располагается в центральной гидрофобной части сайта связывания. Протоны положительно заряженных четвертичных атомов азота гетероциклов новых соединений могут активно участвовать в формировании водородных связей, проникая в гидрофильные борозды между α -спиралями домена HR2. Наблюдаются также водородные связи, возникающие и за счет акцепторных

атомов ингибиторов, как эфирного атома кислорода, так и атома кислорода в составе морфолинового цикла. Не прослеживается существенной разницы в активности соединений, содержащих пятичленный пирролидиновый и шестичленный пиперидиновый циклы.

Выводы: новые конъюгаты теоретически способны взаимодействовать с сайтом связывания, образованным С-концевыми участками α -спиралей домена HR2 тримера MARV GP. Наличие атома кислорода в составе морфолинового цикла новых конъюгатов существенно снижает теоретическую аффинность соединений в отношении сайта связывания домена HR2 MARV GP. Увеличение длины алифатического линкера между триазольным циклом и гетероциклом в структуре соединений, содержащих пиперидиновый и морфолиновый цикл повышает их теоретическую аффинность к рассматриваемому сайту связывания. Эта тенденция нарушается в ряду соединений с пирролидиновым циклом, соединение с самым коротким линкером демонстрирует самое низкое значение docking score в результате расчетов. Результаты молекулярного моделирования были подтверждены изучением ингибирующей активности новых конъюгатов в отношении псевдовирусных частиц, содержащих гликопротеин вируса Марбург. Полученные данные были опубликованы в статье [9].

Финансирование: исследование поддержано Министерством науки и высшего образования РФ (государственное задание № 075-03-2023-642).

Molecular modeling of the mechanism of antiviral action of new conjugates of 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane and saturated N-heterocycles linked by a 1,2,3-triazole linker against the Marburg virus

Baev D.S.*, Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Tolstikova T.G., Salakhutdinov N.F.

N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia

* baev@nioch.nsc.ru

Key words: monoterpenoids; filoviruses; inhibitors; molecular modeling

Motivation and Aim: in continuation of studies of monoterpenoid derivatives exhibiting antiviral effects against filoviruses, it was suggested that these molecules could inhibit the Marburg virus viral glycoprotein (MARV GP). According to the literature [1], the primary sequence homology between the Ebola virus glycoprotein (EBOV GP) and MARV GP is only 27 %. However, known EBOV GP inhibitors, such as toremifene, are able to inhibit MARV GP, although at higher concentrations [2]. Targeted mutagenesis of amino acids at the EBOV GP binding site that are important for interaction with inhibitors results in an effect/concentration relationship characteristic of the inhibition of pseudoviral particles containing wild-type MARV GP. Thus, it was concluded that on the surface of the filovirus viral glycoprotein trimer there is an additional inhibitor binding site, which in the case of MARV GP is the main one. Such a binding site may be located in the HR2 domain of the glycoprotein trimer [3]. HR2 is a predominantly α -helical domain that connects HR1 at the N terminus of the GP2 domain to the viral membrane at the C terminus. During fusion, the HR1 and HR2 domains fold and form a

transmembrane structure consisting of six helices [4]. HR2-like structures are very conservative and are part of the surface glycoproteins of a large number of viruses of different classes, performing the same function of fusion of the membranes of viruses and host cells. The aim of the research was to study the theoretical affinity of the new derivatives for a possible binding site in the HR2 domain of MARV GP trimer.

Methods and Algorithms: molecular docking was performed in the Schrodinger Maestro visualization environment using applications from the Schrodinger Small Molecule Drug Discovery Suite 2020-2. The 3D structures of the derivatives were obtained empirically in the LigPrep application using the OPLS4 force field. For calculations, we used the X-ray structural model of the Marburg virus glycoprotein, cocrystallized with monoclonal antibodies [5] (PDB ID 6BP2, resolution 3.17 Å). To model the possible mechanism of binding to the selected target, molecular docking was performed using the IFD[6] (induced fit docking) protocol, which uses the Glide and Prime programs to predict the positions of ligands in the binding site, taking into account their influence on the structure of the target. The search region for the estimated docking function was manually selected based on the position of the pocket formed by the C-termini of the α -helices of the HR2 domains of the MARV GP trimer. The XP (extra precision) docking algorithm was used. Docking was carried out in comparison with the IFD results obtained for the inhibitors toremifene and sertraline. The following conditions were applied: flexible protein and ligands, docking region size 20 Å, amino acids within 5 Å of the ligand were considered to optimize its effect. The free energy (ΔG) of non-covalent complexes formed as a result of the IFD protocol was calculated by the MM/GBSA method [7] using Prime. Calculation of pKa of the quaternary nitrogen atoms of the pyrrolidine, piperidine and morpholine rings of new monoterpenoid derivatives was performed using the graph convolutional neural network of the MolGpKa web server [8]. Noncovalent interactions of compounds at the binding site were visualized using Schrodinger Maestro.

Results: the putative binding site for the HR2 domain of the MARV GP trimer is a cavity formed by three identical C-termini of α -helices. Binding of the ligand in this cavity prevents the conformational changes leading to the fusion of the membranes of the virus and the host cell lysosome. The central part of the binding site is predominantly hydrophobic, and sections of the α -helices near the possible ligand binding space are saturated with polar amino acids capable of forming hydrogen bonds with the polar atoms of possible inhibitors, which can penetrate into the spaces between the α -helices. From the calculations of pKa of the quaternary nitrogen atoms of heterocycles of new conjugates, it follows that for all new compounds at the pH level characteristic of the internal environment of lysosomes, forms with a protonated quaternary nitrogen atom of the heterocycle predominate. The appearance of an oxygen atom in the morpholine ring significantly reduces the theoretical affinity of compounds for the HR2 domain of the MARV GP trimer. Moreover, the compound with the longest linker is the most active among compounds with a morpholine ring as a result of molecular modeling. The scatter of the calculated docking score parameter among the series of compounds with a piperidine and morpholine ring is not large; however, in the series of compounds with a morpholine ring, the most active inhibitor, as a result of the calculation, is the compound that also has the longest linker fragment.

Considering the features of non-covalent interactions of compounds, we can conclude that the pharmacophore structure of potential inhibitors of the HR2 domain of the MARV GP trimer, consisting of a hydrophobic core and a linker region with a hydrophilic

quaternary nitrogen atom, corresponds well to the characteristics of the binding site. The monoterpene core of the new compounds is located in the central hydrophobic part of the binding site. Protons of the positively charged quaternary nitrogen atoms of the heterocycles of the new compounds can actively participate in the formation of hydrogen bonds, penetrating into the hydrophilic grooves between the α -helices of the HR2 domain. Hydrogen bonds are also observed that arise due to the acceptor atoms of the inhibitors, both the ether oxygen atom and the oxygen atom in the morpholine ring. There is no significant difference in the activity of compounds containing a five-membered pyrrolidine and six-membered piperidine rings.

Conclusion: the new conjugates are theoretically capable of interacting with the binding site formed by the C-termini of the α -helices of the HR2 domain of the MARV GP trimer. The presence of an oxygen atom in the morpholine ring of the new conjugates significantly reduces the theoretical affinity of the compounds for the binding site of the HR2 domain of MARV GP. Increasing the length of the aliphatic linker between the triazole ring and the heterocycle in the structure of compounds containing a piperidine and morpholine ring increases their theoretical affinity for the binding site in question. This trend is broken in the series of compounds with a pyrrolidine ring; the compound with the shortest linker shows the lowest docking score in the calculations. The results of molecular modeling were confirmed by studies of the inhibitory activity of new conjugates against pseudoviral particles containing MARV GP. Based on the results of the research, an article was published [9].

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (state assignment No. 075-03-2023-642).

Список литературы/References

1. Ren J., Zhao Y., Fry E.E., Stuart D.I. Target Identification and Mode of Action of Four Chemically Divergent Drugs against Ebolavirus Infection. *J Med Chem.* 2018;61:724-733. doi 10.1021/acs.jmedchem.7b01249
2. Cooper L., Galvan Achi J., Rong L. Comparative analyses of small molecule and antibody inhibition on glycoprotein-mediated entry of M $\ddot{e}$ ngl $\grave{a}$ virus with other filoviruses. *J Med Virol.* 2022;94:3263-3269. doi 10.1002/jmv.27739
3. Schafer A., Xiong R., Cooper L. et al. Evidence for distinct mechanisms of small molecule inhibitors of filovirus entry. *PLoS Pathog.* 2021;17:e1009312. doi 10.1371/JOURNAL.PPAT.1009312
4. Porotto M., Yokoyama C.C., Palermo L.M. et al. Viral Entry Inhibitors Targeted to the Membrane Site of Action. *J Virol* 2010;84:6760-6768. doi 10.1128/jvi.00135-10
5. King L.B., Fusco M.L., Flyak A.I. et al. The Marburgvirus-Neutralizing Human Monoclonal Antibody MR191 Targets a Conserved Site to Block Virus Receptor Binding. *Cell Host Microbe.* 2018;23:101-109.e4. doi 10.1016/j.chom.2017.12.003
6. Sherman W., Day T., Jacobson M.P., Friesner R.A., Farid R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *J Med Chem.* 2006;49:534-553. doi 10.1021/jm050540c
7. Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10:449-461
8. Pan X., Wang H., Li C., Zhang J.Z.H., Ji C. MolGpka: A Web Server for Small Molecule pKa Prediction Using a Graph-Convolutional Neural Network. *J Chem Inf Model.* 2021;61:3159-3165. doi 10.1021/acs.jcim.1c00075
9. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Artyushin O.I. et al. Design, synthesis and antiviral evaluation of novel conjugates of the 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane scaffold and saturated N-heterocycles via 1,2,3-triazole linker. *Arch Pharm.* 2024;357:2300549. doi 10.1002/ardp.202300549