

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.218:577.32

КОНСТРУИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА ИОННОГО
КАНАЛА БЕЛКА M2 ВИРУСА ГРИППА А

© 2020 г. Ю. Н. Воробьев^{a, b, *}

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

^bНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

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

Поступила в редакцию 02.04.2019 г.

После доработки 19.09.2019 г.

Принята к публикации 19.09.2019 г.

Вирус гриппа А способен быстро инфицировать большую популяцию людей, поэтому разработка препаратов, способных ингибировать его репликацию, имеет исключительное значение. Важную роль в репликации вируса гриппа играет трансмембранный протонный канал, формируемый белком M2. Поэтому разумным подходом к созданию эффективного противовирусного препарата является конструирование молекулы, которая связывается в трансмембранном протонном канале M2, предотвращает диффузию протонов (H^+) через канал и ингибирует цикл вируса гриппа А. Известные противовирусные препараты амантадин и римантадин связываются в ионном канале M2, однако они слабо влияют на репликацию вируса гриппа А. Для блокирования диффузии протонов через ионный канал M2 предложен новый класс положительно заряженных молекул, производных диазабициклооктана, имеющих постоянный заряд +2. Выполнено моделирование молекулярной динамики тепловых флуктуаций структуры белка M2 и ионизационных состояний остатков гистидина при физиологических значениях pH. Изучено связывание двух классов производных диазабициклооктана с ионным каналом белка M2. Определена оптимальная структура молекулы блокатора, которая наиболее эффективно связывается с протонным каналом белка M2 и блокирует диффузионный перенос протона через канал. Важное преимущество нового блокатора над амантадином и римантадином – заряд +2, который создает положительный электростатический потенциальный барьер (в дополнение к стерическому) для блокирования транспорта протона H^+ через ионный канал белка M2.

Ключевые слова: вирус гриппа А, белок M2, ионный канал, блокаторы, молекулярная динамика, ионизация остатков гистидина, производные диазабициклооктана

DOI: 10.31857/S0026898420020160

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа А – это РНК-содержащий вирус, вызывающий пандемии (испанский грипп 1918 г., азиатский грипп 1957 г., гонконгский грипп 1968 г. и свиной грипп 2009 г.) [1]. Вирус гриппа быстро мутирует, поэтому существует острая необходимость в новых противовирусных препаратах. Разумным подходом к подавлению (нарушению) репродукции вируса гриппа А представляется воздействие на протонный канал, образованный трансмембранным доменом белка M2 (M2-TMD), например, блокирование ионного канала M2 и ингибирование протонного транспорта через него. Канал M2 образован аминокислотными остатками 24–46 каждой из четырех α -спиралей и представляет собой тетрамер с центральным продольным каналом [2, 3]. Транспорт протонов через канал M2 незначительно ме-

няется в области pH 5.4–7.0 [4]. Наиболее известными блокаторами ионного канала M2 являются амантадин и римантадин [5, 6]. Существуют блокаторы с более сложными структурами, например производные пикротоксина [7], производные адамантана и спироадамантиламин [8]. Моделирование методом молекулярной динамики (МД) показало, что профиль свободной энергии иона H^+ при движении вдоль ионного канала M2 имеет энергетический барьер ~5 ккал/моль [9]. Моделирование потенциальной энергии связывания амантадина методом МД с неявной моделью растворителя и окружающей среды, т.е. объема клеточной мембраны, предсказывает величину энергии связывания ~4 ккал/моль, что удовлетворительно соответствует экспериментальным данным [10]. Выход из протонного канала M2 контролируется остатками His37A (B, C, D) и Trp41A (B, C, D)

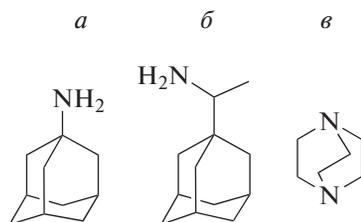


Рис. 1. Структуры: молекул амантадина (а), римантадина (б), 1,4-диазобисцикло[2.2.2]октана (DABCO) (в).

четырёх α -спиралей, формирующих этот канал. Закрытое состояние канала имеет достаточно узкий выход, формируемый Trp41A (B, C, D) с диаметром выхода несколько меньшим, чем у молекулы воды, 2.8 Å [11]. Методом ЯМР показано, что связывание амантадина с каналом M2 изменяет спектр конформационных флуктуаций и уменьшает их амплитуду [12]. Согласно данным мутагенеза и электрофизиологических экспериментов аминокислотные остатки, важные для транспорта протона и взаимодействия с амантадином, блокирующим канал M2, а именно, Val27, Ala30, Ser31 и Gly34, лежат на одной стороне α -спирали [13–15]. Мутации этих остатков с большей вероятностью будут влиять на транспорт протона через канал M2. Таким образом, препараты на основе аминокислотных остатков, включая амантадин и римантадин, в настоящее время не имеют широкого применения из-за устойчивости вируса к их связыванию и блокированию протонного канала в трансмембранном домене M2 вируса гриппа А [16–18]. В настоящей работе предложен новый класс антивирусных препаратов, эффективно взаимодействующих с ионным каналом белка M2 вируса гриппа А, – производные 1,4-диазобисцикло[2.2.2]октана (DABCO). Приведены результаты моделирования связывания и блокирования ионного канала M2, определена структура молекулы оптимального блокатора.

НОВЫЙ КЛАСС МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТОННОГО КАНАЛА M2

Белок M2 вируса гриппа А представляет собой тетрамер, состоящий из четырех α -спиралей, которые образуют молекулярный канал для транспорта ионов водорода H^+ через клеточную мембрану [17, 19–27].

Чтобы затруднить и ослабить переход ионов H^+ через ионный канал M2, этот канал должен быть заблокирован. Эффективно заблокировать (закрыть) канал M2 можно с помощью препарата, обладающего высоким сродством к внутренней поверхности канала M2. Один из классов молекул для адресного блокирования ионного канала M2 включает амантадин и римантадин (рис. 1а, б).

При нейтральных значениях pH аминогруппа этих молекул находится в ионизированной форме NH_3^+ , так как pK_a ионизации NH_2 -группы в NH_3^+ , составляет ~ 10.4 [28]. Свойства канала M2 изменяются в зависимости от величины pH. При $pH > 7$ канал M2 может находиться в двух состояниях – закрытом и открытом. В закрытом состоянии канала M2 остатки His37A, His37B, His37C и His37D находятся в нейтральной форме ($4H^0$). При $pH < 7$ открытое состояние ионного канала M2 представляет собой кислотно-активированную форму остатков гистидина с тетрапротонированным ($4H^+$) гистидиновым тетрамером [18, 29, 30]. Отметим, что внутри ионного канала M2 pK_a аминогруппы (NH_3^+) амантадина и римантадина может смещаться относительно pK_0 вследствие локального электростатического потенциала.

Ингибиторы ионного канала M2 нового класса основаны на молекуле DABCO (рис. 1в) [31–33]. DABCO и его производные могут быть эффективными ингибиторами переноса протона через ионный канал M2 по двум причинам: (1) вследствие стерического блокирования канала в результате связывания молекулы препарата, как в случае амантадина и римантадина; (2) за счет электростатического блокирования канала путем создания электростатического потенциального барьера для диффузии протона H^+ через канал M2, поскольку блокирующая молекула имеет положительный заряд (+2), распределенный по фрагменту DABCO.

МЕТОД МОДЕЛИРОВАНИЯ

Расчеты, описанные в работе, выполнены с помощью трех методов: (1) метода оптимизации потенциальной энергии и метода bioPASED при заданной температуре [34]; (2) метода глобального оптимального исчерпывающего молекулярного докинга молекулы лиганда на белок, hbDOCK [35]; (3) методов FAMBE и FAMBE-pH для расчета электростатической энергии, констант ионизации pK_a и степени ионизации аминокислотных остатков молекулы белка как функции pH среды [36–42]. Моделирование МД выполнено программным комплексом bioPASED [34] с использованием силового поля AMBER94 и AMBER-GAFF [43–45] и модели неявной среды – модели гауссовских оболочек [46].

Докинг низкомолекулярных ингибиторов на белок M2 (PDB код 2KAD) выполнен с помощью метода иерархического слепого докинга hbDOCK [35]. Метод hbDOCK выполняет: (1) поиск всех возможных сайтов связывания на поверхности молекулы белка, доступных молекуле лиганда; (2) отбор потенциальных сайтов связывания по рангу их качества; и (3) глобальную оптимизацию для определения позиции/ориентации лиганда, кон-

формации и энергии связывания методом МД симуляции отжига; (4) формирование списка позиций/ориентаций и значений энергии связывания в порядке убывания.

При встраивании в липидную мембрану белок M2 создает ионный канал, он окружен средой с диэлектрической проницаемостью, низкой по сравнению с диэлектрической проницаемостью воды ~80. Экспериментальные измерения показали, что диэлектрическая проницаемость липидной мембраны, т.е. среды вне молекулы белка M2, составляет ~30 [47]. Объемы молекулы белка M2 и ионных каналов рассматривают как объемы с диэлектрической проницаемостью, характерной для белков, $D_{IN} = 12-16$ [35, 39, 48–50].

СТРУКТУРА ПРОТОННОГО КАНАЛА БЕЛКА M2

Атомная структура ионного канала M2 в комплексе с амантадином, содержащая все атомы водорода, PDB код 2KAD [16–18], определенная методом ЯМР при температуре 243 К и pH 7.5, показана на рис. 2. Отметим, что ионный канал M2 образован четырьмя эквивалентными α -спиралями белка M2. Известны четыре структуры пустого канала M2 (PDB коды 2H95, 2L0J, 4QKL, 4QKM), полученные методами ЯМР и рентгеноструктурного анализа, табл. 1. Для наших исследований была выбрана структура PDB код 2KAD, полученная методом ЯМР [16–18], поскольку она включает все атомы водорода и, следовательно, полную информацию об ионизационном состоянии остатков гистидина и типе таутомера нейтрального состояния. Структуры белка M2 в кристаллическом состоянии, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа, как правило, не определяют атомы водорода и ионизационное состояние остатков гистидина.

Рассмотрим структуру белка M2 в деталях. Вход во внутренний объем ионного канала M2 формируется четырьмя остатками серина – Ser31A, Ser31B, Ser31C и Ser31D, которые контролируют диффузию ионов H^+ через канал. Диагональ квадрата, образованного атомом O γ Ser31A,

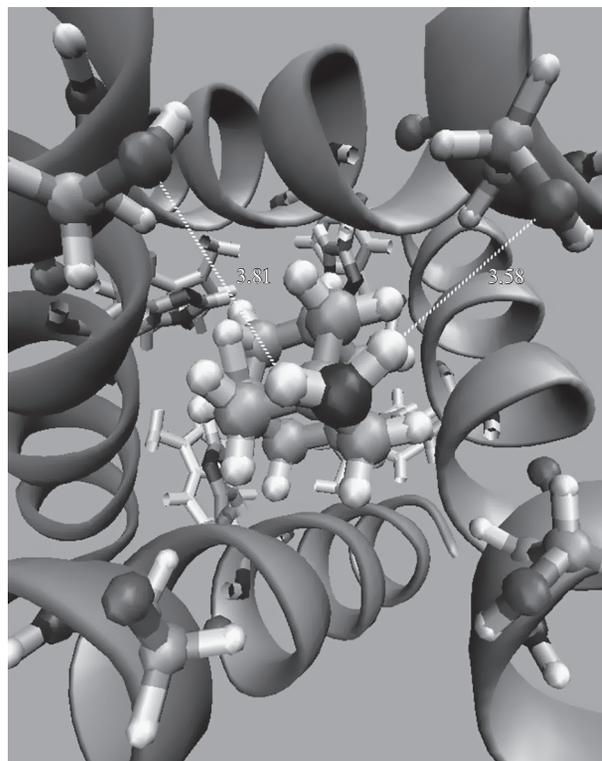


Рис. 2. Структура комплекса белка M2 с молекулой DABCO, связанной в ионном канале, метод ЯМР [16, 17] при $T = 243$ К, pH 7.5. Проекция вдоль оси канала, молекула DABCO в канале – *CPK* стиль; остатки Ser31A, Ser31B, Ser31C, Ser31D – *CPK* стиль, большие шары и толстые связи; остатки His37A, His37B, His37C, His37D – *bonds* стиль; остатки Trp 41A, Trp 41B, Trp 41C, Trp 41D – *bonds* стиль, белый цвет, задний план.

Ser31B, Ser31C и Ser31D, т.е. пары расстояний Ser31A–Ser31B и Ser31B–Ser31C и т.д., равны 6.2 Å. Аминогруппа (NH_2) амантадина в кристаллической структуре PDB 2KAD является нейтральной (pH 7.5) и образует слабые H-связи с O γ H- группой Ser31A и Ser31B, поскольку дистанция между атомами O γ и NH_2 амантадина ~4 Å (рис. 2). Отметим несколько особенностей структуры амантадина. (1) Связь C– NH_2 в молекуле

Таблица 1. Экспериментальные структуры белка M2, формирующего ионный канал

Код PDB	Год	Метод	Мутант	T, K	pH	и.с.о. ^а	а.к.о. ^б	м.к. ^в	мод. ^г
2H95	2006	NMR	wild	308	8.8	HE2	26-43	M2	1
2KAD	2008	NMR	wild	243	7.5	HE2	26-43	M2	1
2L0J	2010	NMR	wild	303	7.5	HIS ⁺ /HE2	22-63	M2	8
4QKL	2014	X-ray	wild	273	8.0	HE2	26-43	M2	1
4QKM	2014	X-ray	wild	273	5.5	HIS ⁺	26-43	M2	1

^а Ионизационное состояние остатков гистидина, HIS⁺, HE2 (или HIE), HD1 (или HID). ^б Аминокислотные остатки белка M2 в структуре. ^в Молекулярный комплекс. ^г Число моделей структуры, полученных методом ЯМР.

Таблица 2. Средняя заселенность ионизационных состояний остатков гистидина (His34A, His34B, His34C, His34D) белка M2

pH	HIS ⁺ ^a	HIЕ ^a	HID ^a
5.75	0.89 ^b (0.02) ^b	0.10 ^b (0.02) ^b	0.01 ^b (0.01) ^b
6.00	0.83 (0.03)	0.16 (0.02)	0.01 (0.01)
6.25	0.76 (0.03)	0.22 (0.02)	0.02 (0.01)
6.50	0.65 (0.04)	0.33 (0.03)	0.02 (0.01)
6.75	0.57 (0.04)	0.40 (0.03)	0.03 (0.01)
7.0	0.46 (0.04)	0.50 (0.030)	0.04 (0.01)
7.25	0.35 (0.03)	0.60 (0.02)	0.05 (0.02)
7.5	0.26 (0.03)	0.67 (0.02)	0.07 (0.02)
7.75	0.17 (0.02)	0.78 (0.02)	0.05 (0.02)
8.0	0.12 (0.01)	0.83 (0.02)	0.05 (0.02)
8.25	0.06 (0.01)	0.88 (0.02)	0.06 (0.02)

^a Ионизационное состояние остатка гистидина. ^b Средняя заселенность ионизационных состояний остатков гистидина. ^B Величина среднеквадратичных (RMSD) флуктуаций.

амантадина ориентирована вдоль оси ионного канала M2; (2) четыре остатка гистидина (His37A, His37B, His37C и His37D) лежат в одной плоскости, перпендикулярной к оси ионных каналов M2, как показано для экспериментальной ЯМР-структуры ионного канала M2 на рис. 2. Видно, что все четыре остатка – His37A, His37B, His37C и His37D – существуют в форме нейтральных таутомеров HE2 (HIЕ, как принято в структурном моделировании [36, 37]) в ЯМР-структуре 2KAD. Выход из канала M2 контролируется также и остатками триптофана (Trp41A, Trp41B, Trp41C и

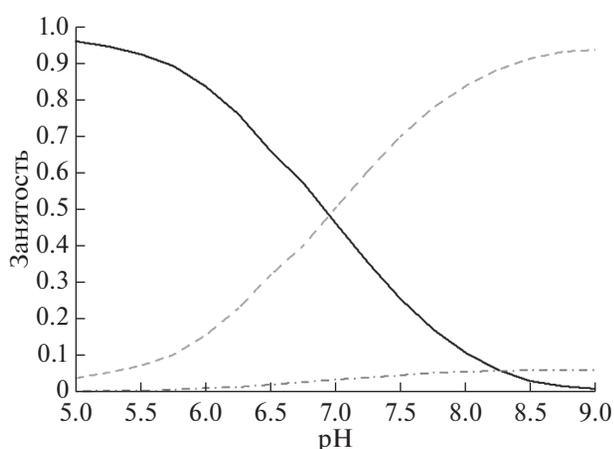


Рис. 3. Средняя занятость (окупация) ионизированного и нейтральных таутомерных состояний остатков His37A, His37B, His37C, His37D белка M2 при $T = 300$ К вдоль равновесной МД траектории 25 нс; черный – HIS⁺; серый штрих – таутомер HIЕ; штрих точка – таутомер HID.

Trp41D), которые блокируют проникновение молекулы воды в канал M2 в закрытом состоянии [18].

Структура и энергия оптимизированной структуры изолированного белка M2 получены путем удаления молекулы амантадина из ионного канала M2 (PDB 2KAD) с последующей оптимизацией трехмерной структуры методом имитации отжига (рис. 2). Температура оптимизируемой структуры медленно повышалась от 0 до 300 К в течение 1 нс, а затем релаксировалась в течение 1 нс при 300 К. Далее были получены равновесные продуктивные МД траектории длительностью 25 нс при постоянных значениях pH 7.5 с периодическим уточнением ионизационных состояний всех аминокислотных остатков молекулы белка [45]. Аналогичным образом выполнены расчеты ионизации остатков гистидина в интервале pH 5.75–8.25, в котором остатки гистидина переходят из ионизированной формы HIS⁺ в нейтральные таутомеры HIЕ и HID (табл. 2 и рис. 3).

Средняя потенциальная энергия белка M2 вдоль равновесной МД траектории в ионизированном и нейтральном состоянии четырех остатков гистидина приведена в табл. 3. Видно, что различие средних потенциальных энергий $\langle E_{\text{pot}} \rangle_{\text{MD}}$ белка M2 для ионизированного состояния HIS⁺ и нейтрального состояния HIЕ составляет ~6 ккал/моль. Средняя величина тепловых флуктуаций энергии таутомера HIЕ, оцененная по равновесной МД траектории длительностью 25 нс, равна ~12 ккал/моль (табл. 3). Заселенности заряженных и нейтральных состояний четырех остатков гистидина заметно флуктуируют вдоль МД траектории (рис. 4а, б). Однако средние значения долей заселенностей ионизированных и нейтральных форм His37A, His37B, His37C и His37D составляют 0.04–0.06 (табл. 4). Состояния ионизации остатков гистидина, т.е. ионизированный HIS⁺ и нейтральный таутомер HIЕ при pH 6.5, реализуются с сопоставимыми вероятностями 0.64 и 0.32 соответственно (табл. 4). Средняя потенциальная энергия $\langle E_{\text{pot}} \rangle_{\text{MD}}$ белка M2 с нейтральным таутомером HID значительно больше (на ~50 ккал/моль) по сравнению с энергиями состояний HIS⁺ и HIЕ остатков гистидина (табл. 3). Поэтому вероятность состояний HID мала ~0.02–0.04. Средние ионизационные состояния остатков гистидина, рассчитанные по равновесной МД траектории длительностью 25 нс при pH 6.5, представлены в табл. 4. Согласно табл. 4, остатки гистидина белка M2 находятся в ионизированном состоянии HIS⁺ со средней вероятностью ~0.64, тогда как нейтральный таутомер HIЕ встречается с вероятностью ~0.32, а нейтральный таутомер HID – с вероятностью ~0.04. Средняя структура нейтрального состояния ионного канала M2 незначительно отличается, в пределах амплитуды тепловых флуктуаций ~0.9 Å, от экс-

Таблица 3. Энергии молекулы белка M2 для ионизированного и нейтральных состояний остатков гистидина при pH 6.5 и $T = 300$ К

Состояние ионизации	$\langle E_{\text{pot}} \rangle_{\text{MD}}^{\text{a}}$	$\langle E_{\text{VDW}} \rangle_{\text{MD}}^{\text{б}}$	$\langle E_{\text{COL}} \rangle_{\text{MD}}^{\text{в}}$	$\langle E_{\text{Hbond}} \rangle_{\text{MD}}^{\text{г}}$	$\langle E_{\text{Solv}} \rangle_{\text{MD}}^{\text{д}}$
HIS ⁺	-1344.5 (15.2)	-423.7 (13.6)	-495.1 (6.6)	-331.2 (7.0)	-98.3 (7.1)
HIE	-1336.5 (12.1)	-416.8 (10.9)	-489.5 (4.2)	-323.2 (5.6)	-106.1 (8.3)
HID	-1289.7 (10.9)	-413.7 (9.3)	-477.2 (4.4)	-294.7 (5.5)	-133.2 (7.2)

^а Средняя потенциальная энергия вдоль равновесной МД траектории 25 нс, ккал/моль. ^б Энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий. ^в Электростатические взаимодействия. ^г Энергия водородных связей. ^д Энергия взаимодействия с окружающей средой.

периментальной структуры канала M2, 2KAD (рис. 2). Можно отметить, что среднеквадратичное отклонение (RMSD) положений атомов O γ остатков Ser31A, Ser31B, Ser31C, Ser31D структур канала M2 вдоль траектории МД не превышало 1.1 Å. Например, расстояния между атомами O γ остатков Ser31A/Ser31C и Ser31B/Ser31D колеблются в диапазоне 8.4–9.5 Å. Проход через ионные каналы M2 контролируется остатками His37A, His37B, His37C, His37D и характеризуется флуктуациями попарных расстояний между ближайшими атомами C ϵ_1 и N ϵ_2 в парах His37A–His37B, His37B–His37C, His37C–His37D, His37D–His37A в диапазоне 4.5–5.4 Å. Флуктуации значений pK $_a$ и вероятности встречаемости состояний HIS⁺, HIE всех остатков гистидина вдоль равновесной МД траектории длительностью 25 нс представлены в табл. 4. Величины долей ионизированных и нейтральных таутомеров гистидина имеют заметные флуктуации (рис. 4а, б), тогда как их средние значения практически равны (табл. 4). Зависимость средних долей фракций ионизационного и нейтральных состояний остатков гистидина от величины pH показана на рис. 3. Значения средней константы pK $_a$ остатков гистидина смещены на 0.3 единицы в сторону высоких значений pH, $\langle \text{pK}_a \rangle \sim 6.8$, (pK $_0$ 6.5) (табл. 4). Следовательно, остатки гистидина находятся в отрицательном электростатическом потенциале, который стабилизирует ионизированное состояние H⁺. Небольшая разность между энергиями заряженного HIS⁺ и нейтрального HIE состояний остатков гистидина (~8 ккал/моль), и значительные тепловые флуктуации энергий, ~15 и 12 ккал/моль, для состояний HIS⁺ и HIE (табл. 3) способствуют процессу переноса протона через “гистидиновый затвор”, т.е. через квартет His37A, His37B, His37C, His37D ионного канала M2.

близкий поперечному размеру молекул амантадина и римантадина (рис. 1а, б), известных как ингибиторы ионного канала белка M2 [16, 17]. Исчерпывающий докинг выполнен как для внешней молекулярной поверхности белка M2, так и для внутренней молекулярной поверхности ионного канала M2. На рис. 5а, б приведен ре-

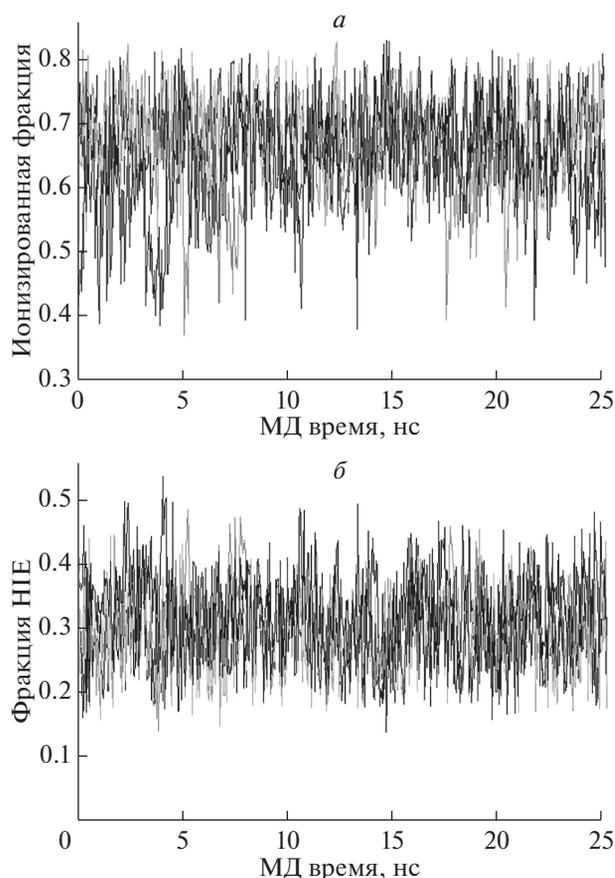


Рис. 4. Фракции (доли) остатков гистидина белка M2 вдоль равновесной МД траектории в 25 нс при pH 6.5, $T = 300$ К в различных ионизационных состояниях: ионизированная форма HIS⁺ (а); нейтральный таутомер HIE (б). Черный цвет – остатки His37A, темно-серый – His37B, серый – His37C, светло-серый – His37D.

ОСНОВНОЕ СОЕДИНЕНИЕ НОВОГО СЕМЕЙСТВА ИНГИБИТОРОВ ИОННОГО КАНАЛА M2

Молекула DAVCO (рис. 1в) практически равновелика в трех направлениях и имеет размер,

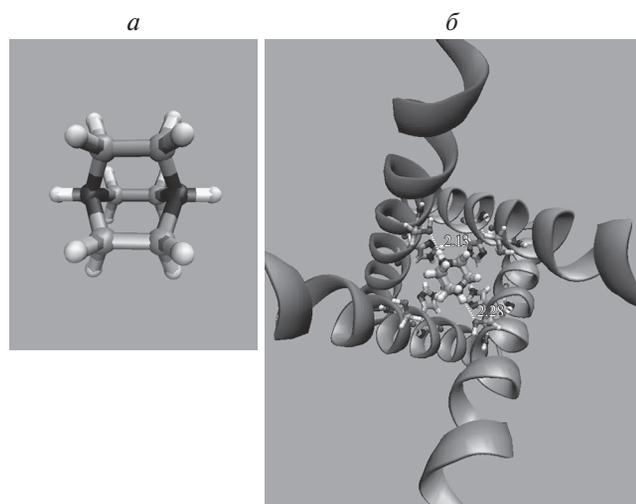


Рис. 5. Молекула DABCO (а) и молекула DABCO, связанная в канале M2 (б). Показаны водородные связи между атомами $H-N_1(N_2)$ и O_γ остатков Ser31A, Ser31B с длиной связи, 2.13 и 2.28 Å соответственно.

зультат докинга, т.е. оптимальная позиция и ориентация молекулы DABCO на молекуле белка M2. Эта структура показывает, что (1) ось между атомами N_1-N_2 молекулы DABCO перпендикулярна продольной оси канала M2; (2) образуются две практически идеальные водородные H -связи между атомами N_1, N_2 молекулы DABCO и атомом O_γ остатков Ser31A и Ser31B (или Ser31C и Ser31D) с геометрией триплетов атомов $O_\gamma(\text{Ser31A}) \cdots H-N_1$ и $O_\gamma\text{-Ser31B} \cdots H-N_2$, вовлеченных в образование H -связей, близких к оптимальной. Суммарная энергия H -связей двух экваториальных атомов азота N_1, N_2 молекулы DABCO с OH -группами двух остатков Ser31A, Ser31B составляет ~ 8 ккал/моль. В альтернативной эквивалентной ориентации молекула DABCO повернута на 90° вокруг центральной оси ионного канала M2, создавая две H -связи с Ser31C и Ser31D (рис. 5б). Две эквивалентные ориентации молекулы DABCO увеличивают свободную энергию связывания на величину $kT \times \ln 2 \sim 0.4$ ккал/моль.

Полная энергия связи и удельный вклад различных типов атом–атомных взаимодействий приведены в табл. 5. Видно, что главные вклады в энергию связывания вносят ван-дер-ваальсовы взаимодействия, H -связи и дегидратация молекулы лиганда. Молекула DABCO может связываться с внутренней поверхностью ионного канала M2, т.е. в канале (*IN*) и с молекулярной внешней поверхностью вне ионного канала (*OUT*) белка M2. Разность между оптимальными энергиями связывания *в канале* и *вне канала* равна энергии зазора, $E_{\text{GAP}} = E_{\text{IN}} - E_{\text{OUT}}$, определяет долю молекул блокатора, связанную в канале, пропорциональную величине $\exp(-E_{\text{GAP}}/kT)$, определяющей эффективность блокирования канала M2. Т.е. энергия зазора E_{GAP} является важным параметром эффективности блокирования ионного канала M2 и переноса протона по каналу. Из представленных в табл. 5 данных видно, что энергетическая щель E_{GAP} для DABCO равна 2.4 ккал/моль, а соответствующая свободная энергия связывания на 0.4 ккал/моль выше с учетом двух эквивалентных ориентаций молекулы DABCO в канале M2.

Фторпроизводные диазабициклооктана

Оптимизировать энергию связывания молекулы ингибитора ионного канала M2 можно путем модификаций, влияющих на ван-дер-ваальсовы взаимодействия препарата с внутренней поверхностью ионного канала M2. Это может быть достигнуто путем замены атомов водорода молекулы DABCO на атомы фтора, который имеет значительно большую энергию ван-дер-ваальсовых взаимодействий с ионным каналом M2. Нами рассмотрены три фторпроизводных исходной молекулы DABCO, а именно, тетрафтордиазабициклооктан (DABCOF4), октафтордиазабициклооктан (DABCOF8) и додекафтордиазабициклооктан (DABCOF12), которые содержат четыре, восемь и 12 атомов фтора (рис. 6а, в, д) соответственно. Оптимизированные комплексы F-производных, DABCOF4, DABCOF8 и DABCOF12, в ионном канале M2 показаны на рис. 6б, г, е. Фторпроизводные создают две сильные H -связи между атомами N_1/N_2 молекулы препа-

Таблица 4. Средние величины pK_a и фракций ионизированных и нейтральных таутомеров остатков гистидина белка M2 вдоль равновесной траектории в 25 нс при pH 6.5, $T = 300$ K

Остаток	HIS ⁺ ^а	HID ^а	HIE ^а	pK_a ^б
His37A	0.65 ^В (0.04) ^Г	0.03 ^В (0.01) ^Г	0.32 ^В (0.03) ^Г	6.80 ^В (0.14) ^Г
His37B	0.63 (0.06)	0.04 (0.02)	0.33 (0.03)	6.80 (0.09)
His37C	0.66 (0.03)	0.05 (0.01)	0.29 (0.02)	6.82 (0.16)
His37D	0.62 (0.05)	0.05 (0.03)	0.32 (0.04)	6.78 (0.18)
Среднее	0.64	0.04	0.32	6.80

^аТип ионизационного состояния. ^б pK_a . ^В Среднее значение. ^Г Величина RMSD флуктуаций.

Таблица 5. Энергии связывания производных диазабициклооктана в ионном канале и вне канала белка M2

Молекула	Тип связывания	ePL ^a	eVDW ^b	eCol ^b	eHb ^b	eSolv ^b	eGeo ^b
DABCO	В канале ^B	-9.0	-8.4	4.9	-9.2	-8.1	11.8
	Вне канала ^Г	-6.6	-4.2	3.1	-4.8	-11.4	10.7
	Щель {E _{in} -E _{out} } ^Д	-2.4					
	Номер в ряду эффективности ^е	3/4					
DABCOF4	В канале ^B	-24.3	-8.0	-6.1	-9.3	-13.0	12.1
	Вне канала ^Г	-24.2	-2.1	-11.0	-4.9	-18.4	12.2
	Щель {E _{in} -E _{out} } ^Д	-0.1					
	Номер в ряду эффективности ^е	6					
DABCOF8	В канале ^B	-41.9	-6.0	-21.5	-9.6	-18.4	13.6
	Вне канала ^Г	-47.1	1.6	-30.4	-5.0	-28.0	14.6
	Щель {E _{in} -E _{out} } ^Д	5.2					
	Номер в ряду эффективности ^е	7					
DABCOF12	В канале ^B	-59.3	-3.5	-42.4	-9.4	-20.7	16.8
	Вне канала ^Г	-65.7	3.7	-49.6	-4.9	-32.5	17.7
	Щель {E _{in} -E _{out} } ^Д	6.4					
	Номер в ряду эффективности ^е	8					
DABCOB	В канале ^B	-16.9	-15.3	1.6	-8.8	-7.5	13.1
	Вне канала ^Г	-13.8	-11.5	-0.6	-5.0	-9.2	12.4
	Щель {E _{in} -E _{out} } ^Д	-3.1					
	Номер в ряду эффективности ^е	1					
DABCOТ	В канале ^B	-16.6	-16.6	1.6	-8.3	-6.3	13.0
	Вне канала ^Г	-13.9	-16.7	0.8	-5.0	-7.0	14.0
	Щель {E _{in} -E _{out} } ^Д	-2.8					
	Номер в ряду эффективности ^е	2					
DABCON	В канале ^B	-20.5	-19.6	2.1	-7.8	-7.8	12.6
	Вне канала ^Г	-18.1	-13.3	-2.9	-4.9	-9.2	12.1
	Щель {E _{in} -E _{out} } ^Д	-2.4					
	Номер в ряду эффективности ^е	3/4					
DABCONM	В канале ^B	-17.1	-20.6	2.4	-7.2	-6.7	14.4
	Вне канала ^Г	-17.5	-19.3	2.3	-4.5	-10.1	
	Щель {E _{in} -E _{out} } ^Д	0.4				14.1	
	Номер в ряду эффективности ^е	5					

^a ePL – полная энергия связывания лиганда в ионном канале белка M2. ^b Энергии различных типов взаимодействий: eVDW – ван-дер-ваальсовы, eCoul – электростатические, eHb – водородные связи, eSolv – взаимодействие с окружающей средой, eGeo – энергия деформации оптимальной структуры лиганда, ккал/моль. ^B Оптимальная энергия связывания в канале M2. ^Г Максимальная энергия связывания вне канала M2. ^Д Величина щели Δ_{GAP} = E_{in} - E_{out} между энергиями связи *in* и *out* протонного канала M2. ^е Место в ряду эффективностей.

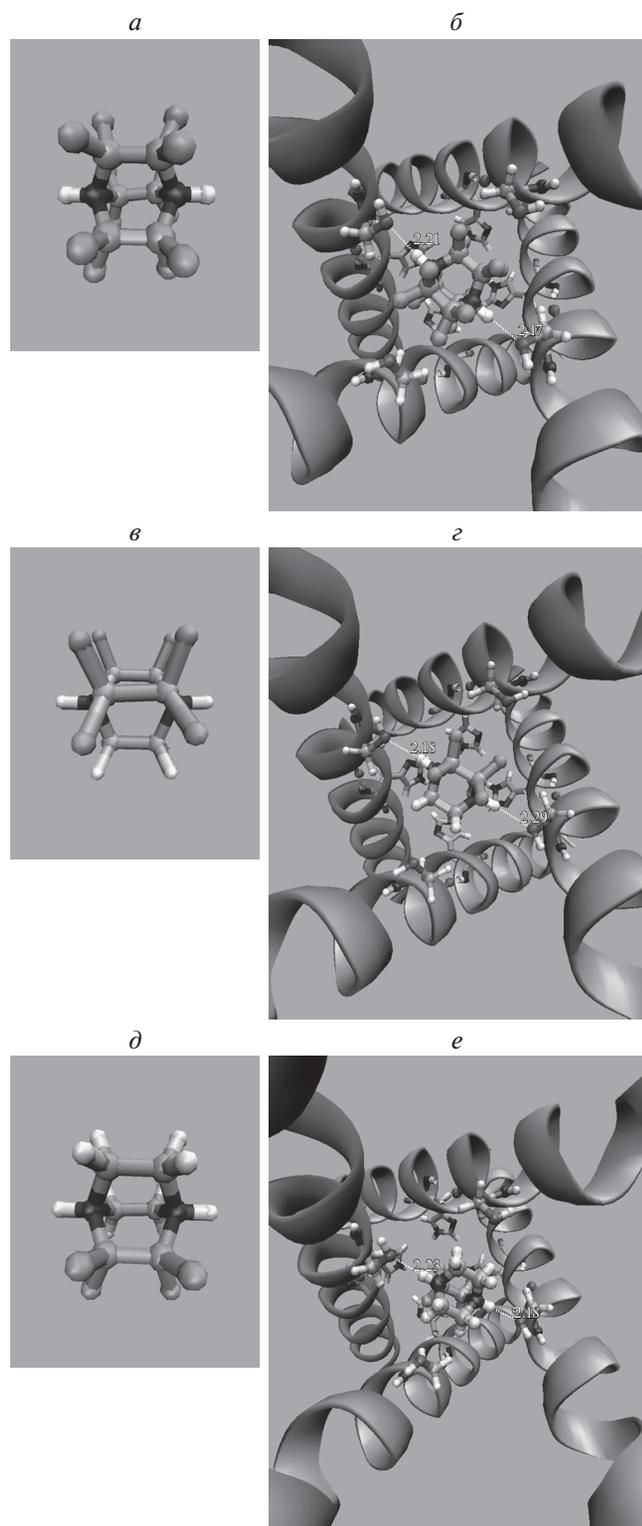


Рис. 6. Свободные молекулы DABCOF4 (а), DABCOF8 (с), DABCOF12 (д) и связанные в канале M2 (б, е, г). Показаны водородные связи между атомами H–N₁(N₂) DABCO и O_γ остатков Ser31A, Ser31B с длиной связи 2.23 и 2.18 Å (б, е) соответственно и 2.18 и 2.29 Å (г).

рата с атомом O_γ остатков Ser31A и Ser31B или Ser31C, Ser31D. Энергии связывания фторпроизводных DABCOF4, DABCOF8 и DABCOF12 с ионным каналом M2 приведены в табл. 5. Показано, что энергия связи в канале M2 значительно больше, чем у основного соединения DABCO. Однако энергия зазора между энергиями связывания в канале и вне канала M2, т.е. параметр $E_{\text{GAP}} \sim 0.1$ ккал/моль (табл. 5). Это свидетельствует о том, что у производных DABCOF4 доли связывания в канале и вне канала практически равны. Энергии зазора E_{GAP} являются положительными, $\sim 5\text{--}6$ ккал/моль у производных DABCOF8 и DABCOF12 (табл. 5), т.е. связывание вне канала это основной тип, а внутри канала M2 оно достаточно мало. Таким образом, несмотря на большую энергию связывания в канале M2 энергии связывания F-производных вне канала сопоставимы или заметно больше. Преимущественное связывание вне канала обусловлено большой энергией гидратации F-производных – DABCOF4, DABCOF8 и DABCOF12, следовательно, дегидратация F-производных при внутриканальном связывании крайне невыгодна.

Полициклические производные диазабициклооктана

Полициклические производные DABCO – диазабициклооктанбензол (DABCOB) (рис. 7а) и диазабициклооктантолуол (DABCOT) (рис. 7б) соответственно. Молекула DABCOT получена заменой экваториальных атомов водорода во фрагменте бензола в молекуле DABCOB на метильные группы (CH₃). Более высокомолекулярные производные – это диазабициклооктаннафталин (DABCON) (рис. 8а), и молекула диазабициклооктанметилнафталина (DABCONM) (рис. 8б), полученная заменой экваториальных атомов водорода на метильные группы (CH₃) во фрагменте нафталина.

Конструирование молекул ингибиторов с использованием жесткого полициклического фрагмента более предпочтительно, чем с использованием гибкого фрагмента за счет меньшей потери конформационной энтропии при ограничении конформационной подвижности молекулы препарата при связывании внутри ионного канала M2. Результаты докинга бициклических и трициклических производных DABCO на белок M2 показаны на рис. 7б, г и рис. 8б, г. Молекулы ингибиторов DABCOB, DABCOT, DABCON и DABCONM, связанные в канале M2, стабилизированы водородными связями между атомами H–N₁(N₂) и O_γ остатков Ser31A, Ser31B с длиной связи в пределах 2.1–2.6 Å. Энергии связывания бициклических и трициклических производных DABCO с ионным каналом M2 представлены в табл. 5. Вид-

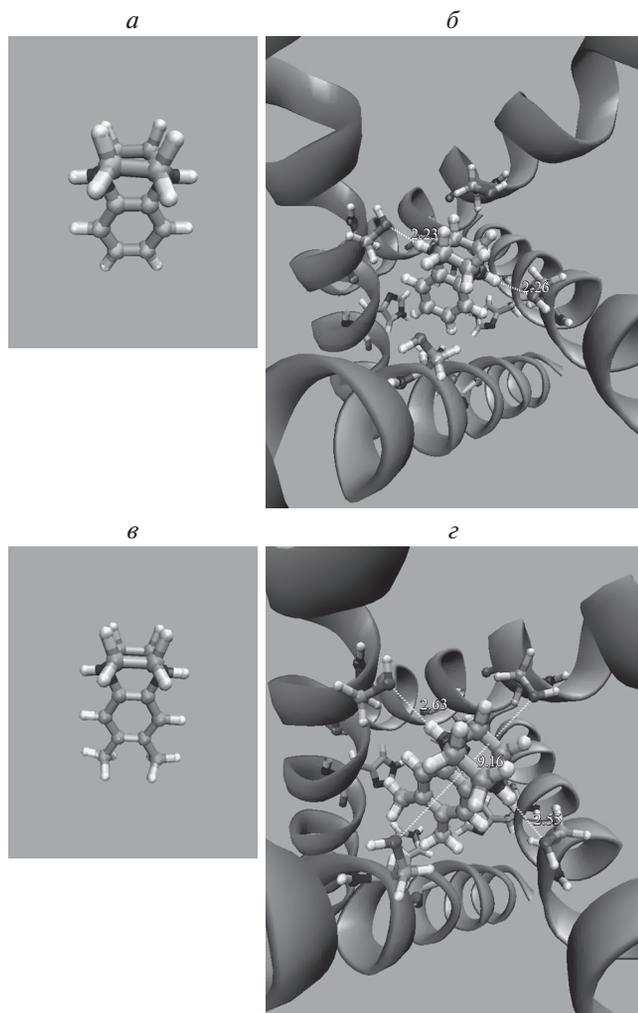


Рис. 7. Свободные формы DAVCOB и DAVCOT (а, в) и оптимальная позиция этих производных, связанных в канале M2 (б, г).

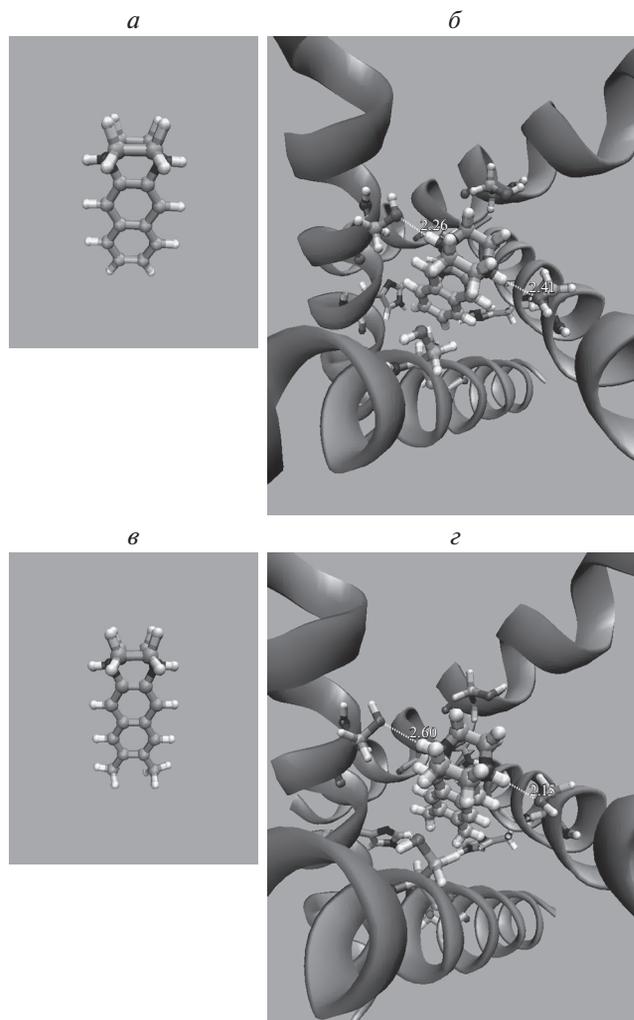


Рис. 8. Свободная форма DAVCON и DAVCONM (а, в) и оптимальная позиция этих молекул, связанных в канале M2 (б и г).

но, что бициклические производные DAVCOB и DAVCOT имеют энергию связи на ~7 ккал/моль больше энергии связывания ведущего соединения DAVCO.

Трициклические производные DAVCON и DAVCONM демонстрируют дальнейшее увеличение энергии связывания с ионным каналом M2 на ~3.5 ккал/моль по сравнению с бициклическими производными DAVCOB и DAVCOBM (табл. 5). Тем не менее, замещение двух периферических атомов водорода в трициклическом производном DAVCON на метильные группы CH₃ с образованием молекулы DAVCONM не приводит к дальнейшему увеличению энергии связывания. Самая большая молекула DAVCONM характеризуется ослаблением ван-дер-ваальсовых взаимодействий с ионным каналом M2 по сравнению с молекулой DAVCON (на ~3 ккал/моль, табл. 5).

Можно сделать вывод, что наиболее эффективным блокатром ионного канала M2 является молекула DAVCOB (табл. 5), энергия связывания которой с ионным каналом M2 больше ~16.9 ккал/моль, тогда как энергия связывания ведущего соединения DAVCO составляет ~9.0 ккал/моль. Разность энергий связывания в канале и вне канала у DAVCOB равна ~3.1 ккал/моль, т.е. она на 0.7 ккал/моль больше энергии связывания ведущего соединения DAVCO (табл. 5). Отношение фракций молекул DAVCOB, связанных вне (C_{out}) и внутри канала (C_{in}), достаточно мало, а именно, C_{out}/C_{in} , составляет ~0.01, т.е. эта молекула является эффективным блокатром ионного канала M2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Блокирование ионного канала M2 вируса гриппа А путем связывания внутри канала моле-

кулы производного DABCO представляется разумной стратегией ингибирования переноса протона H^+ через ионный канал M2 и деактивации вируса гриппа А. Рассмотрены семь структур молекул блокаторов, производных DABCO, и детально исследовано их связывание с белком M2. Показано, что наилучшее блокирование ионного канала обеспечивает молекула DABCOV. Энергия связывания молекулы DABCOV в канале M2 достаточно высока ~ 16.9 ккал/моль. Разность энергий связывания вне и внутри канала M2 более 3 ккал/моль. Заметная разность энергий связывания вне и внутри ионного канала M2 обеспечивает преимущественное связывание внутри канала, так что отношение фракций молекул, связанных вне и внутри канала, составляет ~ 0.01 , т.е. молекулы препарата будут связаны внутри канала M2 и будут блокировать транспорт протона H^+ .

Вторая важная особенность DABCO и его производных – положительный заряд +2, локализованный на атомах азота. Этот заряд создает положительный электростатический потенциальный барьер, оцениваемый величиной $\sim 3-4$ ккал/моль, для диффузии протонов H^+ через канал M2. Такой положительный электростатический потенциальный барьер отсутствует или незначителен у амантадина и римантадина как в нейтральном состоянии, при высоких значениях $pH > 7$, так и в заряженном состоянии при низких значениях pH . Нейтральность амантадина и римантадина доказана методом ЯМР при температуре 243 К и $pH 7.5$ [16, 17]. Сочетание стерических и электростатических потенциальных барьеров представляет собой дополнительный фактор повышения эффективности блокирования транспорта ионов H^+ через ионный канал M2 при внутриканальном связывании молекулы DABCOV.

Автор выражает глубокую признательность Федоровой О.С. за интерес к работе.

Исследования выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-04-00005-а) и Минобрнауки РФ (№ 0309-2019-0001).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований, выполненных с использованием биологических материалов.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- World Health Organization. Influenza. [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- Stouffer A.L., Acharya R., Salom D., Levine A.S., Costanzo L.D., Soto C.S., Tereshko V., Nanda V., Stayrook S., DeGrado W.F. (2008) Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature*. **451**, 596–599. <https://doi.org/10.1038/nature06528>
- Hu F., Luo W., Hong M. (2010) Mechanisms of proton conduction and gating in influenza M2 proton channels from solid-state NMR. *Science*. **330**(6003), 505–508. <https://doi.org/10.1126/science.1191714>
- Wanka L., Iqbal K., Peter R., Schreiner P.R. (2013) The lipophilic bullet hits the targets: medicinal chemistry of adamantane derivatives. *Chem. Rev.* **113**, 3516–3604. <https://doi.org/10.1021/cr100264t>
- Moffat J.S., Vijayvergiya V., Gao P.F., Cross T.A., Woodbury D.J., Busath D.D. (2008) Proton transport through influenza A virus M2 protein reconstituted in vesicles. *Biophys. J.* **94**, 434–445. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.109082>
- Hari Z.S., Moorthy N., Poongavanam V., Pratheepa V. (2014) Viral M2 ion channel protein: a promising target for anti-influenza drug discovery. *Mini-Rev. Med. Chem.* **14**(10), 819–830. <https://doi.org/10.2174/138955751410141020150822>
- Olsen R.W. (2006) Picrotoxin-like channel blockers of GABA_A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 6081–6082. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601121103
- Thomaston J.L., Polizzi N.F., Konstantinidi A., Wang J., Kolocouris A., DeGrado W.F. (2018) Inhibitors of the M2 proton channel engage and disrupt transmembrane networks of hydrogen-bonded waters. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 15219–15226. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b06741>
- Mustafa M., Henderson D.J., Busath D.D. (2009) Free-energy profiles for ions in the influenza M2-TMD channel. *Proteins*. **76**, 794–807. <https://doi.org/10.1002/prot.22376>
- Homeyer N., Ioannidis H., Kolarov F., Gauglitz G., Zikos C., Kolocouris A., Gohlke H. (2016) Interpreting thermodynamic profiles of aminoadamantane compounds inhibiting the M2 proton channel of influenza A by free energy calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **56**, 110–126. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00467>
- Nishimura K., Kim S., Zhang L., Cross T.A. (2002) The closed state of a H^+ channel helical bundle combining precise orientational and distance restraints from solid state NMR. *Biochemistry*. **41**, 13170–13177. <https://doi.org/10.1021/bi0262799>
- Cady S.D., Hong M. (2008) Amantadine-induced conformational and dynamical changes of the influenza M2 transmembrane proton channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 1483–1488. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711500105>
- Holsinger L.J., Nichani D., Pinto L.H., Lamb R.A. (1994) Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. *J. Virol.* **68**, 1551–1563. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7508997>
- Wang J., Kim S., Kovacs F., Cross T.A. (2001) Structure of the trans membrane region of the M2 protein H^+ channel. *Protein Sci.* **10**, 2241–2250. <http://www.protein-science.org/cgi/doi/10.1101/ps.17901>
- Sakai Y., Kawaguchi A., Nagata K., Hirokawa H. (2018) Analysis by metadynamics simulation of binding pathway of influenza virus M2 chan. *Microbiol. Immunol.*

- mol.* **62**, 34–43.
<https://doi.org/10.1111/1348-0421.12561nelblockers>
16. Cady S.D., Mishanina T.V., Hong M. (2009) Structure of amantadine-bound M2 transmembrane peptide of influenza A in lipid bilayers from magic-angle-spinning solid-state NMR: the role of Ser31 in amantadine binding. *J. Mol. Biol.* **385**, 1127–1141.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.022>
 17. Cady S.D., Schmidt-Rohr K., Wang J., Soto C.S., DeGrado W.F., Hong M. (2010) Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature*. **463**, 689–692.
<https://doi.org/10.1038/nature08722>
 18. Intharathep P., Laohpongspaisan C., Rungrotmongkol T., Loisuangsin A., Malaisree M., Decha P., Aruksakunwong O., Chuenpenit K., Kaiyawet N., Sompornpisut P., Pianwanit S., Hannongbu S. (2008) How amantadine and rimantadine inhibit proton transport in the M2 protein channel. *J. Mol. Graphics Modelling*. **27**, 342–348.
<https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2008.06.002>
 19. Mould J.A., Li H.C., Dudlak C.S., Lear J.D., Pekosz A., Lamb R.A., Pinto L.H. (2000) Mechanism for proton conduction of the M2 ion channel of influenza A virus. *J. Biol. Chem.* **275**, 8592–8599.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8592>
 20. Schnell J.R., Chou J.J. (2008) Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature*. **451**, 591–595.
<https://doi.org/10.1038/nature06531>
 21. Acharya R., Carnevale V., Fiorin G., Levine B.G., Polishchuk A.L., Balannik V., Samish I., Lamb R.A., Pinto L.H., DeGrado W.F., Klein M.L. (2010) Structure and mechanism of proton transport through the transmembrane tetrameric M2 protein bundle of the influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 15075–15080.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007071107>
 22. Roux B., Schulten K. (2004) Computational studies of membrane channels. *Structure*. **12**, 1343–1351.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2004.06.013>
 23. Thomaston J.L., Alfonso-Prieto M., Woldeyes R.A., Fraser J.S., Klein M.L., Fiorin G., DeGrado W.F. (2015) High-resolution structures of the M2 channel from influenza A virus reveal dynamic pathways for proton stabilization and transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, 14260–14265.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1518493112>
 24. Hong M., DeGrado W.F. (2012) Structural basis for proton conduction and inhibition by the influenza M2 protein. *Protein Sci.* **21**, 1620–1633.
<https://doi.org/10.1002/pro.2158>
 25. Hu F., Schmidt-Rohr K., Hong M. (2012) NMR detection of pH-dependent histidine water proton exchange reveals the conduction mechanism of a transmembrane proton channel. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 3703–3713.
<https://doi.org/10.1021/ja2081185>
 26. Chen H., Wu Y., Voth G.A. (2007) Proton transport behavior through the influenza A M2 channel: Insights from molecular simulation. *Biophys. J.* **93**, 3470–3479.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.105742>
 27. Acharya R., Carnevale V., Fiorin G., Levine B.G., Polishchuk A.L., Balannik V., Samish I., Lamb R.A., Pinto L.H., DeGrado W.F., Klein M.L. (2010) Structure and mechanism of proton transport through the transmembrane tetrameric M2 protein bundle of the influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 15075–15080.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007071107>
 28. Du Q.-S., Wang S.-Q., Chen D., Meng J.-Z., Huang R.-B. (2014) In depth analysis on the binding sites of adamantane derivatives in HCV (Hepatitis C Virus) p7 channel based on the NMR structure. *PLoS One*. **9**(4), e93613.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093613>
 29. Smondyrev A.M., Voth G.A. (2002) Molecular dynamics simulation of proton transport through the influenza A virus M2 channel. *Biophys. J.* **83**, 1987–1996.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73960-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73960-X)
 30. Chen H., Wu Y., Voth G.A. (2007) Proton transport behavior through the influenza A M2 channel: insights from molecular simulation. *Biophys. J.* **93**, 3470–3479.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.105742>
 31. Baghernejad B. (2010) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) as a useful catalyst in organic synthesis. *Eur. J. Chem.* **1**, 54–60.
<https://doi.org/10.5155/eurjchem.1.1.54-60.2>
 32. Cecchi L., DeSarlo F., Machetti F. (2006) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) as an efficient reagent for the synthesis of isoxazole derivatives from primary nitro compounds and dipolarophiles: the role of the base. *Eur. J. Organic Chem.* **21**, 4852–4860.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.200600475>
 33. Zhang K., Drummey K.J., Moon N.G., Chiang W.D., Long T.E. (2016) Styrenic DABCO salt-containing monomers for the synthesis of novel charged polymers. *Polymer Chem.* **7**, 3370–3374.
<https://doi.org/10.1039/C6PY00426A>
 34. Попов А.В., Воробьев Ю.Н. (2010) Программа GUI-БиОPASED для моделирования молекулярной динамики биополимеров с графическим пользовательским интерфейсом. *Молекуляр. биология*. **44**(4), 735–742.
 35. Vorobjev Y.N. (2010) Blind docking method combining search of low-resolution binding sites with ligand pose refinement by molecular dynamics-based global optimization. *J. Comput. Chem.* **31**, 1080–1092.
<http://bison.niboch.nsc.ru/index.html>
 36. Vorobjev Y.N., Hermans J. (1997) SIMS, computation of a smooth invariant molecular surface. *Biophys. J.* **73**, 722–732.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78105-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78105-0)
 37. Vorobjev Y.N., Scheraga H.A. (1997) A fast adaptive multigrid boundary element method for macromolecular electrostatic computations in a solvent. *J. Comput. Chem.* **18**, 569–583.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199703\)18:4<569::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199703)18:4<569::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
 38. Vorobjev Y.N., Almagro, J.C., Hermans J. (1998) Discrimination between native and intentionally misfolded conformations of proteins: ES/IS, a new method for calculating conformational free energy that uses both dynamics simulations with an explicit solvent and an implicit solvent continuum model. *Proteins*. **32**, 399–413.

- [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980901\)32:4<399::AID-PROT1>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980901)32:4<399::AID-PROT1>3.0.CO;2-C)
39. Vorobjev Y.N., Vila J.A., Scheraga H.A. (2008) FAM-BEPH: A fast and accurate method to compute the total solvation free energies of proteins. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 11122–11136.
<https://doi.org/10.1021/jp709969n>
 40. Vorobjev Y.N. (2011) Advances in implicit models of water solvent to compute conformational free energy and molecular dynamics of proteins a constant pH. *Adv. Protein Chem. Structural Biol.* **85**, 281–322.
<https://doi.org/10.1002/jcc.22909>
 41. Vorobjev Y.N. (2012) Potential of mean force of water-proton bath and molecular dynamic simulation of proteins at constant pH. *J. Comput. Chem.* **33**, 832–842.
<https://doi.org/10.1002/jcc.22909>
 42. Vorobjev Y.N., Scheraga H.A., Vila J.A. (2018) Coupled molecular dynamics and continuum electrostatic method to compute the ionization pKa's of proteins as a function of pH. Test on a large set of proteins. *J. Biomol. Struct. Dynamics* **36**, 563–574.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1288169>
 43. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. (1995) A second generation for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179–5197.
<https://doi.org/10.1021/ja00124a002>
 44. Wang J., Cieplak P., Kollman P.A. (2000) How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **21**, 1049–1074.
[https://doi.org/10.1002/1096-987X\(200009\)21:12%3C1049::AID-JCC3%3E3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1096-987X(200009)21:12%3C1049::AID-JCC3%3E3.0.CO;2-F)
 45. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. (2004) Development and testing of a general amber force fields. *J. Comput. Chem.* **25**, 1157–1174.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20035>
 46. Lazaridis T., Karplus M. (1999) Effective energy function for proteins in solution. *PROTEINS: Structure, Function, Genetics.* **35**, 133–152.
 47. Mostafa M.F., Youssef A.A.A. (2001) Dielectric permittivity and ac conductivity investigation for the new model lipid bilayer material: (CH₂)₁₀ (NH₃)₂CdCl₄ Z. *Naturforsch.* **56a**, 568–578.
<https://doi.org/10.1515/zna-2001-0806>
 48. Isom D.G., Castaneda C.A., Cannon B.R. (2011) Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 5260–5265.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1010750108>
 49. Li C., Li L., Zhang J., Alexov E. (2012) Highly efficient and exact method for parallelization of grid-based algorithms and its implementation in DelPhi. *J. Comput. Chem.* **33**, 1960–1966.
<https://doi.org/10.1002/jcc.23033>
 50. Li L., Li C., Zhang Z., Alexov E. (2013) On the dielectric “Constant” of proteins: smooth dielectric function for macromolecular modeling and its implementation in DelPhi. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 2126–2136.
<https://doi.org/10.1021/ct400065j>

DESIGN OF AN EFFECTIVE M2 ION CHANNEL INHIBITOR

Y. N. Vorobjev^{1,2,*}

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

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

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

Influenza A virus is capable of rapid infecting large human populations. Because of that, development of novel drugs capable of effective inhibiting of virus replication is warranted. Known anti-influenza drugs amantadine and rimantadine have a weak effect on the influenza A virus. Here we describe a new class of positively charged molecules to block H⁺ proton diffusion through the M2 ion channel of influenza A. Eight drug derivatives of leading compound diazabicyclooctane were investigated by molecular dynamics simulation, a study of ionization states and evaluation of their binding efficiency to the M2 ion channel. Here we present optimal structure of effective blocker of the proton channel of M2 protein. An important advantage of the new molecule over well-known amantadine and rimantadine is its positive charge, +2, which < in addition to steric barrier, creates an electrostatic potential barrier for the proton diffusion transport through the ion channel M2.

Keywords: influenza A, M2 ion channel inhibitors, molecular dynamics, ionization, ligand binding