

АНОТАЦІЯ

Логачова К. О. Молекулярний дизайн та комп'ютерне моделювання нових інгібіторів коронавірусу SARS-CoV-2. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата наук (доктора філософії) за спеціальністю 102 Хімія (Галузь знає 10 Природничі науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2025.

Коронавірусна хвороба (COVID-19), що викликана вірусом SARS-CoV-2, призвела до стрімкого поширення захворювання та пандемії на початку 2020 року. Серйозні виклики, що спричинила пандемія COVID-19, виявили відсутність ефективних ліків та активізували пошук нових антивірусних препаратів. Широкомасштабні міжнародні дослідження дозволили встановити ключові параметри у послідовності біохімічних процесів життєдіяльності вірусу SARS-CoV-2, що відкриває можливості виділити ключові ланки для вибору біологічних молекул-мішеней.

Наукова література містить відомості про геномну послідовність та тривимірну кристалічну структуру ключових протеаз коронавірусу, таких як головна (M^{pro}) та папаїноподібна (PL^{pro}) протеази. Протеаза M^{pro} має каталітичну діаду з амінокислотних залишків His41-Cys145, розташовану у кишені для розпізнавання молекули-субстрату. Структура цієї кишені є дуже консервативною серед усіх коронавірусів, тому вона є перспективним кандидатом-мішенню для розробки нових інгібіторів та лікарських засобів широкого спектру. Іншим кандидатом є папаїноподібна протеаза PL^{pro} , яка є ключовим ферментом для реплікації вірусу, відповідальним за обробку неструктурних білків Nsp1, Nsp2 і Nsp3 шляхом розщеплення N-кінця реплікативного поліпротеїну. Інгібіювання протеази PL^{pro} може відбуватися як прямим інгібіюванням активний центр ферменту, так і альтернативним

механізмом алостеричного інгібіювання, що передбачає вплив молекули ліганду на інші регуляторні ділянки білка.

Загальною метою дисертаційної роботи є молекулярний дизайн, рецептор-орієнтований пошук, комп'ютерне моделювання, молекулярний докінг та 3D-фармакофорний скринінг нових інгібіторів протеаз M^{pro} та PL^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2, створення віртуальних бібліотек нових сполук, структурна оптимізація молекул-хітів та *in silico* оцінка їх інгібуючої активності. Молекулярно-динамічне моделювання будови та структурно-динамічних властивостей комплексів молекул-лідерів з ключовими протеазами вірусу SARSCoV-2" є основою для оцінки стабільності комплексів у фізіологічних умовах.

Об'єктами дослідження є взаємодія ліганд-рецептор, комп'ютерні моделі ліганд-рецептор, структурно-енергетичні характеристики лігандів, 3D моделі білків-рецепторів протеаз M^{pro} та PL^{pro}, молекулярно-динамічні моделі, фармакофорні моделі для оцінювання ліганд-рецепторного зв'язування.

Предметом дослідження є молекулярний дизайн, докінг та віртуальний скринінг нових молекул-інгібіторів вірусних протеаз M^{pro} та PL^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2.

Дослідження ґрунтується на комплексному використанні декількох комп'ютерних методів, які дозволяють виконати теоретичне конструювання нових скафолдів та прогнозування фізико-хімічних та фармако-кінетичних властивостей нових органічних лігандів - інгібіторів головної протеази M^{pro} та папаїно-подібної протеази PL^{pro} вірусу SARS-CoV-2. Використання молекулярного докінгу дає можливість виявити молекули-лідери з антикоронавірусною активністю та дозволяє порівняти теоретичні результати з існуючими моделями та експериментальними даними щодо відомих сполук з високою спорідненістю до зв'язування з активним центром ключових протеаз вірусу. Таким чином, результати теоретичних дослідження є підґрунтям для синтезу нових низькомолекулярних сполук, які скеровані на створення потенційних інгібіторів зазначених ферментів.

Перший розділ присвячений критичному аналізу сучасної науково-технічної та методичної літератури стосовно поточного стану щодо захворювання на COVID-19 та актуальних тенденції поширення нових штамів SARS-CoV-2, який показав необхідність розробки інноваційних лікарських засобів від COVID-19, що зумовлена значним ступенем антигенної еволюції вірусу. Обґрунтовано вибір протеаз M^{pro} та PL^{pro} SARS-COV-2, як консервативних мішеней для фармакологічного впливу на коронавірус та доведено, що конструювання нековалентних інгібіторів є перспективним напрямком розробки противірусних препаратів.

Другий розділ містить опис розрахункових методик, параметрів моделювання та програмних пакетів.

У третьому розділі представлені результати рецептор-орієнтованого пошуку та комп'ютерного дизайну нових інгібіторів протеази M^{pro} з метою ідентифікації нових аналогів нірматрелвіру, які мають кращі структурно-енергетичні характеристики зв'язування з активним центром рецептора M^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2. Основними результатами цієї частини роботи є створення нової віртуальної бібліотеки лігандів, що містить 1866 аналогів нірматрелвіру. Побудова бібліотеки виконувалась за допомогою еволюційного алгоритму, які включали послідовні структурні модифікації до 100 поколінь, з використанням семи фізико-хімічних та структурних критеріїв придатності, таких як молекулярна маса (M_w), cLogP, площа полярної поверхні, структурна схожість з батьківським скаффолдом, конформаційна схожість лігандів, молекулярна гнучкість та кількість торсійних кутів, об'єм молекули. Структурна оптимізація отриманої бібліотеки та її скринінг на основі 3D-фармакофорної моделі вихідного нірматрелвіру, дозволили зменшити хімічний простір бібліотеки та відібрати 32 молекули-лідери. Наступне структурно-енергетичне ранжування відібраних кандидатів з використання молекулярного докінгу та двох різних PCA структур протеази M^{pro} (PDB: 7VH8, 7MHK) дозволило ідентифікувати вісім аналогів нірматрелвіру з вищою афінністю зв'язування, ніж вихідний нірматрелвір. Вперше показано, що основні структурні модифікації, які

посилюють загальний інгібуючий ефект нових аналогів, локалізовані в азабіцикло[3.1.0]-гексановому та 2-окспіролідіновому фрагментах. Запропоновано покроковий алгоритм раціонального дизайну нових противірусних нековалентних інгібіторів на основі схвалених препаратів, який є перспективним для розробки нових потенційних фармацевтичних інгредієнтів для лікування COVID-19.

Четвертий розділ містить результати рецепторно-орієнтованого пошуку нових аналогів енсїтрелвіру, який є нековалентним, непептидним інгібітором головної протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2. Цей інгібітор показав високу противірусну активність проти різних штамів коронавірусу *in vitro* та має сприятливі профілі метаболізму і фармакокінетики, що дозволило його використання для перорального застосування. Враховуючи вищевказане, розробка нових аналогів енсїтрелвіру має велике наукове-практичне значення. Молекулярний дизайн та розробка аналогів енсїтрелвіру виконувались з використанням еволюційної структурної оптимізації його початкового скаффолду. На першому етапі, на основі десяти критеріїв придатності, зокрема коефіцієнтів структурної та конформаційної подібності, молекулярної маси (M_w), cLogP, площі полярної поверхні, молекулярної гнучкості, молекулярної форма, кількості Н-донорів та Н-акцепторів, кількість обертальних зв'язків, створено віртуальну еволюційну бібліотеку, що містила 6334 нових аналогів. 3D фармакоформний скринінг еволюційної бібліотеки аналогів енсїтрелвіру з використанням моделі, створеної на основі рентгеноструктурних даних комплексу енсїтрелвір-M^{pro} (PDB 8HEF) дозволив зменшити її до 41 кандидата. Розрахунки молекулярного докінгу дозволили ранжувати відібрані кандидати за їхньою спорідненістю зв'язування та селективністю до рецептора M^{pro} та дозволили ідентифікувати десять аналогів енсїтрелвіру, які мають кращу спорідненість до протеази M^{pro} порівняно з оригінальним ієнсїтрелвіром. Результати структурної еволюційної оптимізації показали, що основні структурні модифікації, які підвищують загальний противірусний ефект

енсітрелвіру, локалізовані у фрагментах 1-метил-1Н-1,2,4-тріазолу та 6-хлоро-2-метил-2Н-індазолу.

П'ятий розділ присвячено розробці, аналізу та тестуванню емпіричних силових полів для молекулярно-динамічного моделювання головної (M^{pro}) та папаїноподібної протеази (PL^{pro}) коронавірусу SARS-CoV-2 та їхніх комплексів з лігандами у водному розчині та за фізіологічних умов, що є важливим етапом при комп'ютерному дизайні ліків. З метою встановлення оптимальних умов та вибору параметризації був проведений порівняльний аналіз популярних силових полів (OPLS-AA, CHARMM27, CHARMM36 і AMBER03) на предмет кількісної оцінки їхньої здатності відтворювати нативну структуру протеаз M^{pro} та PL^{pro} у водному середовищі за фізіологічних умов. Основні результати розділу показують, що серед шести силових полів, OPLS-AA, CHARMM27, CHARMM36, AMBER03, AMBER14SB and GROMOS G54A7 та чотирьох емпіричних параметрів моделей водного розчину (SPC, TIP3P, TIP4P, TIP5P) кращу узгодженість з експериментальними даними щодо нативного фолдингу протеази M^{pro} показують моделі CHARMM27/TIP3P та OPLS-AA/TIP4P. Показано, що нативний фолдинг протеази M^{pro} добре відтворюється моделлю OPLS-AA/TIP4P у водному розчині за фізіологічних умов, в присутність 100 mM NaCl та температурі 310 K, що є важливим для моделювання високополярних та заряджених лігандів. Модель OPLS-AA/TIP4P також показала добру відтворюваність нативного фолдингу протеази M^{pro} у димерній формі, що дозволило рекомендувати її, як основну для швидкого комп'ютерного скринінгу та моделювання стабільності комплексів ліганд-протеаза у водному розчині. В другій частині розділу проведений відтворюється аналіз параметрів та умов МД моделювання протеази PL^{pro} . Використовуючи декілька структурних критеріїв, таких як середньоквадратичне зміщення (RMSD) атомів поліпептидного ланцюга та флуктуації положення Ca атомів ланцюга (RMSF), а також відстань $\text{Ca}(\text{Cys111})\text{-Ca}(\text{His272})$ між Ca атомами каталітичних залишків, показано, що більшість протестованих силових полів ефективно відтворюють нативну структуру PL^{pro} на коротких часових проміжках тривалістю сотні наносекунд.

Проте при тривалішому МД моделюванні модель на основі OPLS-AA/TIP3P демонструє кращу відтворюваність нативного фолдингу каталітичного домену. Ця модель також виявилась найбільш оптимальною при МД моделюванні структурно-динамічної стабільності комплексів ліганд-PL^{pro} з нековалентним інгібітором XR8-89. Показано, що ліганд-індуковані конформаційні зміни у тривимірній конфігурації каталітичної тріади відіграють важливу роль в алостеричному механізмі інгібіювання активності протеази PL^{pro}.

Новизна одержаних результатів полягає у визначенні ключових структурних факторів та створення 3D фармакофорних моделей для рецептор-спрямованої генерації нового хімічного простору на основі структур відомих молекул-інгібіторів M^{pro} нірматрелвіру та енсїтрелвіру. Удосконалено підхід до побудови еволюційної бібліотеки перспективних молекул-хітів з використанням різної кількості критеріїв придатності та оцінки параметрів фармакокінетичних параметрів ADMET. Уточнено специфіку та механізми взаємодії протеаз M^{pro} та PL^{pro} SARS-COV-2 з субстратом та (i) запропоновано вісім нових аналогів нірматрелвіру. Вперше показано, що основні структурні модифікації, які посилюють загальний інгібуючий ефект, локалізовані в азабіцикло[3.1.0]-гексановому та 2-оксопіролідinovому фрагментах; (ii) запропоновано десять нових аналогів енсїтрелвіру, які мають кращу спорідненість до протеази M^{pro} порівняно з оригінальним скаффолдом. Вперше показано, що основні структурні модифікації, які підвищують загальний противірусний ефект енсїтрелвіру, локалізовані у фрагментах 1-метил-1H-1,2,4-тріазолу та 6-хлоро-2-метил-2H-індазолу. Новизною роботи є розробка повноатомних молекулярно-динамічних моделей зв'язування комплексів «молекула-хіт – протеаза» для протеаз M^{pro} та PL^{pro} у водному середовищі на основі силового поля OPLS-AA. Розраховано стабільності комплексу молекула-хіт – протеаза M^{pro} вірусу SARS-CoV-2 у водному середовищі. Встановлено важливу роль ліганд-індукованої конформаційної динаміки в *apo*- та *голо*-формах протеази PL^{pro} при алостеричному механізмі інгібіювання та розробці нових нековалентних інгібіторів.

Практична цінність одержаних результатів роботи полягає у пропонуванні напрямків подальшої структурної оптимізації нирматрелвіру та енсїтрелвіру, як інгібіторів головної протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2 на основі аналізу моделі їх зв'язування з активним центром протеази. Теоретично розраховано структурно-енергетичні характеристики ліганд-рецептор M^{pro} та PL^{pro} та визначені ефективні молекулярні скаффолди з високою антикоронавірусною активністю дозволяють представити лінійку продуктів, перспективних для подальшої фармацевтичної розробки. Надано практичні рекомендації для оптимальних умов проведення молекулярно-динамічного моделювання комплексів інгібітор-протеаза M^{pro} та PL^{pro} у водному розчині за фізіологічних умов.

Для проведення комп'ютерних розрахунків та обробки результатів використовувались наступні *комп'ютерні методи та програмні пакети*: (1) пошук, критичний аналіз наукової літератури та інформаційних ресурсів банків даних виконувався з використанням SciFinder, Scopus, DrugBank, PubMed, Target & Drug Data for Coronavirus; (2) алгоритми еволюційної генерації нових бібліотек та великого хімічного простору органічних лігандів програмного пакету DataWarrior 6.0; (3) створення 3D-фармакофорних моделей, фармакофорний скринінг та докінгу великих бібліотек ліко-подібних речовин виконувались з використанням LigandScout 4.5, Biovia DiscoveryStudio v16.1, та AutoDock Vina 1.1.2; (4) розробка та параметризація повноатомних молекулярно-динамічних моделей, молекулярно-динамічне моделювання комплексів ліганд-протеаза у водному розчині проводилось за допомогою програмного пакету GROMACS 2019.4; (5) візуалізація результатів скринінгу та аналіз 3D-моделей комплексів ліганд-рецептор виконувалась з використанням VMD 1.9.3 та PyMOL 2.5.2).

Ключові слова: гетероциклічні сполуки, макромолекула, ліганд, біологічна активність, комп'ютерне моделювання, міжмолекулярна взаємодія, молекулярний докінг, лінійна регресія, середньоквадратичне відхилення, противірусний.