

УДК 544.1+548.737+577.1+577.3

## СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТОННОГО М2-КАНАЛА ВИРУСА ГРИППА А С ПРОТИВОВИРУСНЫМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ АДАМАНТАНОВОГО РЯДА

© 2023 г. А. А. Лашков<sup>1,\*</sup>, Т. М. Гараев<sup>2</sup>, С. В. Рубинский<sup>1</sup>, В. Р. Самыгина<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

<sup>3</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

\*E-mail: alashkov83@gmail.com

Поступила в редакцию 29.06.2023 г.

После доработки 24.07.2023 г.

Принята к публикации 24.07.2023 г.

Пандемия вируса гриппа А остается значительной угрозой для здоровья населения планеты. Для борьбы с пандемией в основном используется один класс противовирусных препаратов, а именно, ингибиторы специфического вирусного фермента — нейраминидазы, к которым относятся занамивир (Relenza™) и озельтамивир (Tamiflu™). Отметим, что устойчивость вируса к этому классу соединений неуклонно растет. Протонный канал М2 вируса гриппа А является альтернативной, клинически доказанной мишенью противовирусной терапии. Однако многие циркулирующие штаммы вируса имеют аминокислотные мутации в белке М2, вызывающие устойчивость к препаратам адамантанового ряда — блокаторам М2, таким как римантадин и амантадин. Следовательно, ингибиторы, способные воздействовать на мутантные формы канала М2, крайне необходимы для биобезопасности населения. Представлен обзор структурно-функциональных взаимодействий экспериментальных лекарственных препаратов с белком-мишенью — трансмембранным доменом протонного канала М2 вируса гриппа. Проведен анализ экспериментальных и модельных структурных данных, находящихся в открытом доступе.

DOI: 10.31857/S0023476123600374, EDN: HAPIRE

### ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение

1. Общее описание функций и структуры М2-белков
2. Структурные основы действия ингибиторов М2
3. Биологическое действие гистидин-римантадина
4. Молекулярное моделирование комплекса His-Rim с М2-каналом

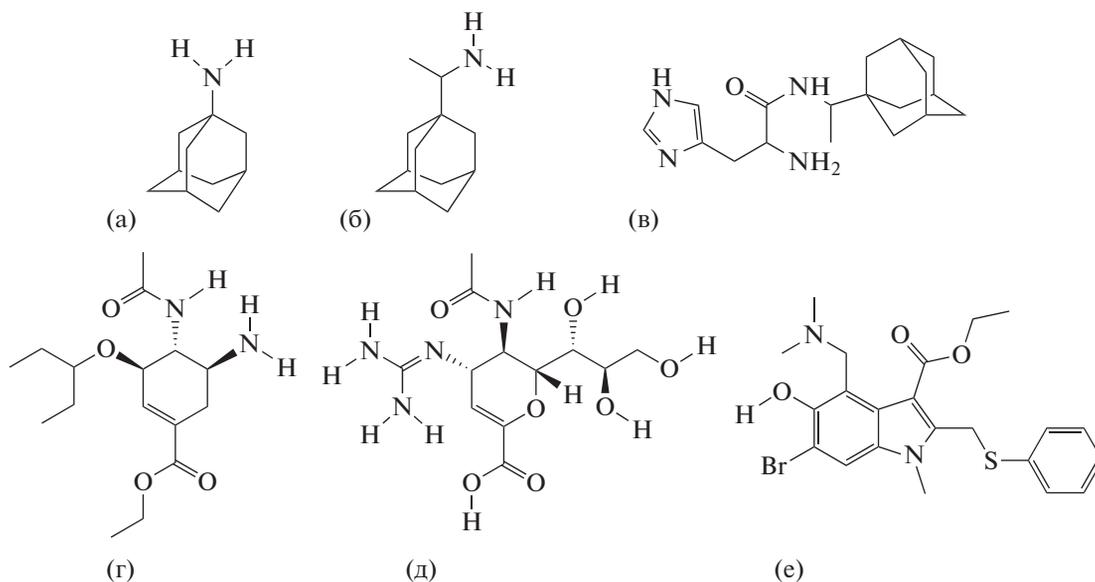
Заключение

### ВВЕДЕНИЕ

Пандемия вируса гриппа А остается значительной угрозой для здоровья населения планеты. Борьба с пандемией в основном связана с одним классом противогриппозных препаратов — ингибиторами специфического вирусного фермента нейраминидазы (НА): занамивиром (Relenza™) и озельтамивиром (Tamiflu™) (рис. 1). Отметим, что устойчивость вируса гриппа А к этому классу соединений неуклонно растет. С 2007 г. все чаще сообщается о широком распространении лекарственной устойчивости к озельтамивиру [1–3].

Важную роль при заражении вирусом гриппа играет гемагглютинин (НА), который представляет собой гомотримерный гликопротеин, обеспечивающий слияние и проникновение вируса гриппа в клетку-мишень [4]. Рецепторами к НА являются остатки сиаловых кислот на поверхности чувствительных клеток. НА является одной из перспективных мишеней для противовирусных средств, поскольку такие препараты блокируют начальную стадию заражения, предотвращая проникновение вируса в клетку. В настоящее время на фармацевтическом рынке в качестве ингибитора НА представлен Арбидол™ (умифеновир, Umifenovirum, рис. 1) [5, 6]. Препарат не включен в “Рекомендации ВОЗ по фармакологическому лечению пандемического гриппа А/Н1N1pdm09 и других вирусов гриппа” по причине “недостаточных данных об эффективности или безопасности, либо по обоим причинам” [7, 8].

Протонный канал М2 вируса гриппа А, относящийся к классу виropоринoв, является альтернативной, клинически доказанной противовирус-



**Рис. 1.** Структурные формулы клинически используемых и экспериментальных противовирусных препаратов. Производные адамантана: а – амантадин, б – римантадин, в – гистидин-римантадин. Прочие препараты: г – озельтамивир, д – занамивир, е – умифеновир.

ной мишенью [9]. Однако почти все циркулирующие штаммы имеют точечную аминокислотную замену S31N в белке M2, которая вызывает устойчивость к препаратам адамантанового ряда: римантадину и амантадину (рис. 1) [10]. Ингибиторы, способные воздействовать на N31-содержащий M2 (M2-N31), крайне необходимы для биобезопасности населения. Настоящий обзор посвящен структурно-функциональным взаимодействиям, происходящим при воздействии лекарственных препаратов на белок-мишень: трансмембранный домен протонного канала M2 вируса гриппа.

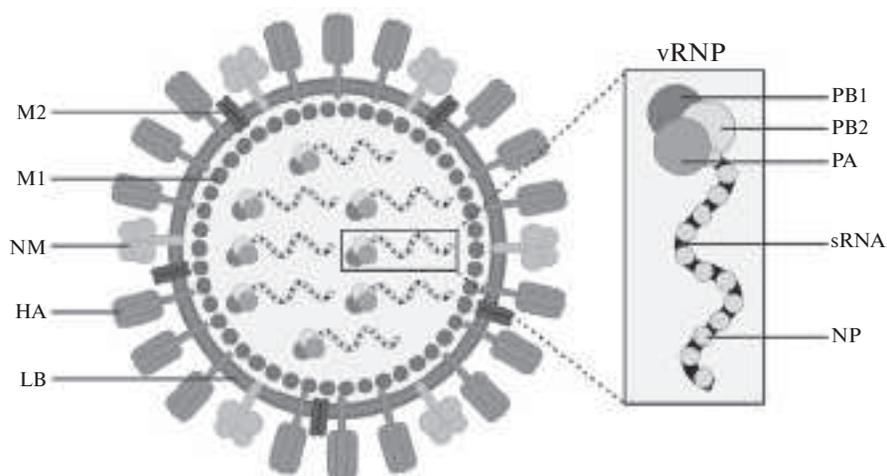
## 1. ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ ФУНКЦИЙ И СТРУКТУРЫ M2-БЕЛКОВ

M2-белки вируса гриппа А являются трансмембранными белками, образующими протон-селективные каналы в липидной оболочке (рис. 2). Канал M2-белка (M2-канал) представляет собой гомотетрамерную структуру, собранную из четырех субъединиц M2-белка, полипептидная цепь которого длиной 97 аминокислотных остатков (а.о.) частично спирализованна в районе трансмембранного домена [11].

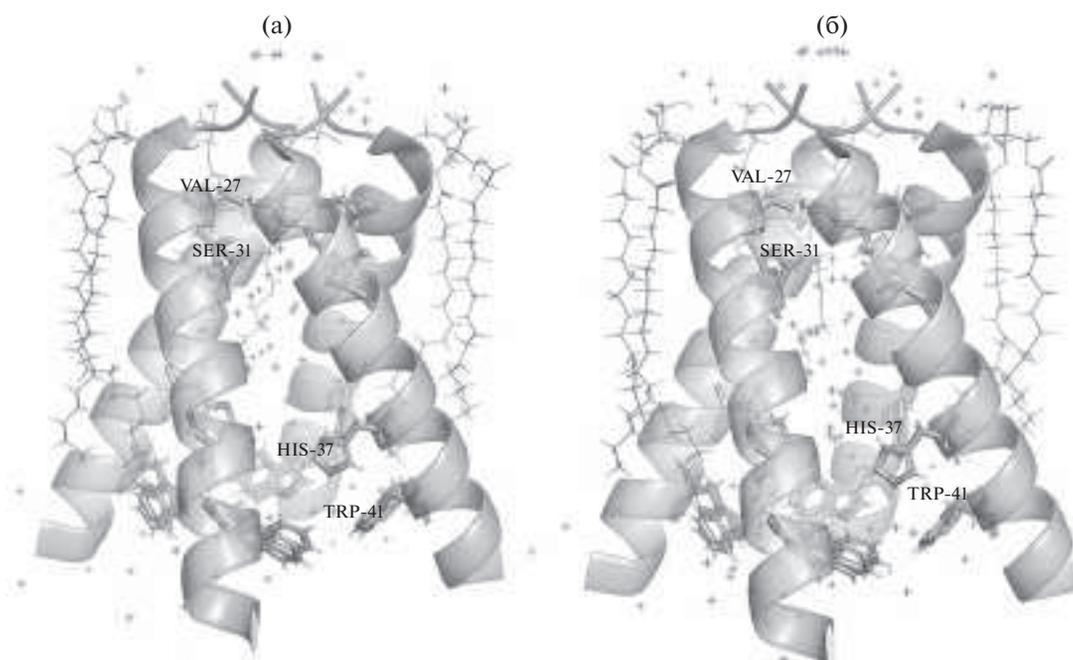
Протонная проводимость M2-каналов необходима для репликации вируса: они регулируют pH внутри вирусной частицы при проникновении вириона в эндосому клетки через мембрану аппарата Гольджи. Когда вирус проникает в клетку-хозяин с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза, происходит эндосомальное закисление. Избыток H<sup>+</sup> (низкое значение pH) активирует канал M2, который доставляет протоны в

ядро вириона вируса гриппа. При закислении внутреннего пространства вирусной частицы происходит ослабление электростатического взаимодействия и диссоциации связей между матричным M1-белком (рис. 2) и вирусными рибонуклеопротеиновыми комплексами. Последующее слияние мембран оболочки вируса высвобождает рибонуклеопротеины в цитоплазму клетки-хозяина, которые импортируются в ядро, для запуска процесса репликации вируса [12, 13].

Другая важная роль M2-белка проявляется во время сборки вирусной частицы, когда вновь синтезированные вирусные белки транспортируются к поверхности мембраны клетки-хозяина через транс-сеть аппарата Гольджи (ТГН), где присутствует избыток H<sup>+</sup>. Однако при низких значениях pH белки вируса, в частности HA, могут претерпевать преждевременную и нежелательную трансформацию. После синтеза в инфицированной клетке-хозяине M2-белок встраивается в эндоплазматический ретикулум и транспортируется на поверхность клетки через ТГН. В кислой среде аппарата Гольджи M2-канал транспортирует ионы H<sup>+</sup> из просвета ТГН и поддерживает метастабильную конфигурацию HA, предотвращая его нежелательную трансформацию [14, 15]. Кроме того, ионные каналы белка M2 эффективно активируют криопиринный путь воспаления (NLRP3) [16]. Другой важной функцией M2 является его роль в разрыве мембраны и высвобождении делящегося вириона. M2 стабилизирует место деления вируса, а мутации M2, препятствующие его связыванию с M1, могут нарушать образование филаментов в месте деления [17].



**Рис. 2.** Строение вирусной частицы вируса гриппа А: М1 – матричный белок, М2 – протонный М2-канал, NM – нейроминидаза, HA – гемагглютинин, LP – липидный бислой, vRNP – вирусный рибонуклеопротеиновый комплекс, PA, PB1, PB2 – вирусные полимеразы, sRNA – сегментированная РНК, NP – нуклеопротеин.



**Рис. 3.** Пространственная структура трансмембранной части М2-канала вируса гриппа А при высоком значении рН (PDB ID: 4QK7) (а) и низком (4QKC) (б). Структуры установлены методом рентгеновского анализа синтетического фрагмента канала в липидной кубической фазе [17]. Указаны функционально значимые аминокислотные остатки.

В вирусе гриппа А М2-белок состоит из трех доменов:

- внеклеточный N-концевой домен (а.о. 1–23);
- трансмембранный сегмент (ТМС) (а.о. 24–46, рис. 3);
- внутриклеточный С-концевой домен (а.о. 47–97).

Канал М2 активируется низким значением рН и имеет низкую проводимость для других ионов [18]. Функция протонной помпы сосредоточена в ТМС, который образует пору ионного канала (рис. 3). Важными функциональными группами являются имидазольная группа His37 (датчик рН)

и индольная Trp41 (ворота) [19] (рис. 3). Четыре His37 (по одному от каждой субъединицы) образуют имидазольное сопряжение. Источником протонов служат ионы гидроксония ( $H_3O^+$ ) [20]. Trp41 в трансмембранной области закрывают пору канала с внутренней части.

Когда три или все четыре имидазольные группы His37 протонированы, электростатическое отталкивание между ними нарушает винтовую упаковку цепей тетрамерного канала М2 и открывает ворота, состоящие из индольных групп Trp41, для прохода протонов внутрь вирусной частицы. Ис-

кусственное нарушение этого механизма позволит создать эффективный препарат против гриппа, даже тех его штаммов, которые приобрели устойчивость к воздействию существующих препаратов [21].

Если His37 заменяется глицином, аланином, глутаминовой кислотой, серином или треонином, протон-селективная активность теряется, и мутант приобретает возможность транспортировать ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . При добавлении имидазольного буфера к клеткам, экспрессирующим мутантные белки, ионная селективность частично восстанавливается [22].

В [23] предполагалось, что механизм проводимости включает в себя обмен протонами между имидазольными фрагментами His37 M2 и водой, ограниченной внутренней частью канала M2. Молекулы воды внутри поры образуют сети водородных связей (“водяные провода”) от входа в канал до His37. Карбонильные группы а.о., выступающие стенки поры, стабилизируют ионы гидроксония посредством взаимодействия их второй гидратной оболочки с мостиковыми молекулами воды. Коллективное переключение ориентации водородных связей может способствовать направленности потока протонов, поскольку His37 динамически протонируется и депротонируется в цикле проводимости  $\text{H}^+$  [24]. Остатки His37 образуют структуру “коробки” (рис. 3), ограниченную с обеих сторон кластерами воды с хорошо упорядоченными атомами кислорода рядом. Конформация белка, которая является промежуточной между структурами (ID PDB: 4QK7, 4QKC [24]), ранее решенными при более высоком и более низком pH (рис. 3), указывает на механизм, с помощью которого конформационные изменения могут способствовать асимметричной диффузии  $\text{H}^+$  через канал в присутствии протонного градиента. Более того, протоны, диффундирующие через канал, не должны быть локализованы около одного имидазола His37, вместо этого они могут быть делокализованы по всему His-боксу и ассоциированным кластерам воды.

C-концевой фрагмент канала переходит в петлю (а.о. 47–50), соединяющую трансмембранный домен с C-концевой амфипатической спиралью (а.о. 46–62). Первые 17 а.о. цитоплазматического хвоста M2 образуют высококонсервативную амфипатическую спираль. [25], ее а.о. 46–62 внутри цитоплазматического хвоста играют роль в делении и сборке вируса путем изменения кривизны билипидных мембран [26]. А.о. 70–77 цитоплазматического хвоста важны для связывания с M1-белком и для эффективного производства инфекционных вирусных частиц. Эта область также содержит кавеолинсвязывающий домен (КСД).

Известны две различные структуры укороченных форм M2 с высоким разрешением: кристаллическая структура мутантной формы трансмембранной области M2 (а.о. 22–46) [27] и более

длинная версия белка (а.о. 18–60), содержащая трансмембранную область и сегмент C-концевого домена по данным ЯМР [28].

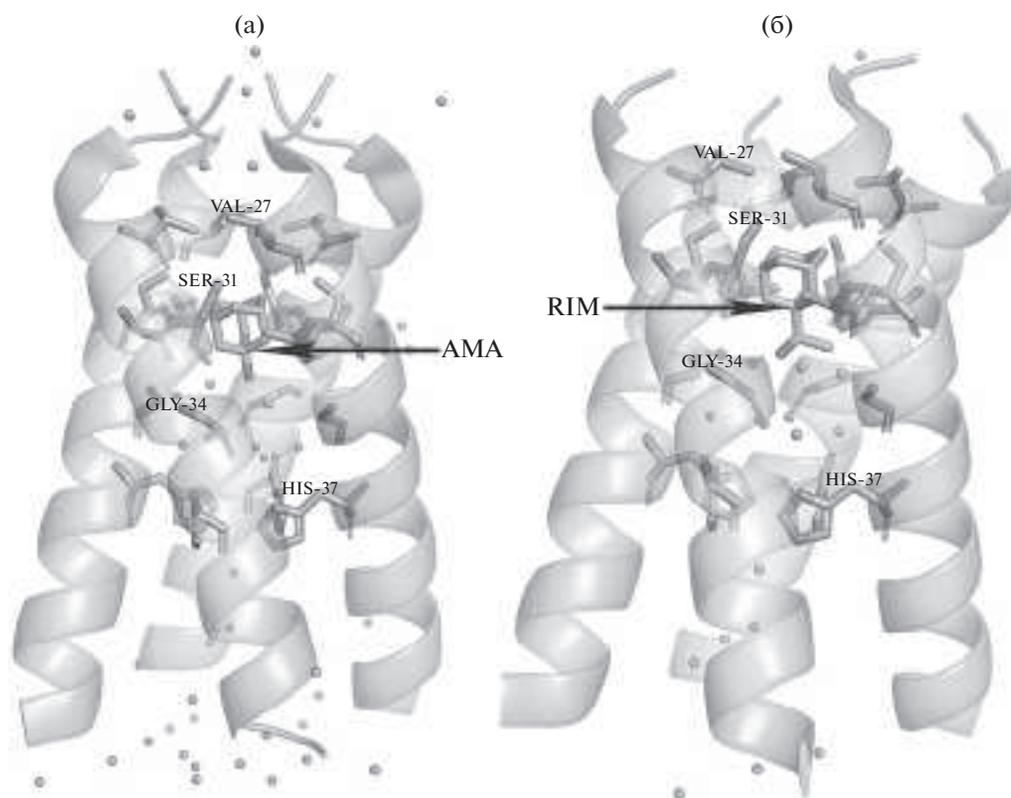
У вирусов гриппа В и С имеются белки с аналогичной функцией: VM2 и CM2 соответственно. Они негомологичны M2 по аминокислотной последовательности, несмотря на похожую трехмерную структуру и механизм действия [29].

## 2. СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ M2

Вирусный белковый канал M2 является мишенью для противовирусных терапевтических препаратов – производных адамантана: амантадина и римантадина. Соединения адамантанового ряда, а именно, аминокислоты адамантана, использовались для лечения и профилактики гриппа А с 70-х гг. прошлого века [30]. Из-за синтетической доступности и низкой стоимости производства препараты широко применялись для борьбы с сезонными эпидемиями гриппа во всем мире.

Сайт связывания канала M2 с амантадином или римантадином в настоящее время является предметом интенсивных дискуссий. Считается, что римантадин блокирует активность гриппа, связываясь с аминокислотами в трансмембранном канале M2 и блокируя транспорт протонов через канал M2 [27, 31] (рис. 4б). Группа аммония (с соседними молекулами воды) расположена ближе к C-концу ТМС, а группа адамантана расположена ближе к N-концу ТМС, когда они связаны внутри поры M2. Так как в препарате римантадина присутствуют оба энантиомера, были проведены дополнительные исследования ЯМР, показавшие, что R-энантиомер имеет более сильное связывание с порой канала M2, чем S-энантиомер римантадина. Однако анализ противовирусной активности препаратов и электрофизиологические исследования показывают, что нет существенной разницы между энантиомерами R и S в связывании с аминокислотами в канале M2 [32]. Поскольку энантиомеры имеют схожую аффинность связывания, они также обладают аналогичной способностью блокировать поры канала и работать как эффективное противовирусное средство.

Так же действует амантадин [33] (рис. 4а). Согласно кристаллической структуре при низком значении pH одна молекула амантадина связывается в середине поры, окруженная остатками Val27, Ala30, Ser31 и Gly34. Напротив, ЯМР-структура показала, что четыре молекулы римантадина связываются с липидом, обращенным к внешней поверхности поры, взаимодействуя с остатками Asp44 и Arg45. Однако недавно полученная структура твердотельного ЯМР показывает, что канал M2 имеет два сайта связывания амантадина, один, с высоким сродством, находится в просвете



**Рис. 4.** Пространственная структура трансмембранной части M2-канала вируса гриппа А в комплексе с амантадином (PDB ID: 6BKK, AMA) (а) и римантадином (6BKL, RIM) (б). Структуры установлены методом рентгеновского анализа синтетического фрагмента канала в липидной кубической фазе [38].

N-конца, а второй, с низким сродством, находится на поверхности С-конца белка.

Механизм ингибирования адамантановых препаратов был спорным в течение последних двух десятилетий, до появления кристаллографических структур высокого разрешения (рис. 4, табл. 1). Сайт связывания лекарственных препаратов был предсказан с помощью анализа сайт-направленного мутагенеза резистентных штаммов вируса гриппа А. Мутации, отвечающие за устойчивость к препаратам амантадина или римантадина, встречаются в позициях аминокислотной последовательности M2, таких как 26, 27, 30, 31, 34 и 38 [34, 35]. Большинство этих позиций, включая а.о. 27, 30, 31 и 34 (рис. 4), расположены на внутренней поверхности канала M2, что и привело к гипотезе о том, что препараты проникают внутрь канала.

В [36] проведены исследования молекулярного докинга амантадина путем перемещения ингибитора вдоль поры канала и обнаружен энергетический минимум вокруг позиций 27 и 31. Предпологалось, что гидрофобный адамантический остов препарата взаимодействует с боковыми цепями Val27, тогда как аминокислота соединения образует электростатические взаимодействия (водородную связь) с гидроксилами остатка Ser31.

В [36] амантадин был помещен возле остатка 27 на основе компьютерного моделирования, но аминокислота лекарственного средства образовывала одну или несколько чередующихся водородных связей с гидроксильными группами Ser31 и карбонилем ( $-C=O$ ) основной цепи Ala30. Экспериментальным подтверждением, согласующимся с сайтом Val27, стало исследование дифракции нейтронов, с помощью которого было выявлено, что молекула амантадина расположена на расстоянии  $\sim 6$  Å от центра мембраны [37], однако также сообщалось, что препарат связывается с наружной поверхностью канала с остатками Asp44 вблизи С-конца канала.

В [38] признали важность His37 в протонной проводимости и поэтому предположили, что аминокислота амантадина может взаимодействовать с имидазолами His37, тогда как гидрофобный остов молекулы лекарственного препарата расположен в самой широкой области поры около Gly34.

Однако положение этого сайта связывания не согласуется с данными нейтронной дифракции. В [39] на основе изменений химического сдвига, измеренных с помощью твердотельного ЯМР, предложили, что амантадин связывается с еще одним сайтом внутри канала. В этом сайте связывания аминокислота препарата направлена к N-концевому участку канала M2 и расположена

**Таблица 1.** Рентгеновские структуры, депонированные в RCSB PDB

ID PDB	Литература	Разрешение, Å	Лиганд	Мутации (а.о.)	Штамм	Длина цепи <sup>1</sup>	Метод <sup>2</sup>	pH	Год
3VKD	[27]	2.05				26	ДП : СК	7.3	2008
3C9J	[27]	3.50	амантадин			25	ДП : СК	5.3	2008
3LBW	[23]	1.65		2: 10, 23		23	ДП : СК	6,5	2010
4QK7	[24]	1.1			udorn/1972(H3N2)	27	ЛКФ	8	2015
4QKC	[24]	1.1			udorn/1972(H3N2)	27	ЛКФ	5.5	2015
5JOO	[48]	1.4		2: 1, 27	Hickox/1940(H1N1)	27	ЛКФ	5,5	2017
5TTC	[48]	1.4		2: 1, 27	Hickox/1940(H1N1)	27	ЛКФ	8	2017
6BKK	[46]	2.0	адамантан	2: 1 и 27		27	ЛКФ	4.5	2018
6BKL	[46]	2.0	римантадин			27	ЛКФ	5.6	2018
6BMZ	[46]	2.63	спироадамантан			27	ЛКФ	7	2018
6BOC	[46]	2.25	римантадин	2: 1, 27		27	ЛКФ	3.5	2018
6MJH	[49]	2.06		2: 1, 27	pigeon/Jiangsu/K23/2013 (H9N2)	27	ЛКФ	5	2019
6NV1	[47]	2.5	спироадамантил-амин	2: 1 и 27	Indonesia/CDC1031RE2/2007(H5N1)	27	ЛКФ		2020
6OUG	[47]	3.0	спироадамантил-амин	2: 7 и 30	Memphis/1/1971(H3N2)	41	ЛКФ	8	2019

<sup>1</sup> Длина полипептидной цепи мономера.

<sup>2</sup> Метод кристаллизации: ДП:СК – диффузия в парах в варианте сидячей капли, ЛКФ – липидная кубическая фаза.

вблизи Ser31. Но в [39] отмечено, что для образования водородных связей аминокислотная группа препарата находится слишком далеко от гидроксильных групп остатков Ser31 (~4.5 Å, рис. 4а).

Хотя экспериментальные исследования, прежде всего молекулярное моделирование, указывали на взаимодействие между амантадином и М2, ни одно из исследований не показало точного места связывания внутри поры. Интересно, что исследование методом сайт-направленного мутагенеза показало, что мутация в положении Ser31 влияет на связывание амантадина с М2. Поэтому Ser31 был предложен в качестве мишени для образования полярных связей с поверхностью канала [40]. Наиболее прямое доказательство места связывания препарата в поре М2 было получено путем кристаллографического исследования ТМС пептида М2 в присутствии амантадина [27]. Эта структура определялась при относительно низком разрешении (3.5 Å), недостаточном для однозначной идентификации малых молекул, таких как амантадин (максимальный диаметр сферического адамантового остова составляет ~3.4 Å). Предложенная модель связывания лекарственного средства в поре канала М2 характеризуется очень необычным взаимодействием гидрофобных и гидрофильных групп, при котором четыре гидроксильные группы остатков Ser31 координируют неполярный адамантовый остов.

Главным аспектом этого механизма связывания является то, что аминокислотная группа амантадина,

имеющая решающее значение для ингибирования [27], не взаимодействует ни с одной из полярных групп в поре канала М2. С другой стороны, мутант S31A был чувствительным к действию римантадина [40], что указывает на то, что Ser31 не играет решающей роли в связывании с препаратом.

Таким образом, исследования, представленные выше, показывают, что образование классических водородных связей между лигандом и белком не является обязательным условием ингибирующего действия аминокислотных остатков на протонную проводимость. Внутренняя поверхность канала М2 составлена в основном из неполярных а. о., и для возникновения противовирусной активности достаточно образования надежного гидрофобного взаимодействия с лигандом. Этот факт следует учитывать при разработке лекарственных препаратов, преодолевающих вирусную резистентность к аминокислотным остаткам.

В табл. 1 представлена информация о пространственных структурах, решенных методом рентгеноструктурного анализа, как нативных форм трансмембранной части канала М2 вируса гриппа, так и в комплексах с противовирусными препаратами аминокислотного ряда. Во всех случаях использовался либо метод получения липидной кубической фазы, либо более классическая методика кристаллизации диффузии в парах в варианте висючей капли с использованием детергентов. В целом метод кубической фазы может

дать более высокое разрешение. Однако для локализации лиганда в канале определено достаточное разрешение  $\sim 2 \text{ \AA}$ .

### 3. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИСТИДИН-РИМАНТАДИНА

В результате широкого использования аминокислотных препаратов вирус гриппа А, обладающий высокой частотой мутаций, подвергался генетическим перестройкам и поэтому стал нечувствителен к действию данных препаратов [41]. В лабораторных штаммах ученые наблюдали различные мутации в трансмембранном домене канала М2, но для дикого типа вируса характерны три основные аминокислотные замены, из них аминокислотная замена Ser на Asp в позиции 31 белка М2 считалась критической для способности аминокислотных препаратов блокировать функции канала. Центры по контролю и борьбе с вирусными инфекциями совместно с ВОЗ [7, 8] не рекомендуют использовать препараты римантадин и амантадин для лечения гриппа, так как резистентность к ним достигла уже более 90%.

С целью преодоления лекарственной устойчивости вируса гриппа А к препаратам аминокислотного ряда и их биодоступности было создано аминокислотное производное римантадина – гистидин-римантадин (**His-Rim**) и исследованы его биологические свойства [42–44]. Значения эффективных концентраций для соединения  $2\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$  в отношении высокопатогенного штамма вируса гриппа А/Н5N1 были несколько меньше, чем для известного лекарственного препарата Арбидол.

Соединение  $2\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$  ввиду его достаточно высокой эффективности, а также экономической и синтетической доступности может быть рекомендовано в качестве кандидата на доклинические и клинические испытания для получения этиотропного противовирусного препарата на его основе.

### 4. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСА His-Rim С М2-КАНАЛОМ

В [45] описаны исследования *in vivo* биологического действия гистидин-римантадина на несколько мутантных форм вируса гриппа и молекулярное моделирование новых форм с протонным каналом М2. Для исследования устойчивости связывания  $\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$  в конформациях, отобранных из решений молекулярного докинга с М2 S31N и М2 S31N\_A30T, проводилось молекулярно-динамическое (МД) моделирование.

Решения докинга выявили явно выраженные кластеры по положению лиганда в канале с учетом того, что структура канала симметрична в направлении, перпендикулярном плоскости бислоя (ось четвертого порядка) (рис. 5).

Первый вариант (сайт) возможного связывания лиганда с каналом (**surface**) характеризуется поверхностным расположением лиганда. Адамантановый остов немного погружен в канал и находится на уровне Val27. Гистидиновая часть лиганда примыкает к боковой цепи Asp24 и взаимодействует с ней посредством водородных связей и электростатических взаимодействий. Также эта часть лиганда образует водородные связи с водой, окружающей вход в канал.

Второй вариант (**middle**) характеризуется тем, что адамантановый остов находится между 27 и 30 а.о., а аминокислотная часть лиганда взаимодействует с боковой группой Asn31 и основной цепью 30 а.о.

Третий вариант – глубокое расположение лиганда в канале (**deep**). Имидазольное кольцо гистидиновой части лиганда расположено почти поперек канала и находится на уровне 30–31 а.о. В то же время адамантановая часть лиганда находится на 3.5–4 Å выше плоскости имидазольных колец His37, имеющих принципиально большое значение в функционировании протонного насоса.

В поверхностном случае закрепления  $\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$  как в референсе, так и в мутанте А30Т плотность молекул воды в канале велика по обе стороны от His37. По-видимому, лиганд в этом сайте связывания плохо блокирует ток воды и, как следствие, активность протонного насоса.

Значительно меньшая плотность молекул воды наблюдается, когда лиганд находится в middle-сайте связывания конформации. В случае длительного МД-моделирования молекулы воды проникают с внутриклеточной стороны канала, проходят через His37 и сольватируют гистидиновую часть лиганда, устанавливая сеть водородных связей между лигандом и стенкой канала. Значительно меньшая диффузия воды в эту область происходит из внеклеточной части канала, так как диффузии препятствует адамантовый гидрофобный фрагмент лиганда. Поэтому ток воды в канале в случае middle-сайта связывания отсутствует или незначителен.

В случае глубокого связывания лиганда сверху молекулы воды в канал не проникают далее 30 а.о. Из внутриклеточной части канала тока воды также не наблюдается на протяжении всей траектории МД-моделирования [45]. Поэтому лиганд, находясь в этом сайте связывания, полностью блокирует ток воды в канале как референсной структуры, так и мутанта А30Т.

В [45] представлены значения свободной энергии связывания (аффинности) соединения  $\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$  с каналом М2. В поверхностном сайте связывания лиганда энергетически не очень выгодно, причем аффинность к  $\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$  одинакова как для мутантного канала, так и для референсной структуры, что объясняется отдаленностью положения точечной мутации А30Т от места связывания лиганда.

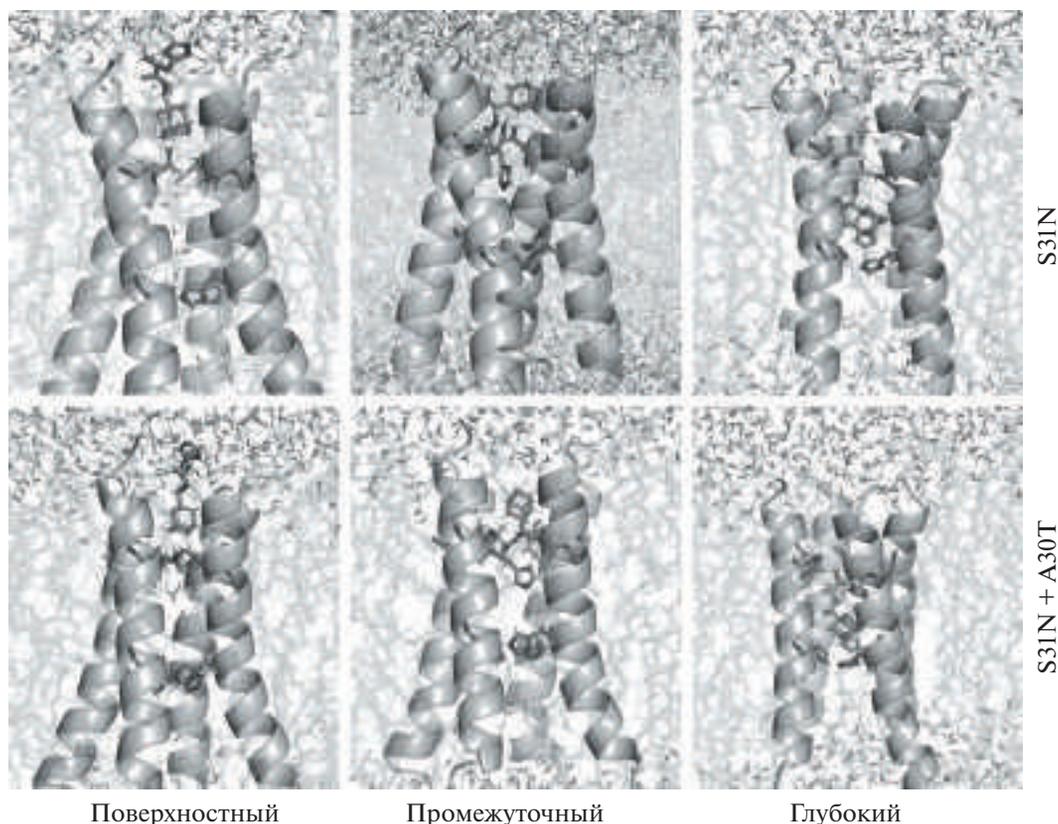


Рис. 5. Строение наружной (верхней) части протонного насоса в комплексе с гистидин-римантадином [37].

В случае middle-сайта связывание лиганда без учета сольватирования его аминокислотной части энергетически не выгодно. В то же время при сольватировании аминокислотной части  $\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$  происходит уменьшение свободной энергии связывания лиганда как с референсным, так и мутантным белком, но даже с учетом сольватирования лиганда связывание его с middle-сайтом оказывается менее выгодно энергетически, чем с поверхностным.

Связывание лиганда с глубоким сайтом является согласно расчетам свободной энергии самым энергетически выгодным. Кроме того, в случае глубокой конформации связывание лиганда с референсом значительно выгоднее, чем с A30T, что согласуется с результатом эксперимента *in vitro*. Эта разница может быть связана с увеличением объема бокового радикала Thr30 в сравнении с Ala.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ экспериментальных и модельных структурных данных, находящихся в открытом доступе, комплекса экспериментальных лекарственных препаратов с белком-мишенью: трансмембранным доменом протонного канала M2 вируса гриппа. Структурная формула соответствует перспективному препарату адамантанового ряда с повышенной биодоступностью, способ-

ного преодолеть лекарственную устойчивость, — гистидин-римантадину.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1355 от 12 октября 2021 года; обзор литературы по структурам и функциям протонного насоса вируса гриппа А) и в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН (анализ структурной информации из баз данных RSCB PDB и PubChem).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thorlund K., Awad T., Boivin G. et al. // BMC Infect. Dis. 2011. V. 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-134>
2. Singh A., Soliman M. // Drug Des. Devel. Ther. 2015. V. 9. P. 4137. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S81934>
3. Lampejo T. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2020. V. 39 (7). P. 1201. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>
4. Sriwilajaroen N., Suzuki Y. // Proc. Jpn. Acad. B. Phys. Biol. Sci. 2012. V. 88 (6). P. 226.
5. Ленева И.А., Гуськова Т.А. // Русский медицинский журнал. 2008. Т. 29 (16). С. 3.

6. *Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S. et al.* // *Antiviral Res.* 2009. V. 81 (2). P. 132.  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
7. WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses. WHO Geneva, 2010. Part I.
8. Centers for Disease Control and Prevention Recommendations. CS HCVG-15-FLU-107. 2018.
9. *Scott C., Griffin S.* // *J. Gen. Virol.* 2015. V. 96 (8). P. 2000.  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.000201>
10. *Wang J., Wu Y., Ma C. et al.* // *PNAS.* 2013. V. 110 (4). P. 1315.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>
11. *Nieto-Torres J.L., Verdia-Baguena C., Castano-Rodriguez C. et al.* // *Viruses.* 2015. V. 7. P. 3552.  
<https://doi.org/10.3390/v7072786>
12. *Liang R., Swanson J.M.J., Madsen J.J. et al.* // *PNAS.* 2016. V. 113 (45). P. 6955.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1615471113>
13. *Duong-Ly K.C., Nanda V., Degrado W.F. et al.* // *Protein Sci.* 2005. V. 14 (4). P. 856.  
<https://doi.org/10.1110/ps.041185805>
14. *Krejcová L., Michalek P., Hynek D. et al.* // *J. Metallo-mics Nanotechnol.* 2015. V. 1. P. 13.
15. *Sakaguchi T., Leser G.P., Lamb R.A.* // *J. Cell. Biol.* 1996. V. 133 (4). P. 733.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.133.4.733>
16. *Ichinohe T., Pang I.K., Iwasaki A.* // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11 (5). P. 404.  
<https://doi.org/10.1038/ni.1861>
17. *Rossmán J.S., Lamb R.A.* // *Virology.* 2011. V. 411 (2). P. 229.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.003>
18. *Mould J.A., Li H.C., Dudlak C.S. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275 (12). P. 8592.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8592>
19. *Tang Y., Zaitseva F., Lamb R.A. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277 (42). P. 39880.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M206582200>
20. *Miao Y., Fu R., Zhou H.X. et al.* // *Structure.* 2015. V. 23 (12). P. 2300.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.011>
21. *Hu F., Luo W., Hong M.* // *Science.* 2010. V. 330 (6003). P. 505.  
<https://doi.org/10.1126/science.1191714>
22. *Venkataraman P., Lamb R.A., Pinto L.H.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280 (22). P. 21463.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M412406200>
23. *Acharya R., Carnevale V., Fiorin G. et al.* // *PNAS.* 2010. V. 107 (34). P. 15075.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007071107>
24. *Thomaston J.L., Alfonso-Prieto M., Woldeyes R.A. et al.* // *PNAS.* 2015. V. 112 (46). P. 14260.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1518493112>
25. *Holsinger L.J., Nichani D., Pinto L.H. et al.* // *J. Virol.* 1994. V. 68 (3). P. 1551.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.68.3.1551-1563.1994>
26. *Rossmán J.S., Jing X., Leser G.P. et al.* // *Cell.* 2010. V. 142 (6). P. 902.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.029>
27. *Stouffer A.L., Acharya R., Salom D. et al.* // *Nature.* 2008. V. 451. P. 596.  
<https://doi.org/10.1038/nature06528>
28. *Schnell J.R., Chou J.J.* // *Nature.* 2008. V. 451. P. 591.  
<https://doi.org/10.1038/nature06531>
29. *Pielak R.M., Chou J.J.* // *Biomembranes.* 2011. V. 1808 (2). P. 522.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.04.15>
30. *Arroyo M., Beare A.S., Reed S.E. et al.* // *J. Antimicrob. Chemother.* 1975. V. 1 (4 Suppl). P. 87.  
[https://doi.org/10.1093/jac/1.suppl\\_4.87](https://doi.org/10.1093/jac/1.suppl_4.87)
31. *Vorobjev Y.N.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020. V. 39 (7). P. 2352.  
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1747550>
32. *Dobson J., Whitley R.J., Pocock S. et al.* // *Lancet.* 2015. V. 385 (9979). P. 1729.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62449-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62449-1)
33. *Golan D.E., Armstrong E.J., Armstrong A.W.* // *Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy.* 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2017. P. 142, 199, 205t, 224t, 608, 698.
34. *Hay A.J., Wolstenholme A.J., Skehel J.J. et al.* // *EMBO J.* 1985. V. 4. P. 3021.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb04038.x>
35. *Wang C., Takeuchi K., Pinto L.H. et al.* // *J. Virol.* 1993. V. 67 (9). P. 5585.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.67.9.5585-5594.1993>
36. *Sansom M.S., Kerr I.D.* // *Protein Eng.* 1993. V. 6 (1). P. 65.  
<https://doi.org/10.1093/protein/6.1.65>
37. *Duff K.C., Gilchrist P.J., Saxena A.M. et al.* // *Virology.* 1994. V. 202 (1). P. 287.  
<https://doi.org/10.1006/viro.1994.1345>
38. *Gandhi C.S., Shuck K., Lear J.D. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274 (9). P. 5474.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5474>
39. *Cady S.D., Mishanina T.V., Hong M.* // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 385 (4). P. 1127.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.022>
40. *Pielak R.M., Schnell J.R., Chou J.J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. V. 106. P. 7379.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902548106>
41. *Bright R.A., Medina M.J., Xu X. et al.* // *Lancet.* 2005. V. 366 (9492). P. 1175.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67338-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67338-2)
42. *Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П. и др.* // *Вопросы вирусологии.* 2019. Т. 64. Вып. 6. С. 268.
43. *Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П. и др.* // *Химико-фармацевтический журнал.* 2012. Т. 46. Вып. 1. С. 36.
44. *Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П. и др.* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2014. Т. 157 (1). С. 73.
45. *Garaev T.M., Odnovorov A.I., Lashkov A.A. et al.* // *Adv. Pharm. Bull.* 2021. V. 11 (4). P. 700.  
<https://doi.org/10.34172/apb.2021.079>
46. *Thomaston J.L., Polizzi N.F., Konstantinidi A. et al.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. V. 140 (45). P. 15219.  
<https://doi.org/10.1021/jacs.8b06741>
47. *Thomaston J.L., Konstantinidi A., Liu L. et al.* // *Biochemistry.* 2020. V. 59 (4). P. 627.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00971>
48. *Thomaston J.L., Woldeyes R.A., Nakane T. et al.* // *PNAS.* 2017. V. 114 (51). P. 13357.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1705624114>
49. *Thomaston J.L., Wu Y., Polizzi N. et al.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. V. 141 (29). P. 11481.  
<https://doi.org/10.1021/jacs.9b02196>