

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЛОГАЧОВА КАТЕРИНА ОЛЕГІВНА

УДК 544.165+577.29

ДИСЕРТАЦІЯ

**«МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДИЗАЙН ТА КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ
НОВИХ ІНГІБІТОРІВ КОРОНАВІРУСУ SARS-COV-2»**

Спеціальність 102 хімія
Галузь знань 10 Природничі науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ К. О. Логачова

Науковий керівник: Кириченко Олександр Васильович, доктор хімічних наук,
старший науковий співробітник

Харків – 2025

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 діяду 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. Інгібування протеази PL^{pro} може відбуватися як прямим інгібуванням 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 фармакофорний 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-1H-1,2,4-тріазолу та 6-хлоро-2-метил-2H-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 $Ca(Cys111)$ - $Ca(His272)$ 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-оксопіролідіновому 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 *holo*-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 дозволять 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.

ABSTRACT

Lohachova K. O. *Molecular design and computational modelling of novel inhibitors of coronavirus SARS-CoV-2.* – Manuscript

The thesis for the scientific degree of a candidate of sciences (doctor of philosophy) in specialty 102 Chemistry (10 Natural sciences). – V. N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of Education and Science of Ukraine. Kharkiv, 2025.

The coronavirus disease (COVID-19), caused by the SARS-CoV-2 virus, led to a rapid global spread of the disease and resulted in a pandemic that began in early 2020. The significant challenges posed by the COVID-19 pandemic have highlighted the lack of effective treatments and intensified the search for new antiviral drugs. Extensive international research has identified key parameters in the biochemical processes of the SARS-CoV-2 virus, which provides opportunities to pinpoint crucial links for selecting biological target molecules.

The scientific literature provides essential information about the genomic sequence and three-dimensional crystal structure of key proteases found in coronaviruses, specifically the main protease (M^{pro}) and the papain-like protease (PL^{pro}). The M^{pro} protease features a catalytic dyad consisting of the amino acids His41 and Cys145, located within a pocket responsible for substrate recognition. This structural pocket is highly conserved across all coronaviruses, making it a promising candidate for the development of new inhibitors and broad-spectrum drugs. Another important target is the papain-like protease PL^{pro} , which plays a vital role in viral replication. It is responsible for processing non-structural proteins Nsp1, Nsp2, and Nsp3 by cleaving the N-terminus of the replicative polyprotein. Inhibition of PL^{pro} can occur through two mechanisms: direct inhibition of the enzyme's active site or allosteric inhibition, where the binding of a ligand affects other regulatory regions of the protein.

The main objective of this dissertation is to design new molecules and conduct a receptor-based search, along with computer modeling, molecular docking, and 3D pharmacophore screening of potential inhibitors for the M^{pro} and PL^{pro} proteases of

the SARS-CoV-2 coronavirus. This includes creating virtual libraries of new compounds, optimizing the structures of promising molecules, and evaluating their inhibitory activity through in silico methods. Additionally, molecular dynamics modeling will be employed to analyze the structural and dynamic properties of the complexes formed between lead molecules and the key proteases of the SARS-CoV-2 virus, which is essential for assessing the stability of these complexes under physiological conditions.

The object of this research is on ligand-receptor interactions and the development of computer models for these interactions. The study will examine the structural and energetic characteristics of ligands, as well as create 3D models of the receptor proteins for the M^{pro} and PL^{pro} proteases. It will also involve molecular dynamics simulations and pharmacophore models to assess ligand-receptor binding.

The subject of the study is the molecular design, docking and virtual screening of new molecules-inhibitors of the viral proteases M^{pro} and PL^{pro} of the SARS-CoV-2 coronavirus.

The study utilizes an integrated approach that combines various computational methods to theoretically design new scaffolds and predict the physicochemical and pharmacokinetic properties of organic ligands that act as inhibitors for the main protease M^{pro} and papain-like protease PL^{pro} of the SARS-CoV-2 virus. By employing molecular docking techniques, we can identify leading molecules with antiviral activity and compare theoretical results with existing models and experimental data on known compounds that exhibit high affinity for binding to the active sites of the virus's spike proteases. Consequently, the findings from this theoretical study provide a foundation for the synthesis of new low molecular weight compounds aimed at developing potential inhibitors of these enzymes.

The first section provides a critical analysis of the existing scientific, technical, and methodological literature on the current state of COVID-19, as well as the trends in the spread of new strains of SARS-CoV-2. This analysis highlights the urgent need to develop innovative drugs to combat COVID-19, primarily due to the significant antigenic evolution of the virus. It explains the rationale for selecting the M^{pro} and PL^{pro}

proteases of SARS-CoV-2 as conserved targets for pharmacological intervention. The text also demonstrates that the design of non-covalent inhibitors represents a promising avenue for the development of antiviral drugs.

The second section details the computational methods, modeling parameters, and software packages used in the research.

The third section presents the results of the receptor-based search and computer-aided design of new M^{pro} protease inhibitors aimed at identifying new nirmatrelvir analogs with improved structural and energetic binding characteristics to the active site of the M^{pro} receptor of the SARS-CoV-2 coronavirus. The main outcome of this part of the work is the creation of a new virtual ligand library containing 1,866 nirmatrelvir analogs. This library was constructed using an evolutionary algorithm, which involved sequential structural modifications over up to 100 generations. The algorithm considered seven criteria for physicochemical and structural fitness, including molecular weight (M_w), cLogP, polar surface area, structural similarity to the parent scaffold, conformational similarity of ligands, molecular flexibility, number of torsional angles, and molecular volume. The structural optimization of the resulting library and its screening using the 3D pharmacophore model of the original nirmatrelvir enabled us to narrow down the chemical space of the library and select 32 lead molecules. We conducted a thorough structural and energy ranking of these selected candidates through molecular docking against two distinct SAR structures of the M^{pro} protease (PDB: 7VH8, 7MHK). This process led us to identify eight nirmatrelvir analogs with a higher binding affinity than the original compound. For the first time, we demonstrated that the primary structural modifications responsible for enhancing the overall inhibitory effect of the new analogs are located in the azabicyclo[3.1.0]-hexane and 2-oxopyrrolidine fragments. Furthermore, we propose a step-by-step algorithm for the rational design of new antiviral non-covalent inhibitors based on approved drugs, which holds promise for the development of new potential pharmaceutical agents for treating COVID-19.

The fourth section presents the results of a receptor-based search for new analogs of ensitrelvir, a non-covalent, non-peptide inhibitor of the main protease M^{pro} of the SARS-CoV-2 virus. This inhibitor has demonstrated high antiviral activity against various strains of coronaviruses in vitro and exhibits favorable metabolic and pharmacokinetic profiles, which support its use for oral administration. Given these advantages, the development of new ensitrelvir analogs is of significant scientific and practical importance. The molecular design and development of these analogs were achieved through evolutionary structural optimization of the initial scaffold of ensitrelvir. In the first stage, we created a virtual evolutionary library comprising 6,334 new analogues based on ten eligibility criteria. These criteria included structural and conformational similarity coefficients, molecular weight (M_w), cLogP, polar surface area, molecular flexibility, molecular shape, the number of hydrogen donors and acceptors, and the number of rotational bonds. We then performed 3D pharmacophore screening of the evolutionary library of ensitrelvir analogs using a model derived from the X-ray crystal structure data of the ensitrelvir-M^{pro} complex (PDB 8HEF). This process narrowed the candidates down to 41 selected compounds. Molecular docking calculations enabled the ranking of selected candidates based on their binding affinity and selectivity for the M^{pro} receptor. This process identified ten analogues of ensitrelvir that demonstrated improved affinity for the M^{pro} protease compared to the original compound. Additionally, the results from structural evolutionary optimization indicated that the primary structural modifications enhancing the overall antiviral effectiveness of ensitrelvir are found within the 1-methyl-1H-1,2,4-triazole and 6-chloro-2-methyl-2H-indazole fragments.

Section five focuses on the development, analysis, and testing of empirical force fields for molecular dynamics modeling of the main protease M^{pro} and papain-like protease PL^{pro} of the SARS-CoV-2 coronavirus, along with their complexes with ligands in aqueous solution and under physiological conditions. This work is a crucial step in computer-aided drug design. To determine the optimal conditions and parameterization, we performed a comparative analysis of several popular force fields, including OPLS-AA, CHARMM27, CHARMM36, and AMBER03. This analysis

aimed to assess their effectiveness in accurately reproducing the native structure of M^{pro} and PL^{pro} proteases in an aqueous environment under physiological conditions. This chapter presents key findings regarding six force fields — OPLS-AA, CHARMM27, CHARMM36, AMBER03, AMBER14SB, and GROMOS G54A7— along with four empirical parameters for aqueous solution models (SPC, TIP3P, TIP4P, TIP5P). Among these, the CHARMM27/TIP3P and OPLS-AA/TIP4P models demonstrate the best alignment with experimental data on the native folding of the M^{pro} protease. Notably, the OPLS-AA/TIP4P model effectively reproduces the native folding of the M^{pro} protease in aqueous solution under physiological conditions, specifically in the presence of 100 mM NaCl and at a temperature of 310 K. This accuracy is particularly significant for modeling highly polar and charged ligands. The OPLS-AA/TIP4P model demonstrated good reproducibility of the native folding of the M^{pro} protease in its dimeric form. This capability allows us to recommend it as the primary model for rapid computational screening and for assessing the stability of ligand-protease complexes in aqueous solutions. In the second part of the chapter, we conducted a comparative analysis of the parameters and conditions used in MD modeling of the PL^{pro} protease. By employing several structural criteria — such as the RMSD of the polypeptide chain atoms, the fluctuations of the C α positions (RMSF), and the distance between the C α atoms of the catalytic residues Cys111 and His272 — we found that most of the tested force fields effectively reproduce the native structure of PL^{pro} over short time intervals, specifically hundreds of nanoseconds. In longer MD simulations, the OPLS-AA/TIP3P-based model shows a superior ability to replicate the native folding of the catalytic domain. Additionally, this model has proven to be the most effective in MD simulations assessing the structural and dynamic stability of ligand-PL^{pro} complexes with the noncovalent inhibitor XR8-89. Research has demonstrated that the conformational changes induced by the ligand in the three-dimensional structure of the catalytic triad are crucial to the allosteric mechanism that inhibits the activity of the PL^{pro} protease.

The novelty of the work lies in the identification of key structural factors and the development of 3D pharmacophore models aimed at generating a new chemical space

based on the structures of the known M^{pro} inhibitors, nirmatrelvir and ensitrelvir. We have improved the approach for constructing an evolutionary library of promising hit molecules by applying various eligibility criteria and assessing ADMET pharmacokinetic parameters. Additionally, the specificity and mechanisms of interaction between the M^{pro} and PL^{pro} proteases of SARS-CoV-2 and their substrates have been clarified, leading to the proposal of eight new nirmatrelvir analogues. For the first time, it has been shown that the primary structural modifications that enhance the overall inhibitory effect are located in the azabicyclo[3.1.0]-hexane and 2-oxopyrrolidine fragments. Additionally, ten new ensitrelvir analogs have been proposed, which demonstrate better affinity for the M^{pro} protease than the original scaffold. For the first time, it has been shown that the key structural changes that improve the overall antiviral effect of ensitrelvir are found in the fragments of 1-methyl-1H-1,2,4-triazole and 6-chloro-2-methyl-2H-indazole. The novelty of this research lies in the development of full-atom molecular dynamics models focused on molecule-hit-protease complexes for the M^{pro} and PL^{pro} proteases in an aqueous medium, utilizing the OPLS-AA force field. The stability of the M^{pro} complex with its ligand, derived from the SARS-CoV-2 virus, was evaluated in this aqueous environment. Additionally, the study established the significant role of ligand-induced conformational dynamics in both the apo and holo forms of the PL^{pro} protease. This dynamic behavior contributes to the allosteric mechanism of inhibition and aids in the development of new non-covalent inhibitors.

The practical value of the results obtained lies in providing directions for further structural optimization of the inhibitors, nirmatrelvir and ensitrelvir, targeting the main protease M^{pro} of the SARS-CoV-2 virus. This is based on the analysis of their binding model to the active site of the protease. Theoretical calculations of the structural and energetic characteristics of the ligands and their interactions with M^{pro} and PL^{pro}, along with the identification of effective molecular scaffolds exhibiting high anticoronavirus activity, will enable us to develop a range of products that show promise for future pharmaceutical development. Additionally, practical recommendations for optimal

conditions for molecular dynamics modeling of M^{pro} and PL^{pro} inhibitor-protease complexes in aqueous solutions under physiological conditions are provided.

The following *computer methods and software packages* were utilized for computational calculations and result processing: (1) A critical analysis of scientific literature and information resources from various databases was carried out using SciFinder, Scopus, DrugBank, PubMed, and the Target & Drug Data for Coronavirus; (2) Algorithms for the evolutionary generation of new libraries and a vast chemical space of organic ligands were implemented using DataWarrior 6.0; (3) The creation of 3D pharmacophore models, pharmacophore screening, and docking of extensive libraries of drug-like substances were conducted using LigandScout 4.5, Biovia Discovery Studio v16.1, and AutoDock Vina 1.1.2; (4) The development and parameterization of full-atom molecular dynamics models, as well as molecular dynamics simulations of ligand-protease complexes in aqueous solution, were performed using the GROMACS 2019.4 software package; (5) Finally, the visualization of screening results and analysis of 3D models of ligand-receptor complexes was accomplished using VMD 1.9.3 and PyMOL 2.5.2.

Keywords: heterocyclic compounds, macromolecule, ligand, biological activity, computational modelling, intermolecular interactions, molecular docking, linear regression, root mean square deviation, antiviral.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації, у періодичних наукових виданнях держав, що входять до міжнародних наукометричних баз Scopus або Web of Science:

1. Yevsieieva L. V., **Lohachova K. O.**, Kyrychenko A., Kovalenko S. M., Ivanov V. V., Kalugin O. N. (2024) Main and papain-like proteases as prospective targets for pharmacological treatment of coronavirus SARS-CoV-2. *RSC Advances*, 13(50) 35500–35524. <https://doi.org/10.1039/d3ra06479d>. (Web of Science, Scopus Q1).

Особистий внесок здобувача: аналіз наукової літератури, вибір об'єктів дослідження. формулювання основних положень та висновків роботи, написання статті.

2. Ivanov V., **Lohachova K.**, Kolesnik Y., Zakharov A., Yevsieieva L., Kyrychenko A., Langer T., Kovalenko S. M., Kalugin O. M. (2023) Recent advances in computational drug discovery for therapy against coronavirus SARS-COV-2. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 6(46) 4-24. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.290318>. (Scopus Q3).

Особистий внесок здобувача: аналіз наукової літератури, формулювання основних положень та висновків роботи, написання статті.

3. **Lohachova K. O.**, Sviatenko A. S., Kyrychenko A., Ivanov V. V., Langer T., Kovalenko S. M., Kalugin O. N. (2024) Computer-aided drug design of novel nirmatrelvir analogs inhibiting main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(5) 232-239. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2024.158114>. (Scopus Q2).

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, проведення розрахунків з молекулярного докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання статті.

4. **Lohachova K. O.**, Kyrychenko A., Kalugin O. N. (2024) Critical assessment of popular biomolecular force fields for molecular dynamics simulations of folding and enzymatic activity of main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *Biophysical Chemistry*, 311, Art. num. 107258. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2024.107258>. (Web of Science, Scopus Q2).

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, проведення молекулярно-динамічних розрахунків, обробка даних та аналіз результатів, написання статті.

Публікація у науковому виданні, включеному на дату опублікування до переліку наукових фахових видань України:

5. **Lohachova K. O.**, Sviatenko A. S., Kyrychenko A. V., Kalugin O. N. (2024) Evolutionary structure optimization of ensitrelvir as non-covalent inhibitor of SARS-CoV-2 main protease M^{pro}. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Хімія»*, 43(66), 26-37. <https://doi.org/10.26565/2220-637X-2024-43-02>. (стаття категорії «Б»).

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, генерація еволюційної бібліотеки, проведення молекулярного докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання статті; особистий внесок Святенко А.С.: літературний огляд; особистий внесок Кириченка О.В.: постановка завдання; особистий внесок Калугіна О.М.: загальне керівництво роботою.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. **Logacheva E.O.**, Kyrychenko A.V. (2021) Molecular docking of some clinically approved drugs as dual-acting inhibitors for proteases of coronavirus SARS-CoV-2. *IX міжнародна науково-практична конференція "Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості"*, Збірник матеріалів: 18-19 листопада 2021, Харків, 55-60.

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, проведення молекулярного докінгу дуальних інгібіторів, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

7. **Lohachova K.O.**, Kyrychenko A.V., Kalugin O.N. (2022) Inhibitory effect of sharp-edged gold nanoparticles against main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *Ukrainian Conference with International Participation "Chemistry, Physics and Technology of Surface"*. Book of Abstracts. 19-20 October 2022, Kyiv, Ukraine. 112.

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, проведення молекулярно-динамічного моделювання, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

8. **Lohachova K. O.**, Kyrychenko A. V., Ivanov V. V., Langer T., Kovalenko S. M., Kalugin O. N. (2023) Rational design of novel nirmatrelvir analogs inhibiting main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *Міжнародна Internet конференція "Modern chemistry of medicines"*. Тези доповідей. 18 травня 2023 р., Харків: НФаУ, 48-49.

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, проведення молекулярного докінгу нових похідних нірматрелвіру, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

9. Kovalenko S.M., Yevsieieva L.V., **Lohachova K.O.**, Kolesnik Y.V., Zakharov A.B., Kyrychenko A.V., Ivanov V.V., Kalugin O. N. (2023) Validation of pharmacophore models in virtual screening of biologically active molecules. *Науково-практична Internet-конференція з міжнародною участю «Topical issues of clinical pharmacology and clinical pharmacy»*, Тези доповідей. 25-26 жовтня 2023 року, Харків: НФаУ, 198-200.

Особистий внесок здобувача: розробка фармакофорної моделі, проведення докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

10. **Логачова К.О.**, Євсєєва Л.В., Колесник Я.В., Захаров А.Б., Кириченко О.В., Іванов В.В., Коваленко С.М., Калугін О.М. (2023) Молекулярний дизайн та скринінг нових інгібіторів подвійної дії папаїноподібної та головної

протеази коронавірусу SARS-CoV-2. *XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії*. Збірка матеріалів. 10-12 жовтня 2023 року, м. Харків, Друкарник: Збірка праць, 25.

Особистий внесок здобувача: планування розрахунків, проведення докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

11. **Lohachova K.**, Ivanov V., Anokhin D., Zakharov A., Yevsieieva L., Kyrychenko A., Langer T., Kovalenko S., Kalugin O. (2023) Rational design of novel inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *International Scientific Internet Conference: «Molecular Engineering and Computational Modelling for Nano- and Biotechnology: From Nanoelectronics to Biopolymers»*, September 27–28, 2023, Cherkasy, Ukraine. Book of Abstracts. Cherkasy: Chabanenko Yu. A., 35-36.

Особистий внесок здобувача: планування розрахунків, проведення докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

12. Kyrychenko A. V., **Lohachova K. O.**, Ivanov V. V., Kovalenko S. M., Kalugin O. N. (2024) Generation and screening of evolutionary libraries as a promising strategy for drug discovery against coronavirus SARS-CoV-2. *XXVI Українська конференція з органічної хімії та біоорганічної хімії*. 16-20 вересня 2024 року, Ужгород. Ужгородський національний університет: Матеріали конференції, Д-30.

Особистий внесок здобувача: планування розрахунків, проведення докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

13. **Lohachova K.O.**, Kyrychenko A.V., Kalugin O.N. (2024) Force field benchmarking of molecular dynamics simulations of main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *XVI Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів "Хімічні Каразінські читання - 2024"*, Тези доповідей: 30 квітня 2024 р. Харків: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 19-20.

Особистий внесок здобувача: планування розрахунків, проведення МД розрахунків, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	23
ВСТУП	25
РОЗДІЛ 1. КОРОНАВІРУС SARS-CoV-2: БУДОВА, РЕПЛІКАЦІЯ ТА ТЕРАПІЯ	30
1.1 Стан пандемії COVID-19: виклики та досягнення	30
1.2 Загальна характеристика вірусу SARS-CoV-2	33
1.3 Основні стратегії противірусної терапії	33
1.4 Молекулярна архітектура вірусу SARS-CoV-2	34
1.5 Основна протеаза M ^{pro}	36
1.6 Папаїноподібна протеаза PL ^{pro}	37
1.7 Докінг та молекулярно-динамічне моделювання як метод пошуку інгібіторів коронавірусу SARS-Co-V-2	40
1.7.1 Обчислювальні методи в розробці ліків	42
1.7.2 Методи QSAR	42
1.7.3 Віртуальний скринінг на основі фармакофорів	45
1.7.4 Молекулярно-динамічні симуляції комплексів білок-ліганд	50
1.8 Існуючі інгібітори головної протеази M ^{pro}	53
1.9 Існуючі інгібітори папаїноподібної протеази PL ^{pro}	60
1.10 Дуальні та мульти-таргетні інгібітори ферментів SARS-CoV-2	62
Висновки до розділу 1	65
 РОЗДІЛ 2. РОЗРАХУНКОВА ЧАСТИНА	 66
2.1 Молекулярний дизайн нових інгібіторів	66
2.2 Оптимізація сполук лідерів методом еволюційних бібліотек	66
2.3 Квантово-хімічні розрахунки	67
2.4 Молекулярний докінг	67
2.5 Молекулярно-динамічне моделювання	67
2.6 Аналіз МД розрахунків	68
2.7 Програмне забезпечення для візуалізації результатів та графіки	69

	21
Висновки до розділу 2	70
РОЗДІЛ 3. ДИЗАЙН НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕАЗИ M^{pro} НА ОСНОВІ АНАЛОГІВ НІРМІТРАЛВІРУ	70
3.1 Нірмітрелвір як інгібітор головної протеази M^{pro}	70
3.2 Методологія дослідження	71
3.3 Результати віртуальної бібліотеки та її фільтрація	77
Висновки до розділу 3	80
РОЗДІЛ 4. ДИЗАЙН НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕАЗИ PL^{pro} НА ОСНОВІ АНАЛОГІВ ЕНСІТРЕЛВІРУ	81
4.1 Енсїтрелвір як противірусний препарат проти SARS-CoV-2	81
4.2 Алгоритм генерації еволюційної бібліотеки аналогів енсїтрелвіру	83
4.2.1 Створення еволюційної бібліотеки аналогів енсїтрелвіру	83
4.2.2 3D-фармакофорний скринінг	85
4.2.3 Молекулярний докінг еволюційної бібліотеки	86
4.3 Аналіз отриманих аналогів енсїтрелвіру	91
Висновки до розділу 4	91
РОЗДІЛ 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМІЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БУДОВИ ТА СТАБІЛЬНОСТІ КОМПЛЕКСІВ ІНГІБІТОР-ПРОТЕАЗА У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ	93
5.1 Механізми інгібування папаїноподібної протеази (PL^{pro}) вірусу SARS-CoV-2	92
5.1.1 Аналіз стабільності мономерної форми протеази M^{pro}	93
5.1.2 Вплив NaCl і температури на фолдинг M^{pro}	102
5.1.3 МД моделювання димерної форми протеази M^{pro}	103
5.1.4 МД моделювання комплексів «ліганд- M^{pro} »	105
5.2 МД моделювання папаїноподібної протеази (PL^{pro}) вірусу SARS-CoV-2	108
5.2.1 Порівняння силових полів для моделювання фолдингу PL^{pro}	109

5.2.2 Порівняння силового поля OPLS-AA при моделюванні фолдингу PL^{pro} у поєднанні з різними моделями води	117
5.2.3 Вплив іонної сили розчину та температури на фолдинг PL^{pro}	118
5.2.4 Аналіз вторинної структури PL^{pro}	119
5.2.5 Стабільність комплексів ліганд- PL^{pro}	121
Висновки до розділу 5	125
ВИСНОВКИ	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	129
ДОДАТОК А	162

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

COVID-19	Коронавірусна хвороба 2019
SARS-CoV-2	Тяжкий Гострий Респіраторний Синдром Коронавірус 2
M ^{pro}	Головна протеаза SARS-CoV-2
PL ^{pro}	Папаїноподібна протеаза SARS-CoV-2
ADMET	Всмоктування, розподіл, метаболізм, виведення, токсичність
BOOZ	Всесвітня організація охорони здоров'я
GPBI	Гостра респіраторна вірусна інфекція
ICTV	Міжнародний комітет з таксономії вірусів
ACE-2	Ангіотензинперетворюючий фермент 2
Nsp	Неструктурований білок
PP1ab	Поліпротеїновий ланцюг
PDB	Банк даних білкових структур
Ubl	Убіквітинподібний домен
DUB	Деубіквітинілюючий фермент
FDA	Управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США
CADD	Комп'ютерний дизайн ліків, що базується на лігандах
SBDD	Комп'ютерний дизайн ліків, що базується на структурах
QSAR	Комп'ютерний дизайн ліків, що базується на кількісних структура-активнісних зв'язках
IC50	Концентрація напівмаксимального інгібування
EC50	Напівмаксимальна ефективна концентрація
RBA	Відносна афінність зв'язування
CoMFA	Порівняльний аналіз молекулярних полів
QSPR	Кількісна структурно-властивісна залежність
CPU/GPU	Центральний процесор/Графічний процесор
RMSD	Середньоквадратичне відхилення

МД	Молекулярно-динамічне моделювання
MMPBSA	повноатомне МД моделюванням методом Poisson-Boltzmann
HCV	Гепатит Ц
MERS-Co-V	Коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому
USP2	Убіквітин-карбоксил-термінальної гідролази-2
RdRp	РНК-залежна РНК-полімераза
ExoN	3'-5' екзорибонуклеаза
BA	Спорідненість зв'язування ліганда
DFT	Метод теорії функціоналу густини
B3LYP	Гібридний функціонал B3LYP
PCM	Поляризаційна модель континууму
	Ансамбль, що описує рівновагу системи за сталого тиску та
NPT	температури
пс	Пікосекунда
атм	Атмосфера
PME	Метод Евалда з частковим сумуванням
нм	Нанометр
фс	Фемтосекунда
RMSF	Середньоквадратична флуктуація
PSA	Полярна площа поверхні
M_w	Молекулярна маса
cLogP	Коефіцієнт розподілу
BAS	Біологічно активна сполука
R_g	Радіус інерції
DSSP	Визначення вторинної структури білка

ВСТУП

Актуальність та обґрунтування вибору теми дослідження.

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.

Критичний аналіз сучасної науково-технічної та методичної літератури стосовно сучасного стану щодо захворювання на COVID-19 та поточні тенденції поширення нових штамів вірусу SARS-CoV-2 виявив 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 аргументовано, що комп'ютерний дизайн та конструювання нових нековалентних інгібіторів є перспективним напрямком розробки протівірусних препаратів.

Об'єкт дослідження: взаємодія ліганд-рецептор, комп'ютерні моделі ліганд-рецептор, структурно-енергетичні характеристики лігандів, 3D моделі білків-рецепторів, молекулярно-динамічні моделі, фармакофорні моделі для оцінювання ліганд-рецепторного зв'язування.

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

Метою дисертаційної роботи є молекулярний дизайн, рецептор-орієнтований пошук та 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 SARS-CoV-2 є основою для оцінки стабільності комплексів у фізіологічних умовах.

Для проведення експерименту та обробки результатів використано наступні методи та підходи:

- критичний аналіз наукової літератури та інформаційних ресурсів банків даних, зокрема, SciFinder, Scopus, DrugBank, PubMed, Target & Drug Data for Coronavirus;
- алгоритми еволюційної генерації нових бібліотек та великого хімічного простору органічних лігандів (програмний пакет DataWarrior 6.0);
- створення 3D-фармакофорних моделей, фармакофорний скринінг та докінгу великих бібліотек ліко-подібних речовин (програмні пакети LigandScout 4.5, Biovia DiscoveryStudio v16.1, AutoDock Vina 1.1.2);
- розробка та параметризація повноатомних молекулярно-динамічних моделей, молекулярно-динамічне моделювання комплексів ліганд-протеаза у водному розчині (GROMACS 2019.4);
- візуалізація результатів скринінгу та аналіз 3D-моделей комплексів ліганд-рецептор (VMD 1.9.3, PyMOL 2.5.2).

Новизна одержаних результатів:

- 1) визначено ключові структурні фактори та створено 3D фармакофорні моделі для рецептор-спрямованої генерації нового хімічного простору на основі структур відомих молекул-інгібіторів M^{pro} нірматрелвіру та енсїтралвіру.
- 2) удосконалено підхід до побудови еволюційної бібліотеки перспективних молекул-хітів з використанням різної кількості критеріїв придатності та оцінки фармакокінетичних параметрів ADMET.
- 3) уточнено специфіку та механізми взаємодії протеаз M^{pro} та PL^{pro} SARS-COV-2 з субстратом.

- запропановано вісім нових аналогів нїрматрелвіру з кращими параметрами зв'язування з протеазою нїж оригінальний інгібітор. Вперше показано, що основні структурні модифікації, які посилюють загальний інгібуючий ефект, локалізовані в азабіцикло[3.1.0]-гексановому та 2-оксопіролідіновому фрагментах;
 - запропоновано десять нових аналогів, які мають кращу спорідненість до протеази M^{pro} порівняно з енсїтрелвіром. 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-їндазолу.
- 4) розроблено повноатомні молекулярно-динамічна моделі 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.
- 5) встановлено важливу роль ліганд-індукованої конформаційної динаміки в *apo*- та *голо*-формах протеази PL^{pro} при алостеричному механізмі інгібіювання та розробці нових нековалентних інгібіторів.

Зв'язок роботи із науковими програмами, планами, темами:

Наукова робота частково проводилась у рамках наступних НДР та проєктів:

- 1) «Молекулярний дизайн, синтез та скринінг нових потенційних противірусних фармацевтичних інгредієнтів для терапії інфекційного захворювання COVID-19». Науково-дослідний проєкт Національного фонду досліджень України № 2021.01/0062. НДР 0123U102849 (01.02.2022-31.11.2025).
- 2) «Наночастинки благородних металів функціоналізовані стимул-чутливими лігандами та флуоресцентними барвниками для потреб адресної доставки та моніторингу». Проєкт фундаментального наукового дослідження Міністерства освіти і науки України № НДР 0122U001388 (01.02.2022-31.12.2023).

Практичне використання одержаних результатів:

- запропоновано напрямки подальшої структурної оптимізації інсетрелвіру та енсїтрелвіру - інгібіторів головної протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2 на основі аналізу моделі їх зв'язування з активним центром протеази;
- теоретично розраховані структурно-енергетичні характеристики ліганд-рецептор та визначені ефективні молекулярні скаффолди з високою антикоронавірусною активністю дозволять представити лінійку продуктів, перспективних для подальшої фармацевтичної розробки;
- представлені практичні рекомендації для оптимальних умов проведення молекулярно-динамічного моделювання комплексів інгібітор-протеаза M^{pro} та PL^{pro} у водному розчині за фізіологічних умов.

Особистий внесок здобувача: У процесі виконання дисертаційної роботи автором власноруч виконано генерацію еволюційних бібліотек, проведено розрахунки методом молекулярного докінгу та молекулярно-динамічного моделювання. Проведено аналіз відібраних сполук-лідерів та запропоновано напрямки подальшої структурної оптимізації. Підготовка матеріалів дослідження до друку та написання наукових статей.

Визначення завдань та методів дослідження, критичний аналіз наукової літератури, комп'ютерні розрахунки та аналіз та інтерпретація отриманих результатів, а також формування висновків роботи було проведено спільно з науковим керівником.

Автор висловлює подяку за участь у обговоренні результатів співробітникам хімічного факультету ХНУ імені В.Н. Каразіна, декану факультету к.х.н., проф. О.М. Калугіну, д.х.н., проф. професору кафедри хімічного матеріалознавства В.В. Іванову, д.х.н., проф. професору кафедри органічної хімії С.М. Коваленку.

Апробація результатів дисертації: Основні результати дисертації були представлені на наступних наукових з'їздах та конференціях: Ukrainian Conference with International Participation "Chemistry, Physics and Technology of Surface" (Київ, 2022), IX International Scientific and Practical Conference

“Chemistry, Bio- and Nanotechnology, Ecology and Economics in the Food and Cosmetic Industry” (Харків, 2022), International Internet Conference “Modern Chemistry of Medicines” (Харків, 2023), International Scientific Internet Conference “Molecular Engineering and Computational Modelling for Nano- and Biotechnology: From Nanoelectronics to Biopolymers” (Черкаси, 2023), XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених, студентів та аспірантів з актуальних питань хімії (Харків, 2023), Scientific and Practical Internet Conference with International Participation “Topical Issues of Clinical Pharmacology and Clinical Pharmacy” (Харків, 2023), XVI Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів "Хімічні Каразінські читання - 2024" (ХКЧ'24)” (Харків, 2024), XXVI Ukrainian Conference on Organic and Bioorganic Chemistry (Ужгород, 2024).

Публікації за темою дисертації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, з них 4 статті у наукових виданнях, що входять до бази даних Scopus (Q2-Q3), 1 стаття категорії «Б» у фаховому виданні України. Апробація результатів дослідження представлена у 8 тезах доповідей на всеукраїнських наукових конференціях.

Структура та обсяг роботи

Дисертація складається зі вступу, 5 розділів, висновків та списку використаних джерел (299 посилань) та Додатку А. Робота містить 7 таблиць, 55 рисунків та викладена на 165 сторінках.

РОЗДІЛ 1

КОРОНАВІРУС SARS-COV-2: БУДОВА, РЕПЛІКАЦІЯ ТА ТЕРАПІЯ (ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Стан пандемії COVID-19: виклики та досягнення

Наприкінці 2019 року спалах тяжкого гострого респіраторного синдрому (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) призвів до глобальної епідемії, яка 11 березня 2020 року була визнана Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) пандемією. Гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) та інші прояви хвороби були викликані вірусом SARS-CoV-2, який раніше не циркулював у людських контактах і отримав офіційну назву - коронавірусна хвороба 2019 (COVID-19) [1].

Вірус SARS-CoV-2 за 2 роки вразив близько 770 мільйонів людей, викликавши респіраторні, ниркові, серцеві, церебральні та кишкові прояви хвороби, які варіювалися від легких до летальних наслідків [2,3]. Станом на 20 червня 2023 року, через 2,5 роки після діагностування хвороби, померло близько 6,95 мільйонів людей з підтвердженим діагнозом COVID-19 [4].

Масові кампанії з вакцинації продемонстрували ефективність у боротьбі з пандемією COVID-19 в ЄС та у всьому світі. Загальна кількість введених доз вакцини у світі становила понад 13 461,3 мільйона доз. Станом на січень 2023 року, згідно з даними, представленими в ЄС, загальне покращення епідеміологічної ситуації з COVID-19 продовжувалось. Рівень смертності знизився до найнижчого рівня за останні 12 місяців. Більшість країн світу повідомляли про схожу ситуацію. Частка пацієнтів з COVID-19 у лікарнях та відділеннях інтенсивної терапії в ЄС становила 28% від максимальних показників, зафіксованих під час пандемії. Однак, незважаючи на покращення епідеміологічної ситуації, COVID-19 продовжує створювати навантаження на системи охорони здоров'я.

Показники надмірної смертності (відхилення смертності від очікуваного рівня) свідчать про те, що наслідки хвороби продовжують впливати на здоров'я

населення Землі. Загальна статистика свідчить, що вакцинація не створює стійкого імунітету проти вірусу SARS-CoV-2. Сьогодні, на березень 2025 року, хвороба COVID-19 продовжує поширюватися [4,5].

З формальної точки зору, 5 травня 2023 року ВООЗ оголосила, що COVID-19 не є Глобальною надзвичайною ситуацією в галузі охорони здоров'я, що має міжнародне значення. З огляду на те, що хвороба вже добре відома, вона більше не підпадає під це визначення, хоча й триває. Однак ця заява не означає, що питання пандемії як таке вже вирішене. ВООЗ буде розробляти довгострокові, постійні рекомендації для країн щодо того, як боротися з COVID-19 на безперервній основі [4,5].

Враховуючи постійну еволюцію вірусу, наразі під егідою ВООЗ у світі проводиться регулярний епіднадгляд, який полягає у виявленні та моніторингу нових варіантів SARS-CoV-2. Поява варіантів, що становлять підвищений ризик для глобальної системи охорони здоров'я, спонукала ВООЗ визначити конкретні різновиди вірусу як такі, що становлять інтерес, та варіанти, що викликають занепокоєння, з метою встановлення пріоритетів для прийняття рішень щодо необхідності оновлення вакцин або підтримання чи інтенсифікації їх застосування у відповідь на збільшення присутності певного варіанту вірусу SARS-CoV-2 (таблиця 1.1) [5,6].

Таблиця 1.1

Основні відомі штами вірусу SARS-CoV-2

Вид вірусу SARS-CoV-2	Перший встановлений випадок
Альфа	Велика Британія Вересень 2020
Бета	Північно-Африканська Республіка, Травень 2020
Гамма	Бразилія, Листопад 2020
Дельта	Індія, Жовтень 2020
Омікрон	Декілька країн, Листопад 2021

На кінець 2024 року Оміврон (Omicron) залишався домінуючим штамом, що циркулює в усьому світі, на який припадає понад 98% вірусних послідовностей [7].

Основною проблемою вакцин є безперервна мутація SARS-CoV-2. Більшість РНК-вірусів швидко еволюціонують. Варіанти SARS-CoV-2 з різними фенотипічними характеристиками, включаючи трансмісивність, тяжкість перебігу та здатність уникати імунітету, продовжують швидко з'являтися.

Штам Оміврон, виявлений наприкінці листопада 2021 року, ознаменував початок нової фази пандемії [8]. Він менш вірулентний, але більш трансмісивний, ніж попередні варіанти SARS-CoV-2 [9]. Ще на початку відкриття штам Оміврон містив три сестринські лінії (BA.1, BA.2 і BA.3) [8]. На відміну від оригінального вірусу SARS-CoV-2, який інфікував клітини бронхів і легенів, Omicron BA.1 віддавав перевагу реплікації в носоглотці [10].

Вірус SARS-CoV-2, як і інші РНК-віруси, демонструє високий рівень антигенної еволюції, що створює значну ймовірність повторних інфекцій. Наприклад, штам Оміврон має значно вищу здатність спричиняти реінфекції порівняно з усіма попередніми варіантами.

Досліджуючи поточні тенденції розвитку штамів Оміврону, наукові публікації вказують на можливість появи нових хвиль інфікування приблизно кожні чотири місяці циркуляції вірусу. У перспективі очікується, що вірус SARS-CoV-2 набуде більш регулярного характеру захворюваності, схожого на сезонний грип. Водночас щорічний тягар хвороби, спричинений цим вірусом, може вдвічі або навіть втричі перевищувати той, який спостерігається при грипі. З появою нових штамів вірусу SARS-CoV-2, які уникають імунної відповіді, вакцини, розроблені проти вірусу, можуть стати менш ефективними [8]. Це означає, що питання необхідності розробки ліків проти COVID-19 продовжує залишатися актуальним. Важливість пошуку нових терапевтичних препаратів проти коронавірусної хвороби COVID-19 очевидна [11].

1.2 Загальна характеристика вірусу SARS-CoV-2

За класифікацією Міжнародного комітету з таксономії вірусів (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) вірус SARS-CoV-2 належить до б-коронавірусів [12]. Балтиморська класифікація вірусів - це класифікація вірусів на групи залежно від типу геномної нуклеїнової кислоти (ДНК, РНК, одноланцюгова, дволанцюгова) та способу її реплікації. У системі Балтиморської класифікації вірус SARS-CoV-2 належить до IV групи вірусів, що містять одноланцюгову РНК, з позитивною одноланцюговою РНК вірусів (+ssРНК) [13,14].

Реплікація геномів +сРНК відбувається в цитоплазмі клітини-хазяїна паралельно зі складанням нуклеокапсиду, в який упаковується генетичний матеріал [15]. Тісний зв'язок між реплікацією вірусного геному і формуванням нуклеокапсиду означає, що геномна РНК і білкові компоненти вірусу високоспецифічні один до одного, а збірка +сРНК вірусу залежить від взаємодії між білками і між білками і РНК [16,17]. Більша частина геномної РНК кодує два реплікативні поліпротеїни, які потім розщеплюються під час розщеплення на 16 неструктурних білків під дією вірусних протеаз [13,14].

Решта геному SARS-CoV-2 кодує чотири структурні білки: шиповий білок (S), оболонковий білок (E) білок (E), мембранний білок (M) і нуклеокапсидний білок (N) [8,15–18].

1.3 Основні стратегії протівірусної терапії

При розробці протівірусних препаратів використовують дві різні стратегії: вплив на клітини організму-хазяїна (непрямі методи) або вплив безпосередньо на вірус (прямі методи).

Непрямі методи спрямовані на білки клітини-хазяїна, що беруть участь у життєвому циклі вірусу. Цей підхід має меншу ймовірність розвитку резистентності, але значно вищу токсичність [18]. Коронавіруси можуть проникати в клітини хазяїна трьома шляхами: рецепторно-опосередковане злиття плазматичних мембран, рецепторно-опосередкований ендоцитоз або

антитілозалежне вірусне проникнення. Таким чином, рецепторні білки на поверхні клітини-хазяїна відіграють вирішальну роль у розпізнаванні вірусу та приєднанні до клітин-хазяїв як для злиття, так і для ендоцитозу [19].

Запобігання зв'язуючим взаємодіям між вірусом SARS-CoV-2 і рецепторами ангіотензинперетворюючого ферменту II (ACE-2) людини є прикладом цієї стратегії [20] і основою для розробки нових вакцин проти COVID-19 [21]. Нещодавно з'явилося кілька чудових оглядів з цієї проблематики [17–19].

Прямі методи впливають саме на певні компоненти вірусу та його життєвий цикл. Ці підходи різноманітні і характеризуються значною специфічністю та меншою кількістю побічних ефектів для організму. Вірусні білки, такі як основна протеаза M^{pro} і папаїноподібна протеаза PL^{pro}, а також інші компоненти вірусу на різних стадіях його життєвого циклу можуть бути потенційними мішенями противірусної стратегії прямого підходу.

Загальнотерапевтичні підходи до лікування вірусних інфекцій, як правило, прямо спрямовані на вірусні компоненти. Однак такі препарати дуже чутливі до медикаментозної резистентності через швидкі зміни у вірусному геномі, особливо це стосується РНК-вірусів.

Таким чином, при конструюванні молекул для фармацевтичного впливу на вірус необхідно брати найбільш консервативні мішені: компоненти вірусу, які мають менше мутацій і є високоспецифічними для вірусу. Зменшення ризику розвитку резистентності при розробці препаратів, спрямованих на більш ніж один вірусний компонент [22]. Ця процедура вимагає особливих підходів до розробки противірусних препаратів [18].

1.4 Молекулярна архітектура вірусу SARS-CoV-2

Розробка потенційних противірусних препаратів вимагає розуміння як життєвого циклу вірусу SARS-CoV-2, так і його молекулярної архітектури. Сучасні дослідження в галузі кріоелектронної томографії дозволили

візуалізувати інтактні віріони SARS-CoV-2 і отримати уявлення про їхню структуру в природному стані з роздільною здатністю, близькою до атомної [12].

Віріони SARS-CoV-2 мають приблизно сферичну або еліпсоїдальну форму із середнім діаметром 108 ± 8 нм. Зовнішня поверхня віріона вкрита поверхневими шипоподібними білками (S-білок). Зовнішня мембрана вірусу містить мембранний білок (M) і білок оболонки (E). Білок E невеликий, з масою 8,5 кДа, утворює мембранний канал. Основним білковим компонентом в середині віріона є нуклеокапсидний білок N, який відповідає за зв'язування геномної РНК і упаковку її в комплекс рибонуклеопротеїну (РНП) [12,23].

Геном Co-V має розмір 27-32 кб (кілобазних пар) і є другим за розміром серед усіх геномів РНК-вірусів. Майже дві третини геномної РНК мають дві відкриті рамки зчитування (ORF): ORF1a і ORF1b на 5'-кінці, які швидко транслюються у два поліпротеїни - pp1a і pp1ab, які перетворюються двома вірусними протеазами на шістнадцять неструктурних білків (nsp1-16) [24]. Ще третина геному кодує чотири структурні білки: шиповий білок (S), оболонковий білок (E), мембранний білок (M), нуклеокапсидний білок (N) та інші проміжні білки. Ці білки кодуються ORFs, розташованими на 3'-кінці геномної РНК [9,12,25].

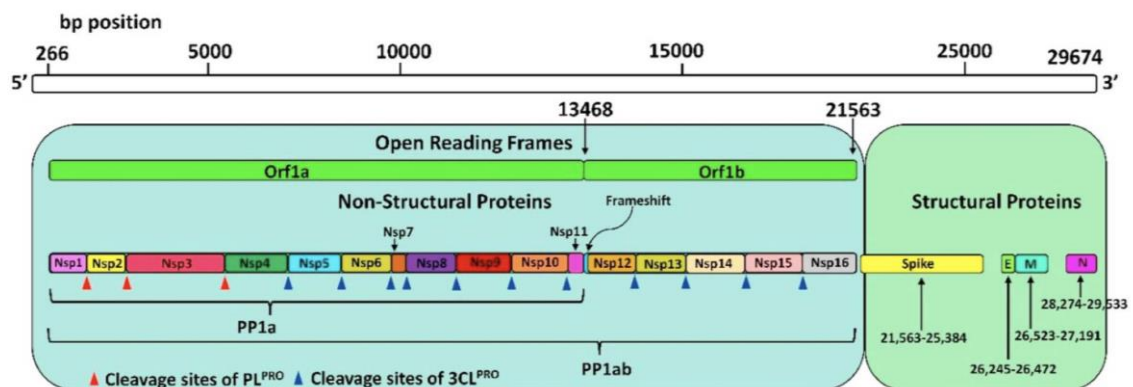


Рис. 1.1 - Геном SARS-CoV-2 кодує 5 структурних білків і 16 неструктурних білків (Nsp), які транслюються в один поліпротеїновий ланцюг (PP1ab). Червоним (PL^{PRO}) та синім (M^{PRO}) трикутниками показано місця розщеплення поліпротеїнового ланцюга протеазами.

1.5 Основна протеаза M^{pro}

Протеїнкінази - це клас ферментів-кіназ, які модифікують специфічні білки і відповідають за активацію різних білків у каскаді клітинних сигнальних шляхів. Завдяки значному впливу протеїнкіназ на функціонування клітин, вони є привабливими мішенями для розробки ліків. Існує значна кількість доступних лікарських речовин, які є інгібіторами протеїнкіназ, і вони в першу чергу досліджувалися як можливі терапевтичні засоби для лікування COVID-19 [11].

Основна увага дослідників була зосереджена на основній протеазі SARS-CoV-2. Оскільки жодна відома протеаза людини не розпізнає цей сайт розщеплення, M^{pro} вважається ідеальною мішенню для терапевтичної розробки [23,26,27]. Крім того, активні ділянки M^{pro} є висококонсервативними серед усіх коронавірусів [28].

Неструктурний білок 5 (Nsp5) або основна протеаза M^{pro} (3С-подібна протеаза) відповідає за розщеплення одинадцяти M^{pro}-специфічних сайтів на двох поліпротеїнах SARS-CoV-2 Pp1a і Pp1ab на 11 неструктурних білків (nsp4-16) (рис. 1.1).

M^{pro} складається з трьох доменів: хімотрипсиноподібного домену I і 3С-протеазоподібного домену II, а також домену III, що складається з 5 α -спіралей. Кишеня для зв'язування M^{pro} розташована між доменами I і II і має каталітичну діаду CysHis (Cys145 і His41). Атом сірки цистеїну слугує нуклеофілом, а імідазольне кільце гістидину - загальною основою. M^{pro} націлений на послідовність розпізнавання Leu-GlnY(Ser, Ala, Gly)Y (де Y означає сайт розщеплення) (рис. 1.2) [29].

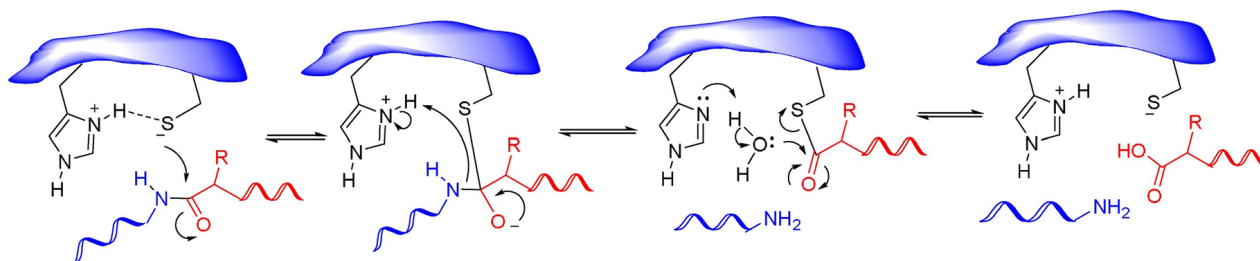


Рис. 1.2 - Механізм дії цистеїнових протеаз [30].

Структура M^{pro} SARS-CoV-2 складається з трьох доменів: домен I (залишки 8-101), домен II (залишки 102-184) та домен III (залишки 201-303). Третій домен з'єднаний з доменом II довгою петлевою ділянкою (залишки 185-200) (рис. 1.3).

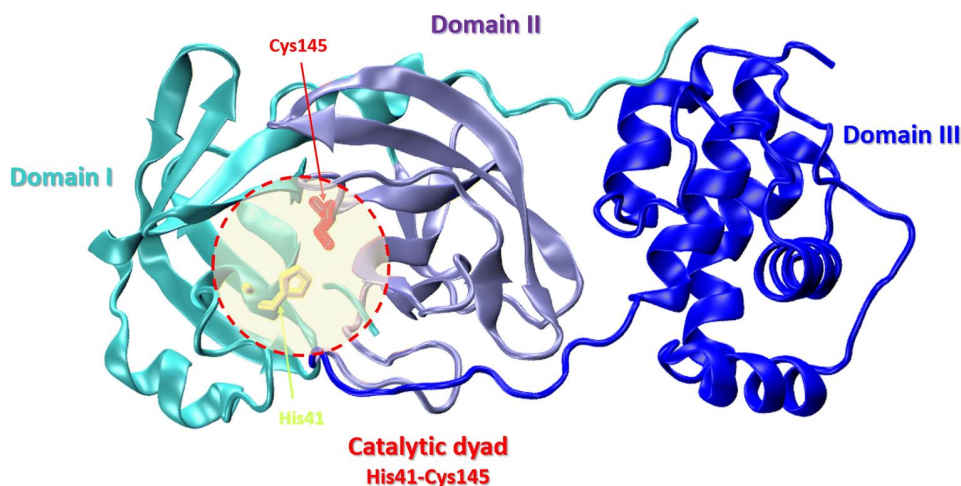


Рис. 1.3 - Кристалічна структура головної протеази SARS-CoV-2 (M^{pro}) з каталізаторним центром (His41 і Cys145) (PDB: 6LU7): домен I – блакитний, домен II – фіолетовий, домен III – синій.

Рентгенівські структури протеази коронавірусу M^{pro} з високою роздільною здатністю були використані в багатьох дослідженнях для розробки противірусних препаратів-кандидатів, спрямованих на SARS-CoV-2 [18,31,32].

Численні експериментальні та теоретичні дослідження були присвячені дизайну та розробці нових нековалентних інгібіторів ферменту M^{pro} [26,33–40]

Фітохімічні екстракти, лікарські рослини та ароматичні трави, що складаються з поліфенолів, терпінолів, флавонолів та їхніх глікозидів, виявили широкий спектр інгібуючої дії і були запропоновані як потенційні антиковідні агенти [36,41–48]. Було опубліковано кілька всебічних оглядів та оновлених даних щодо нещодавніх розробок інгібіторів M^{pro} [49,50].

1.6 Папаїноподібна протеаза PL^{pro}

Папаїноподібна протеаза (PL^{pro}) є доменом Nsp3 масою 35 кДа і частиною багатодоменового білка масою 215 кДа. Ця протеаза розщеплює пептидні зв'язки

між Nsp1 і Nsp2, Nsp2 і Nsp3, а також Nsp3 і Nsp4, вивільняючи три білки: Nsp1, Nsp2 і Nsp3. Крім того, PL^{pro} бере участь у протидії імунній відповіді організму під час вірусної інфекції. Папаїн-подібна протеаза SARS-CoV-2 (PL^{pro}) давно визнана критично важливим ферментом у життєвому циклі вірусу [8].

Вона є високо консервативною, зустрічається у всіх коронавірусах і має низьку схожість послідовності з людськими ферментами [8]. Усі ці характеристики роблять її перспективною мішенню для противірусних препаратів [51]. Деякі дослідження PL^{pro} привели до ідентифікації багатьох інгібіторів, специфічних для PL^{pro} SARS-CoV [52]. Були відкриті як нековалентні, так і ковалентні інгібітори PL^{pro} [33,37,53–56].

Протеаза PL^{pro} вірусу SARS-CoV-2 — це білок, що складається з 315 амінокислотних залишків із високим вмістом цистеїну (3,5%). Доступними стали кілька високороздільних структур вільного PL^{pro} і його комплексів з інгібіторами (PDB: 7JIR, 7CMD, 6WX4, 6WUU, 6XA9, 6XAA) [35,51,57,58].

Структура PL^{pro} містить три домени: невеликий убіквітиноподібний (Ubl) домен на N-кінці, цинк-зв'язувальний домен і каталізуючий домен "великий палець-долоня", який іноді розглядається як два окремі домени (рис. 1.4).

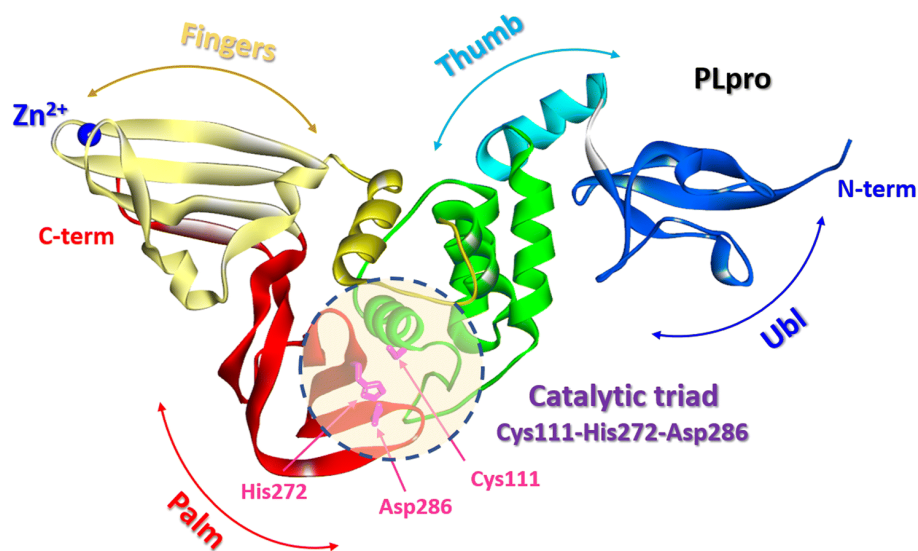


Рис. 1.4 - Структура PL^{pro}: термінальний убіквітинподібний (Ubl) домен, цинк-зв'язуючий домен та каталізаторний домен «великий палець-долоня». Каталітичний активний центр, що містить каталітичну тріаду Cys111-His272-Asp286 (виділений заштрихованим колом) (PDB: 6WX4).

Цинк-зв'язувальний домен, що включає чотири цистеїни, координує структурний катіон Zn^{2+} у піддомені "палець" [52]. Вважається, що цей домен забезпечує структурну цілісність усього білка PL^{pro} [59].

Слід зазначити, що убіквітиноподібний (Ubl) домен на N-кінці PL^{pro} не є специфічним і має схожість з людськими клітинними деубіквітинілюючими ферментами (DUBs), які є протеазами, що розщеплюють убіквітинові ланцюги з білкових субстратів. Інгібітори Ubl можуть впливати на людські DUBs і спричиняти побічні ефекти. Наприклад, Otubain-1 та Otubain-2 є PL^{pro}-подібними цистеїновими протеазами з такою ж каталізуючою тріадою залишків Cys/His/Asp та Asn [60].

Ця проблема може бути однією з можливих причин того, чому значні зусилля у розробці інгібіторів PL^{pro} ще не привели до створення препаратів, схвалених FDA, для терапевтичного впливу на SARS-CoV-2 у людей

Каталітично активний сайт розщеплення цистеїну (також називається активним центром) знаходиться між доменами "великий палець" і "долоня" та містить канонічну каталітичну тріаду цистеїнових протеаз Cys111-His272-Asp286 (рис. 1.4), яка розпізнає послідовність залишків Leu-X-Gly-Gly між вірусними білками nsp1 і nsp2, nsp2 і nsp3, а також nsp3 і nsp4 (nsp1/2, nsp2/3, nsp3/4) та здійснює їх протеоліз — розщеплює їх після другого Gly [51].

Серед усіх цистеїнів PL^{pro}, Cys111 є найбільш схильним до окислення, що вказує на його унікальну реактивність до електрофілів [61]. PL^{pro} зв'язується з вірусними білками через активний центр для виконання своєї біологічної функції. Каталітично активний центр PL^{pro} є консервативною мішенню для ліків серед варіантів SARS-CoV-2. Хоча були виявлені деякі мутації, усі найпоширеніші з них знаходяться на відстані від зв'язувального сайту [62,63].

1.7 Докінг та молекулярно-динамічне моделювання як метод пошуку інгібіторів коронавірусу SARS-Co-V-2

Протягом останніх кількох років інструменти обчислювальної хімії широко застосовувалися для розробки терапії проти коронавірусної хвороби

2019 (COVID-19) [64–66]. Було запропоновано кілька стратегій таргетування, які варіюються від повторного докінгу вже затверджених FDA препаратів з метою їх перепрофілювання проти COVID-19 до специфічного цільового *in silico* скринінгу нових малих молекул, здатних блокувати критичні вірусні протеази, такі як M^{pro} і PL^{pro}, перешкоджаючи дозріванню білків, які є критично важливими для життєвого циклу вірусу [65,67–70].

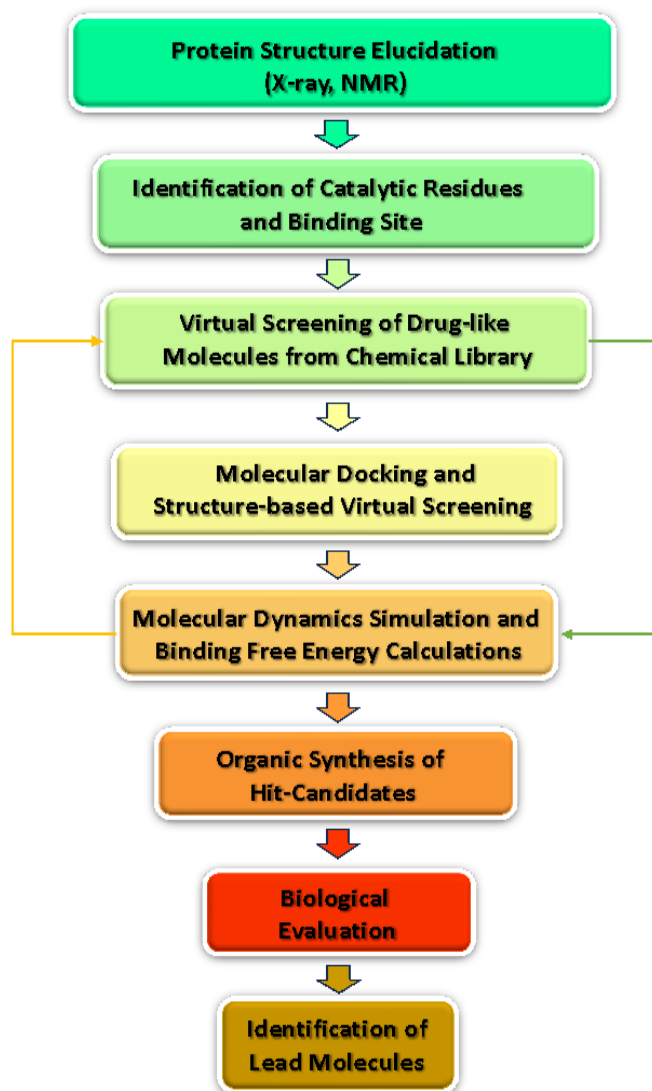


Рис. 1.5 - Схема типового робочого циклу розробки лікарських засобів на основі структури. Відтворюється з дозволу © 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry.

Комп'ютерний дизайн ліків (computer-aided drug design, CADD) — це серія обчислювальних методів, які спрямовані на оптимізацію процесу відкриття та

розробки ліків, зводячи до мінімуму витрати на їх виробництво та час (рис. 1.5) [71,72].

Існує дві основні стратегії CADD: дизайн ліків, що базується на лігандах, і дизайн ліків, що базується на структурах. Дизайн ліків, що базується на структурах (SBDD), потребує знання 3D-структури рецептора та використовує віртуальний скринінг/докінг та молекулярну динаміку. Крім того, деякі нещодавні підходи використовують дизайн ліків на основі послідовностей [73] та фрагментів [74–76]. Типовий робочий процес SBDD представлений на рис. 1.5 [40,69,77–79].

Дизайн ліків, що базується на лігандах, базується на кількісних структура-активнісних зв'язках (QSAR), фармакофорному моделюванні, штучному інтелекті [18] та методах машинного навчання [65,80] (див. рис. 1.6).

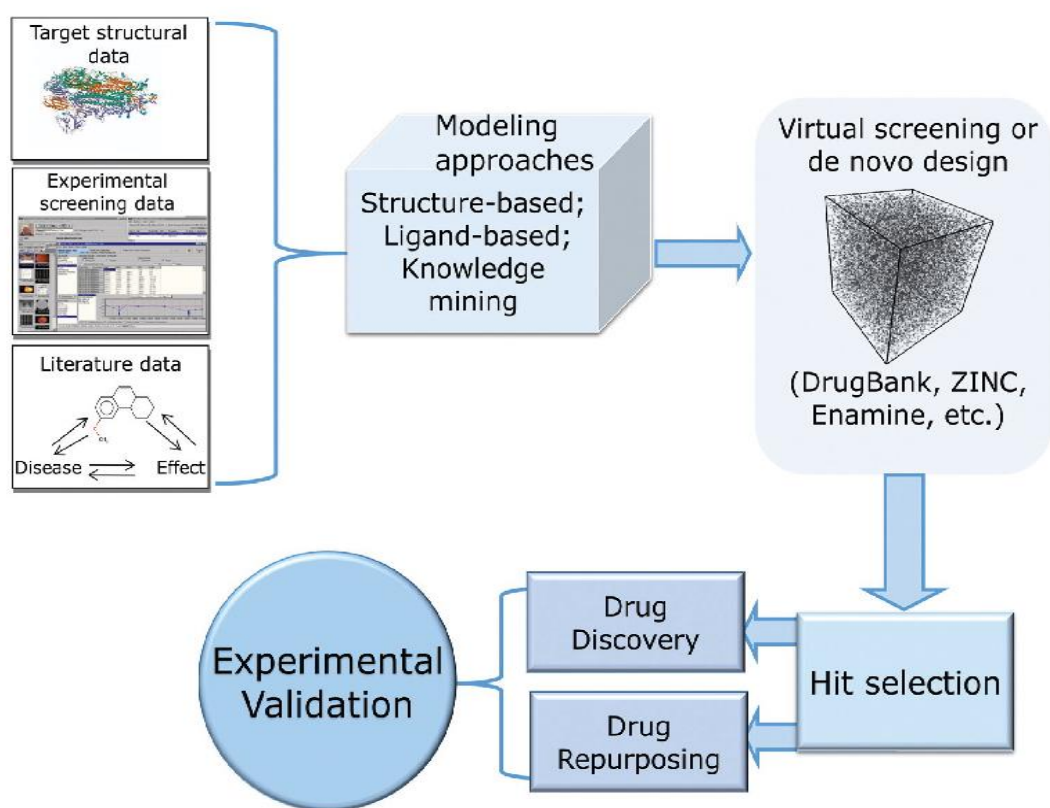


Рис. 1.6 - Загальний робочий процес та ключові підходи в комп'ютеризованому відкритті ліків для терапії проти COVID-19 [81].

1.7.1 Обчислювальні методи в розробці ліків

Швидкий прогрес у розробці нових протикоронавірусних препаратів був досягнутий завдяки критичній ролі комп'ютерних обчислювальних методів та алгоритмів, які стали важливим інструментом у відкритті ліків. Один із популярних робочих процесів комп'ютерної розробки ліків для терапії проти COVID-19 узагальнений на рис. 1.6.

Більшість доступних інструментів для віртуального або *in silico* скринінгу можна поділити на дві великі групи. Перша базується на статистичній методології кількісних структурно-активних взаємозв'язків (QSAR). Друга група включає методи молекулярного моделювання.

1.7.2 Методи QSAR

Різні варіанти використання методів QSAR у контексті досліджень COVID-19 були описані в літературі [69,77,82,83]. Дослідження QSAR проводиться за такими етапами:

(i) збір експериментальних даних: параметри біологічної активності IC_{50} , EC_{50} , RBA (relative binding affinity, відносна афінність зв'язування) або бінарна інформація — активний/неактивний, тощо, визначення набору систем із відомою біологічною активністю;

(ii) розподіл молекулярних систем із відомою активністю на дві групи: тренувальний та тестовий набори;

(iii) обчислення різних молекулярних дескрипторів для кожної молекули з тренувального набору;

(iv) формулювання можливого математичного (статистичного) моделі біологічної активності: множинна та нелінійна регресія, класифікаційні правила (дискримінаційна функція, логістична регресія), штучні нейронні мережі;

(v) валідація отриманої моделі за допомогою тестового набору: порівняння з експериментальними даними, перевірка прогностичних можливостей моделі.

Кожен етап у наведеному списку може включати багато різних підходів. Перший етап (i) передбачає збір експериментальних даних про активність

певних молекул, деталізацію молекулярної структури та створення відповідної бази даних. Завдання (ii) полягає в поділі вибірки на тестову та тренувальну. Завдяки такому розподілу мають бути отримані статистично репрезентативні вибірки. На практиці цей етап визначає успіх подальшої валідації прийнятих статистичних моделей.

Розумний вибір тренувальних та тестових наборів обговорювався в інших джерелах [84]. Завдання (iii) вимагає обчислення широкого набору дескрипторів, що висвітлюють найбільш різноманітні аспекти молекулярної структури.

На сьогодні існують кілька тисяч таких молекулярних дескрипторів, реалізованих у комп'ютерних програмах. Серед популярних програм для обчислення дескрипторів є DRAGON [85] і PaDEL-Descriptor [86]. Сучасна версія DRAGON-7 може обчислювати до 5270 молекулярних дескрипторів, організованих в різні логічні блоки, які відповідають різним аспектам молекулярної структури. Серед цих дескрипторів, окрім 1-, 2- та 3-мі вимірних молекулярних параметрів, таких як конституційні, топологічні та електротопологічні, цей набір також включає деякі індекси, що описують властивості, характерні для лікарських засобів, фізико-хімічні молекулярні властивості тощо. Детальні огляди доступних дескрипторів наведені в інших джерелах [87,88].

Наступна частина (iv) є найскладнішою та багатогранною. Головною проблемою, що пов'язана з використанням широкого набору дескрипторів, ймовірно, є мультиколінеарність і надмірність даних. Тому необхідно зменшити набір дескрипторів і вибрати найважливіші, що мають відношення до активності, яку розглядають. На сьогодні було розглянуто багато підходів для досягнення цієї мети. Серед них слід згадати класичні методи, засновані на аналізі факторної структури задачі. Однак факторний аналіз (або його спрощена версія — головний компонентний аналіз) не зовсім відповідає таким прагматичним цілям, як вибір дескрипторів. Проте така інформація дає більш глибоке розуміння взаємозв'язків між дескрипторами.

Існує кілька методів для зменшення набору дескрипторів і побудови компактних рівнянь регресії. Популярний у останні роки метод генетичних алгоритмів дозволяє генерувати рівняння з заданою кількістю дескрипторів [88]. Окрім повного пошуку та генетичних алгоритмів, слід згадати методи, засновані на стохастичних стратегіях пошуку передбачуваних моделей, такі як метод «мурашиної колонії» [89] та метод «випадкового лісу» [90].

Варто зазначити, що на відміну від підходів регуляризації, ці методи пошуку схильні до перенавчання. Конкуренцією для методу генетичних алгоритмів є відносно новий підхід до проблеми QSAR — метод LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator), який дозволяє однозначно ранжувати дескриптори та побудувати відповідні рівняння регресії з заданою кількістю параметрів [91,92].

Однією з можливих 3D QSAR регресійних моделей є підхід CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis). Метод CoMFA ґрунтується на спостереженні, що переважно міжмолекулярні ефекти, які в основному є нековалентними і залежать здебільшого від молекулярних характеристик і форми, визначають взаємодію ліганд-мішень. Метою CoMFA є вивчення кореляцій між 3D характеристиками молекул і їх біологічною активністю. 3D молекулярні дескриптори – це стеричні (Леннард-Джонса), електростатичні (Кулона) потенціали та, можливо, інші параметри (наприклад, ліпофільність). Особливістю моделі CoMFA є те, що такі параметри обчислюються як тривимірна карта, яка описує задану властивість у просторі. Приклади обчислень CoMFA для проблеми COVID-19 нещодавно були опубліковані [93,94].

Частина (v) є найбільш проблемною на етапі QSAR-досліджень. Важливість перевірки моделей QSPR/QSAR була підкреслена в роботах [84]. Однак лише нещодавно були опубліковані кілька статей, що запропонували коефіцієнти, які характеризують якість отриманих рівнянь [95,96]. Оптимальний розподіл даних на тренувальні та тестові набори також тісно пов'язаний з проблемою валідації. Існує низка публікацій, що обговорюють підходи до такого поділу [97,98]. Історично першими критеріями валідації, що використовувалися

для оцінки ефективності моделей, були кілька індексів, які нині відомі як "внутрішня валідація". Серед них відомі коефіцієнт детермінації (R^2) і корінь середнього квадратичного відхилення (RMSD), обчислені для тренувального набору. Крім того, відповідні значення R^2 і RMSD отримували за допомогою методу Leave-One (або Many)-Out крос-валідації та методів статистичного бутстрепінгу (англ. *bootstrap*, *bootstrapping*) [99]. "Зовнішня валідація" переважно використовує обчислення різних параметрів для тестового набору.

Другу групу методів *in silico* в розробці ліків складають методи молекулярного моделювання (ММ). ММ включає обчислювальні підходи, які зосереджуються на безпосередньому моделюванні зв'язування ліганд-протеїн і скринінгу для виявлення перспективних молекулярних структур. Загалом можна окреслити наступні кроки для такого моделювання:

(i) ідентифікація мішені (білки, зв'язувальні сайти), збір експериментальних даних скринінгу, збір даних про активність препаратів, створення або вибір бази даних; (ii) віртуальний скринінг (*virtual screening*); (iii) моделювання на основі структури, докінг; (iv) виявлення хітів; (v) генерація лідерів (оптимізація); (vi) валідація *in vitro*, та *in vivo*.

На етапі (i) існує багато важливих баз даних, що містять інформацію про біологічну активність (особливо щодо COVID-19) та теоретичні дослідження відомих сполук.

На етапі (ii) ці дані з публічних баз даних, а також локальних баз даних можуть бути використані для подальшого скринінгу проти вибраних білків. Метою віртуального скринінгу є вибір підмножини хімічних бібліотек, щоб вони були збагачені сполуками, які мають бажану афінність до заданої мішені.

1.7.3 Віртуальний скринінг на основі фармакофорів

Віртуальний скринінг на основі фармакофорів є важливим підходом у сучасному проєктуванні ліків [100,101]. Фармакофори зазвичай визначаються як важливі хімічні особливості, що відповідають ефективним взаємодіям ліганд-протеїн [102]. Іншими словами, фармакофор можна розуміти як області в

тривимірному просторі, де певні функціональні групи можуть призводити до ефективних міжмолекулярних взаємодій.

На практиці обчислення молекулярного докінгу значною мірою залежать від програмного забезпечення (таблиця 1.2). Програма AutoDock (MGLTools) [103] вимагає виконання деяких налаштувань, таких як вибір осередку докінгу, сітковий простір тощо, вручну. З іншого боку, більшість цих процедур автоматизовані в програмі LigandScout [104]. Критична оцінка програм докінгу та функцій оцінки в термінах відтворення кристалографічно визначених структур білок/ліганд проаналізована в роботі [105].

Таблиця 1.2

*Доступне програмне забезпечення та онлайн-інструменти для
розрахунків з молекулярного докінгу*

Програмне забезпечення	Опис	Посилання
1	2	3
AutoDock	Програмне забезпечення для моделювання молекул з відкритим кодом для докінгу білка з лігандами.	[106]
AutoDock Vina	Використовує вдосконалений метод локального пошуку та складний метод оптимізації градієнта, що забезпечує приблизно дворазове покращення швидкості та точності передбачення режимів зв'язування порівняно з AutoDock.	[107,108]

Продовження Таблиці 1.2

1	2	3
GOLD	Перевірене, конфігуроване програмне забезпечення для докінгу білка з лігандами, яке застосовується для експертного віртуального скринінгу, оптимізації лідерів та відкриття лікарських засобів.	[109]
Schrödinger	Набір програмного забезпечення, що має велику кількість додатків для різних моделювань, аналізу та обчислювальних завдань. Він дозволяє використовувати як методи, засновані на ліганді, так і на структурі. Для використання потрібна ліцензія.	Schrödinger Release 2023-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023
LigandScout	Програмне забезпечення для розширеного молекулярного дизайну, яке використовує концепцію створення 3D фармакофорних моделей, отриманих із структурних даних комплексів макромолекул з лігандами. Для використання потрібна ліцензія.	[104]
SwissDock	Веб-сервіс для прогнозування молекулярних взаємодій, які можуть виникнути між цільовим білком і низькомолекулярною сполукою.	[110]

Продовження Таблиці 1.2

1	2	3
FlexX	Автоматизований інструмент для докінгу, що використовує ультра-швидкий підхід для прогнозування режиму зв'язування лігандів на цільовому зв'язувальному сайті.	[111]
Molecular Operating Environment (MOE)	Програмна платформа для відкриття лікарських засобів, яка інтегрує візуалізацію, моделювання та симуляції, а також розробку методології в одному пакеті програм. Для використання потрібна ліцензія.	Molecular Operating Environment (MOE). (2023). 2022.02 Chemical Computing Group ULC. Montreal

Було опубліковано численні дослідження молекулярного докінгу в контексті перепрофілювання та відкриття потужних нековалентних і ковалентних інгібіторів для критичних протеаз вірусу SARS-CoV-2 [25,37,112–116]. Огляд наукової літератури за 2021-2022 роки з цією тематикою надано в інших джерелах [7,64,65,117].

У успішних прикладах досліджень перепрофілювання лікарських засобів фармакофорний віртуальний скринінг був використаний у поєднанні з іншими інструментами, такими як машинне навчання, молекулярно-динамічне моделювання та експериментальні валідаційні аналізи *in vitro* (рис. 1.7, А). Такий комбінований підхід використовувався для відкриття маломолекулярних інгібіторів M^{pro} з мікромольною активністю шляхом застосування фармакофорного віртуального скринінгу для ідентифікації функціональних хімічних груп, відповідальних за молекулярне розпізнавання лігандів зв'язувальним сайтом M^{pro} (рис. 1.7, В, С) [101].

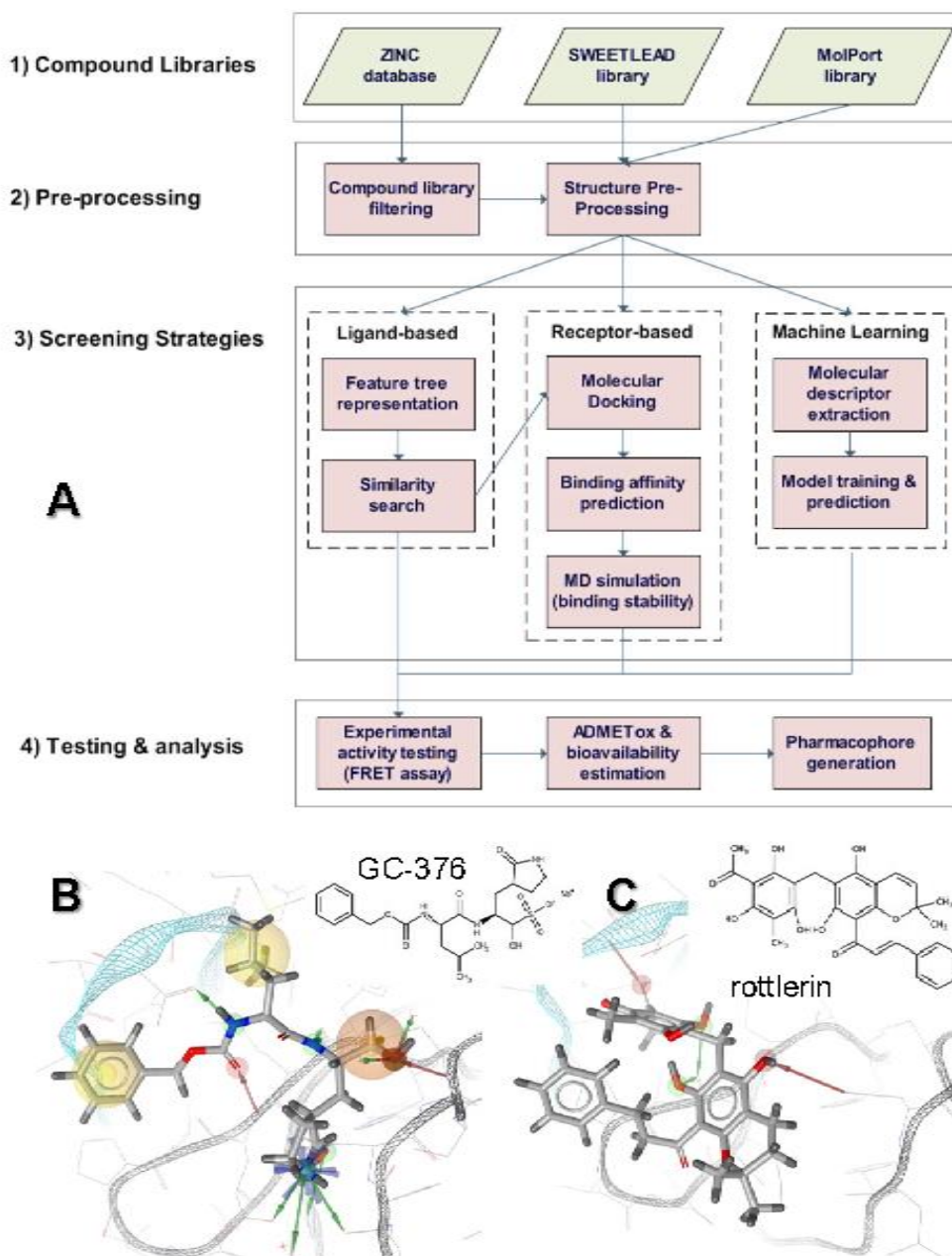


Рис. 1.7 - Приклад фармакофорно-орієнтованого *in silico* скринінгу: А – схема робочого процесу скринінгу, що працює з бібліотекою з більш ніж 1 мільярду сполук із баз даних ZINC, SWEETLEAD та MolPort. Вибраний набір сполук був попередньо відфільтрований з фокусом на хімічні речовини, які доступні для комерційного використання. Зменшений набір даних підлягав рецептор-орієнтованому скринінгу, після чого проводився ліганд-орієнтований скринінг. Останній етап містив рецептор-орієнтований скринінг та скринінг на основі машинного навчання; В – фармакофорна модель для M^{pro} , отримана на основі референтного інгібітора GC-376/GC-373 (PDB ID 7D1M) за допомогою

пакету LigandScout; С – фармакофорна модель для M^{pro} , отримана на основі інгібітора роттлерину [81].

1.7.4 Молекулярно-динамічне моделювання комплексів білок-ліганд

Метод молекулярно-динамічного (МД) моделювання обчислює та аналізує фізичні рухи атомів і молекул протягом певного періоду часу. Траєкторії атомів і молекул обчислюються шляхом чисельного розв'язання рівнянь руху Ньютона для системи взаємодіючих частинок, де сили між частинками та їх потенціальні енергії часто обчислюються за допомогою міжатомних потенціалів або молекулярно-механічних силових полів [118]. Основи МД моделювання наведені в інших джерелах [119].

Останніми роками МД моделювання стало одним із найпоширеніших обчислювальних методів у біомолекулярних симуляціях. Основні переваги МД-техніки наступні: 1) вона використовує емпіричні молекулярно-механічні (ММ) силові поля, які мають дуже низькі вимоги до ресурсів CPU/GPU; 2) їх можна використовувати для вивчення часу-залежних явищ на атомарному рівні протягом мікросекунд, що відповідає часовим масштабам багатьох біохімічних процесів. Популярне програмне забезпечення для МД моделювання і його можливості підсумовані в таблиці 1.3.

Атомарне МД моделювання є потужним інструментом для дослідження стабільності та конформаційної динаміки білків і їх комплексів з лігандами. Середньоквадратичне відхилення (root-mean square displacement, RMSD) характеризує відхилення набору координат білка від еталонного набору координат. RMSD обчислюється шляхом найменших квадратів, підганяючи миттєву структуру (τ_2) до її кристалографічної або попередньо врівноваженої структури ($\tau_1=0$) за формулою (1.1):

$$RMSD(\tau_1, \tau_2) = \left[\left[\frac{1}{N} \right] \sum_{i=1}^N \| r_i(\tau_1) - r_i(\tau_2) \|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1.1)$$

де N і $r_i(\tau)$ — це кількість атомів, а також позиція атома i та його еталонна позиція в часі τ [120,121].

Багато прикладів використання МД моделювання для дослідження структури білка SARS-CoV-2, фолдингу, режиму зв'язування з лігандами представлені в літературі [115,122–129]. У такому МД моделюванні типовий масштаб часу для розрахунків становив близько сотень наносекунд; однак у деяких роботах цей час вже досягав 100 мікросекунд, як у випадку нещодавнього МД моделювання алостеричного інгібіювання SARS-CoV-2 M^{pro} [130]. Іншим прикладом є гомологічне моделювання у поєднанні з повноатомним МД моделюванням і методом Poisson-Boltzmann (MMPBSA), які були виконані для дослідження тривимірної будови білка Spike та його інтерфейсу з людським рецептором ACE2 [141]. В результаті було виявлено двадцять взаємодіючих залишків у білку Spike, які відповідальні за щільний зв'язок з рецептором ACE2 [141] та [131].

Таблиця 1.3

Доступне програмне забезпечення для молекулярно динамічних розрахунків

Програмне забезпечення	Опис	Посилання
1	2	3
GROMOS	GRONingen MOlecular Simulation (GROMOS) — це програмний пакет для класичного МД моделювання, розроблений Університетом Гронінгена та Швейцарським федеральним інститутом технологій (ETH Цюрих). Необхідна ліцензія.	[132]

Продовження Таблиці 1.3

1	2	3
GROMACS	GROMACS (Groningen MACHine for chemical simulation) — це ефективна та універсальна програма з відкритим кодом для класичного МД моделювання, що підходить для моделювання біологічних макромолекул у водних середовищах. Вона сумісна з різними силовими полями, такими як GROMOS, OPLS, AMBER та ENCAD. Реалізовані силові поля для повноатомого, атомістичного та великозернистого моделювання.	[120]
NAMD	NAMD — програма для високопродуктивних біомолекулярних симуляцій, що базується на відкритих кодах, оптимізованих для виконання на паралельних суперкомп'ютерах та кластерних робочих станціях. Вона сумісна з силовим полем CHARMM.	[133]
CHARMM	CHARMM (chemistry at HARvard molecular mechanics) — це програма для MD-симуляцій, основною метою якої є дослідження біологічних молекул, таких як білки, пептиди, ліпіди, нуклеїнові кислоти, вуглеводи та малі молекули лігандів.	[134]
AMBER	AMBER — набір програм для біомолекулярного МД моделювання, поділених на три основні етапи: підготовка системи (програми antechamber, LEaP), моделювання (програма sander) та аналіз траєкторій (програма аналізу ptraj). Необхідна ліцензія.	[135]

Продовження Таблиці 1.3

1	2	3
LAMMPS	LAMMPS (large-scale atomic/molecular massively parallel simulator) — це програмне забезпечення з відкритим кодом класичного МД моделювання у матеріалознавстві. Вона має бібліотеку міжмолекулярних потенціалів для м'яких матеріалів (біомолекул, полімерів), твердих матеріалів (металів, напівпровідників) та зернистих або мезоскопічних систем.	[136]
DL_POLY	DL_POLY — універсальний пакет для МД моделювання, що використовується для дослідження рідин великої складності.	[137]

За останні два роки проведено численні дослідження атомістичних MD-симуляцій структури та динаміки протеаз M^{pro} і PL^{pro} , Spike-білка та їхніх комплексів з нековалентними інгібіторами [115,126,131,138,138–152]. Різні фізико-хімічні властивості, такі як картографування сайтів та пандемічні мутації, стали предметом досліджень [138,153]. Оцінювалася роль температури в термічній стабільності ферменту та його комплексів [144]. Залежно від дослідницьких стратегій та використаного програмного забезпечення, застосовувалися різні біомолекулярні силові поля, зокрема AMBER [124,131,138,143,144,147], OPLS-AA [139,140,148], CHARMM27 [153], CHARMM36 [141,142,146,149], Gromos G43a1 [151,154] та G54a7.

1.8 Існуючі інгібітори головної протеази M^{pro}

Популярні стратегії раціонального дизайну та відкриття нових інгібіторів часто ґрунтуються на перепроєктуванні, оптимізації за принципом «hit-to-lead» і сприяли розширенню спектру доступних найбільш ефективних інгібіторів. Нещодавно перепроєктування відомого інгібітора перампанелю відбувалося на основі моделювання МД розрахунків вільної енергії, кінетичних параметрів та

рентгеноструктурного аналізу з високою роздільною здатністю (PDB ID: 7M8M, 7M8N, 7M8O), що дозволило отримати серію нековалентних, непептидних інгібіторів зі значеннями IC_{50} в діапазоні 20-40 нМ, які показано на рис. 1.8 [155–157].

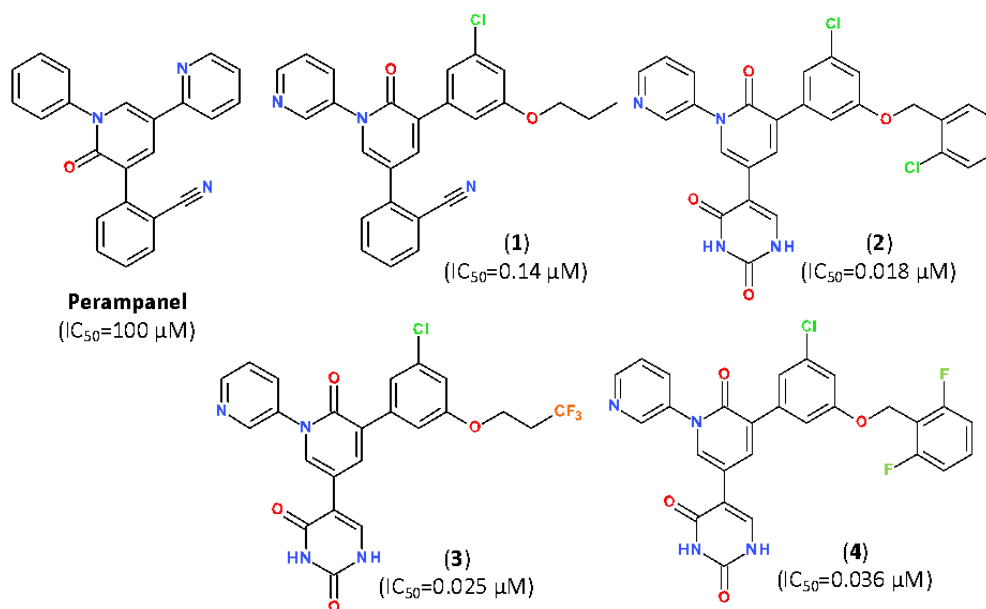


Рис. 1.8 - Структура аналогів Перампанелю, які інгібують активність M^{pro} .

Розробка нековалентних інгібіторів коронавірусу M_{pro} після спалаху SARS-CoV-1 призвела до відкриття інгібітору ML300, який також виявив високу активність проти SARS-CoV-2 [158]. Починаючи зі сполуки ML300, було проведено оптимізацію на основі структури проти протеази M_{pro} вірусу SARS-CoV-2, використовуючи рентгеноструктурний аналіз ферментів M^{pro} в комплексі з кількома інгібіторами на основі ML300, включаючи оригінальний ліганд ML300, в результаті чого було відкрито низку потужних інгібіторів з наномольними значеннями IC_{50} , які показано на рис. 1.9.

Рентгенівські структури їхніх комплексів з M^{pro} показали, що виявлені інгібітори використовують нековалентний спосіб дії та неканонічний спосіб зв'язування (PDB ID: 7MLD, 7MLE, 7MLF) [159].

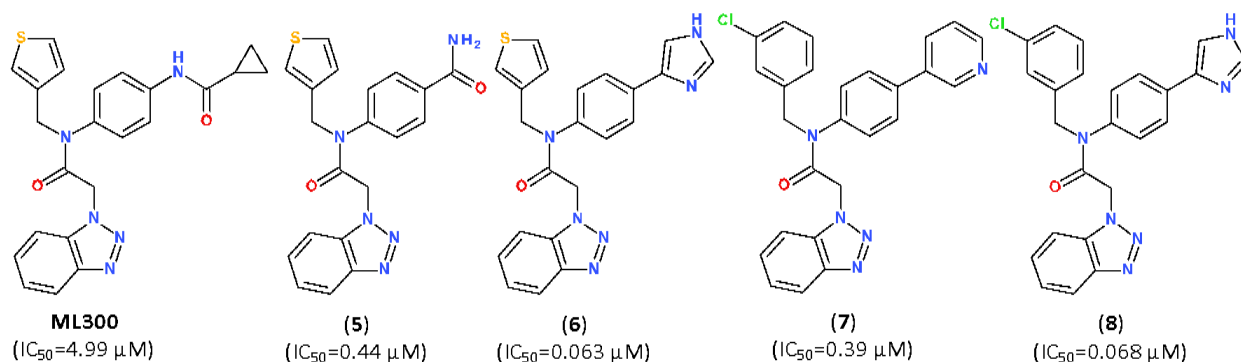


Рис. 1.9 - Структура нековалентних інгібіторів M^{pro} на основі скелету ML300.

Нековалентний інгібітор MCULE-5948770040 був вперше ідентифікований за допомогою масштабованого високопродуктивного віртуального скринінгу цільової бібліотеки сполук, що містила понад 6,5 мільйона молекул (рис. 1.10) [160]. Режим зв'язування нововідкритого інгібітора був підтверджений за допомогою рентгенівської кристалографії при кімнатній температурі (PDB: 7LTJ), а біохімічні аналізи оцінили його інгібуючу активність з помірною константою інгібування IC_{50} , яка становить 4,2 мМ (рис. 1.10).

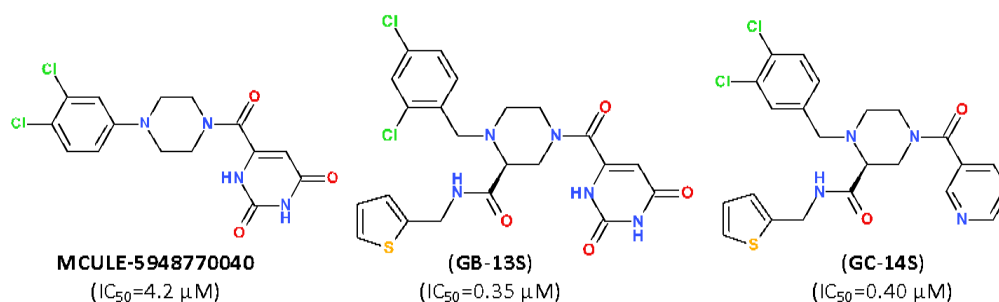


Рис. 1.10 - Структура нековалентного інгібітора MCULE-5948770040 та його оптимізованих похідних.

Зберігаючи 1,2,4-тризаміщений піперазиновий скелет, було виконано подальший раціональний дизайн на основі структури, що призвело до відкриття серії нових потужних нековалентних інгібіторів, серед яких GB-13S та GC-14S продемонстрували чудову селективність щодо SARS-CoV-2 M^{pro} , високу противірусну активність і низьку цитотоксичність ($CC_{50} > 100 \mu M$). Крім того,

їхні кристалічні структури у співкристалах (PDB ID: 8ACL, 8ACD) підтвердили, що ці інгібітори займають кілька підкишень через критичні нековалентні взаємодії [35].

Нещодавно був відкритий новий нековалентний непептидний інгібітор S-217622 (Ensitrelvir) за допомогою стратегії дизайну ліків на основі структури (SBDD), що розпочалася з віртуального скринінгу і була продовжена рентгенівським аналізом (PDB ID: 7VTH, 7VU6) та біологічною оцінкою бібліотеки внутрішніх сполук (рис. 1.11) [161]. Сполука S-217622 показала високу противірусну активність *in vitro* проти всіх нині циркулюючих варіантів SARS-CoV-2, включаючи Delta та Omicron, і продемонструвала сприятливі фармакокінетичні профілі *in vivo* для щоденного прийому перорально. Це робить її універсальним широкоспектральним противірусним кандидатом для клінічного лікування COVID-19 [161–163].

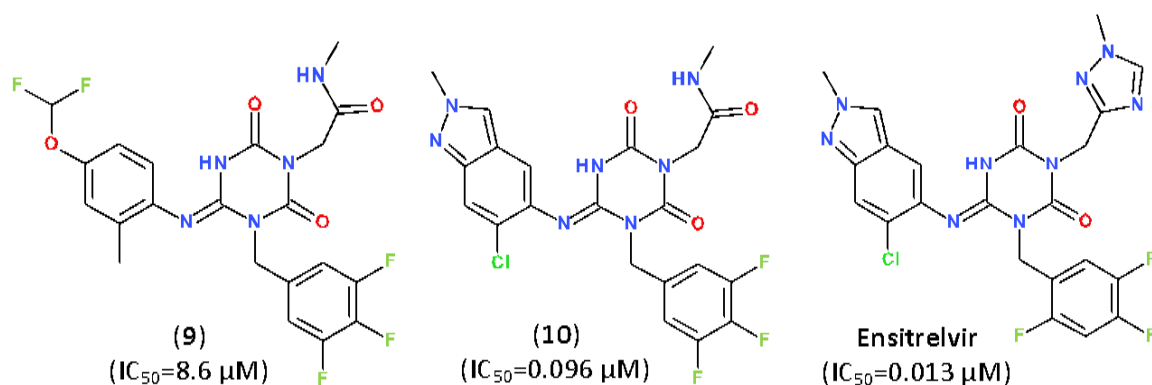


Рис. 1.11 - Нековалентний перорально активний агент Ensitrelvir (S-217622) та його аналоги з потужною широкоспектральною антикоронавірусною активністю.

Було повідомлено про серію специфічних нековалентних інгібіторів M^{pro} [37]. WU-04 також інгібує M^{pro} SARS-CoV та здатний ефективно пригнічувати реплікацію SARS-CoV-2 у MERS-CoV із високою ефективністю, подібною до PF-07321332 (Nirmatrelvir) у людських клітинах з EC₅₀ у діапазоні 10 нМ (див. рис. 1.12).

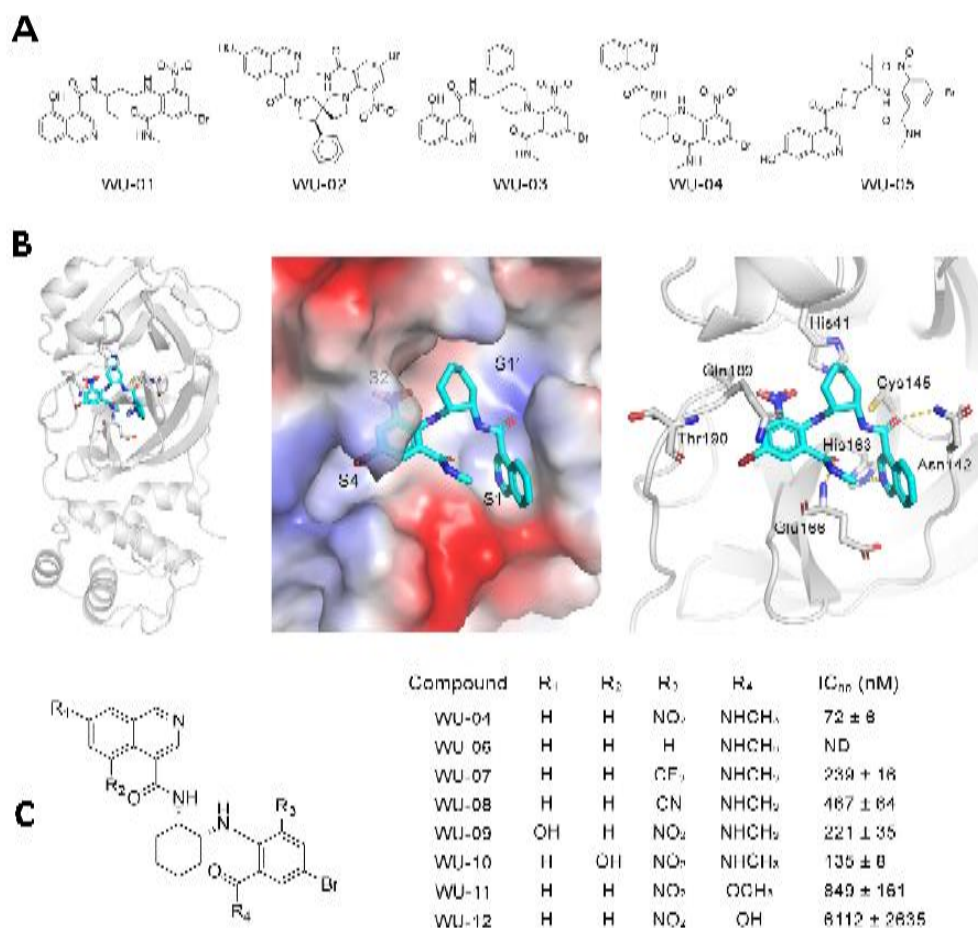


Рис. 1.12 - (A) Структура нековалентних інгібіторів M^{pro} SARS-CoV-2, які містять ізохінолінове кільце та бромофенільне кільце. (B) Зв'язування нековалентного інгібітора WU-04 у каталітичній кишені M^{pro} SARS-CoV-2. (C) Сім аналогів WU-04 та їхня інгібіторна активність проти M^{pro} SARS-CoV-2, оцінена за допомогою флуоресцентного аналізу. Відтворюється з дозволу © 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry [30].

Кілька перспективних стратегій для розробки інгібіторів M^{pro} використовують пептидоміметичні скелети [27,55,164–169]. Структурно спрямований дизайн прямих противірусних препаратів, який використав ефект гем-диметилу і інгібував протеазу M^{pro}, дозволив ідентифікувати серію високоактивних ковалентних інгібіторів, представлених на рис. 1.13. Вони інгібували як 3CL протеази SARS-CoV-2, так і MERS-CoV у біохімічних та

клітинних тестах. Зв'язувальний режим нових інгібіторів був підтверджений рентгено-структурним аналізом (PDB ID: 8F44, 8E5X) [170].

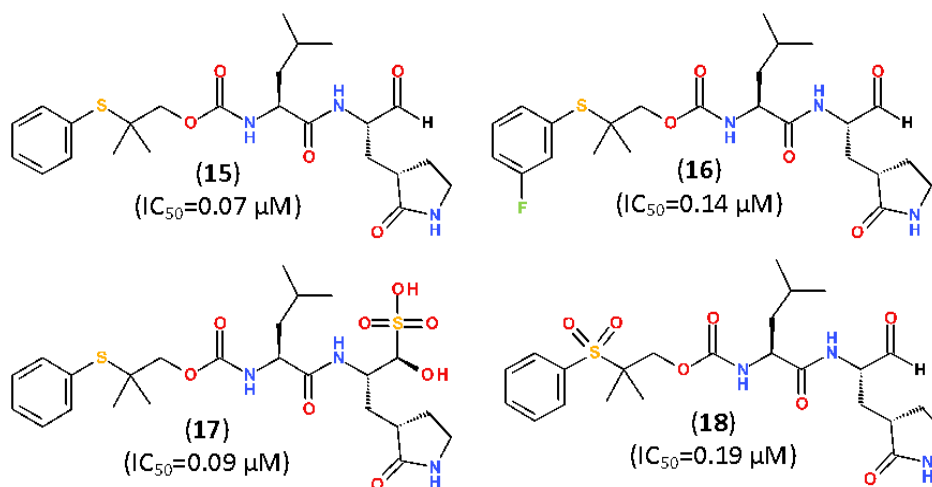


Рис. 1.13 - Прямо діючі ковалентні інгібітори M^{pro} , які використовують ефект гем-диметилу [30].

Було відкрито та охарактеризовано численні пептидоподібні інгібітори протеази M^{pro} , що діють ковалентно [31,52,171–175]. Ковалентні інгібітори мають реактивну функціональну групу, яка утворює тимчасовий ковалентний зв'язок під час реакції з нуклеофільним тіолом цистеїну. Популярні реактивні групи включають альдегіди та кетони, які утворюють гемтіоацетали, і нітрили, що формують зворотній тіоімідат (рис. 1.14) [50].

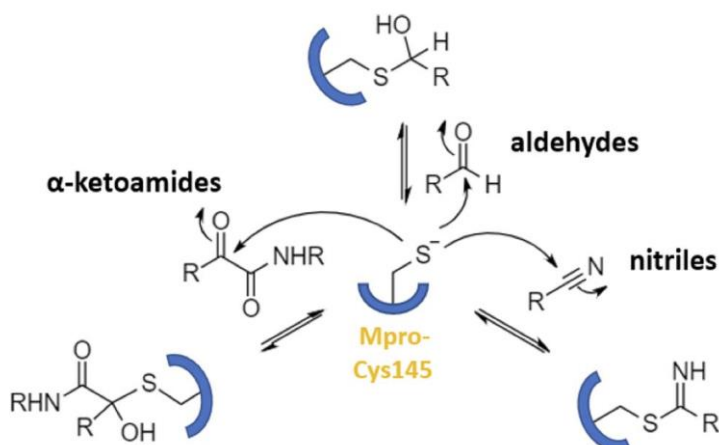


Рис. 1.14 - Різні механізми ковалентного інгібування M^{pro} , що включають α -кетоаміди, альдегіди та нітрили. Відтворюється з дозволу © 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry [30].

Деякі з ковалентних інгібіторів M^{pro} узагальнені на рис. 1.15.

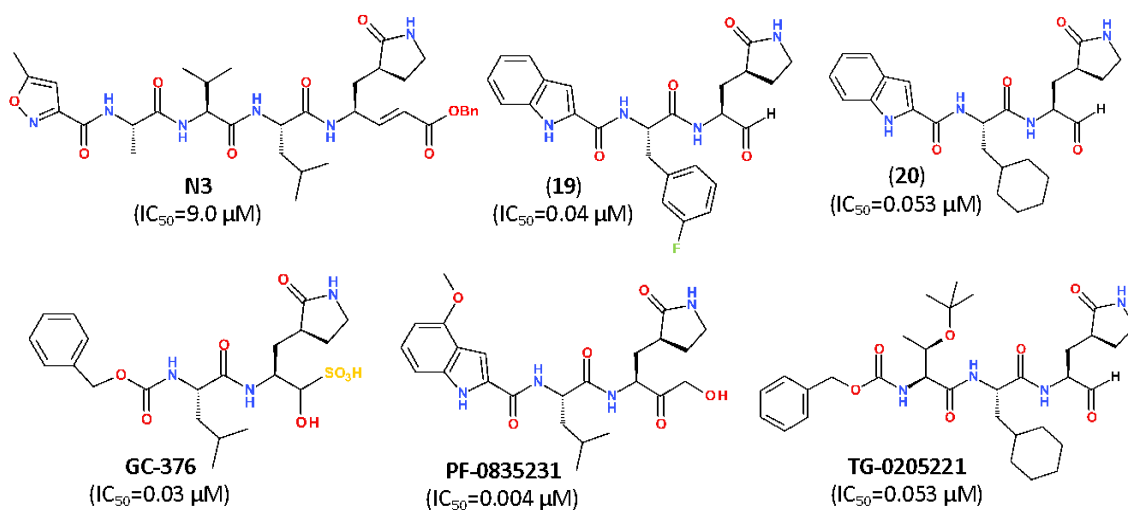


Рис. 1.15 Відомі пептидоміметичні інгібітори M^{pro} з високою інгібіторною активністю (мМ) [30].

Не зважаючи на те, що деякі препарати, схвалені FDA для лікування гепатиту С (HCV), такі як Нарлапревір та Боцепревір, також продемонстрували високу ефективність проти SARS-CoV-2 [31,55,176,177], їхнє клінічне використання досі не було зареєстроване (рис. 1.16). Нірматрелвір (PF-07321332) є одним з небагатьох інгібітором протеази M^{pro} , схваленим для медичного використання проти SARS-CoV-2 (рис. 1.16) [178–180].

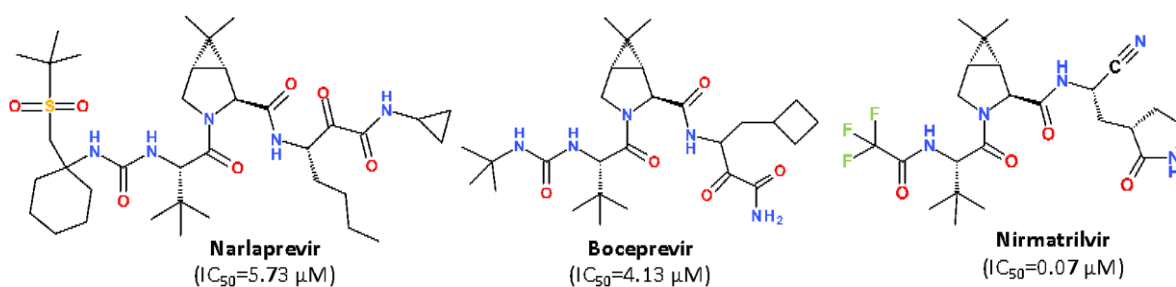


Рис. 1.16 - Хімічна структура Нарлапревіру, Боцепревіру та Нірматрелвіру.

Нірматрелвір у поєднанні з ритонавіром доступний як комбінований противірусний препарат “Paxlovid” для перорального застосування, розроблений Pfizer [181,182]. Вважається, що ритонавір має синергічний ефект на противірусну активність [183,184].

1.9 Існуючі інгібітори папаїноподібної протеази PL^{pro}

Як зазначалося вище, з точки зору структури PL^{pro} виглядає менш привабливою мішенню для розробки ліків у порівнянні з M^{pro} через структурну схожість із людськими білками DUBs. Тим не менш, зростаюча кількість сучасних досліджень інгібіторів PL^{pro} свідчить про те, що він залишається однією з перспективних мішеней для розробки маломолекулярних терапевтичних засобів проти вірусу SARS-CoV-2.

Ковалентні пептидні інгібітори VIR250 і VIR251, що складаються з імітаційного пептидного зв'язку Gly–Gly та реактивного електрофілу, виявилися активними та селективно інгібували PL^{pro} SARS-CoV-1 і SARS-CoV-2, однак вони показали значно слабшу активність проти PL^{pro} MERS і людського DUB UCH-L3 [57].

Молекулярну основу встановленої специфічності інгібіторів було з'ясовано шляхом PCA аналізу структури PL^{pro} у комплексі з пептидоміметиком VIR250 (рис. 1.17).

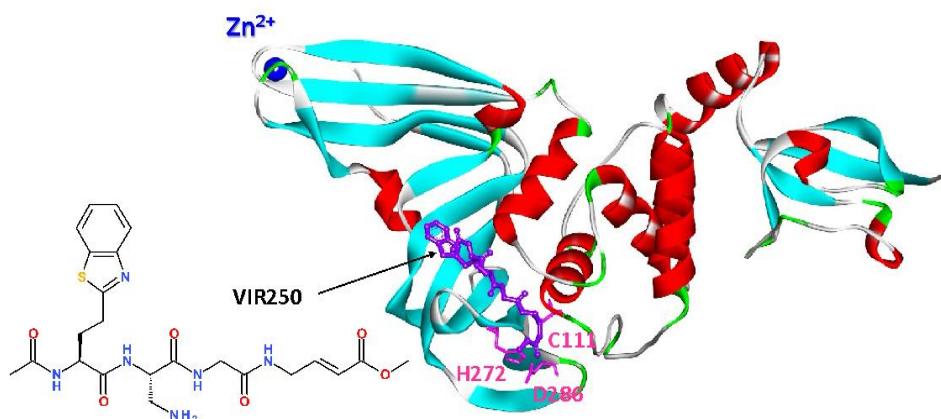


Рис. 1.17 - PCA структура PL^{pro} в комплексі з ковалентним пептидним інгібітором VIR250 (PDB: 6WUU). Відтворюється з дозволу © 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry [30].

Однак значні зусилля зосереджені на розробці нековалентних інгібіторів PL^{pro} [55]. Нековалентний інгібітор на основі нафталіну GRL0617 (рис. 1.18) спочатку було розроблено як інгібітор PL^{pro} SARS-CoV, і він не виявив інгібіторної активності щодо інших протеаз людини [185]. Ранні випробування

показали, що напівмаксимальна інгібіторна концентрація (IC_{50}) GRL0617 становила 1,5 мМ, тому його структура виявилася перспективною для розробки серії його аналогів [51,55,56,186].

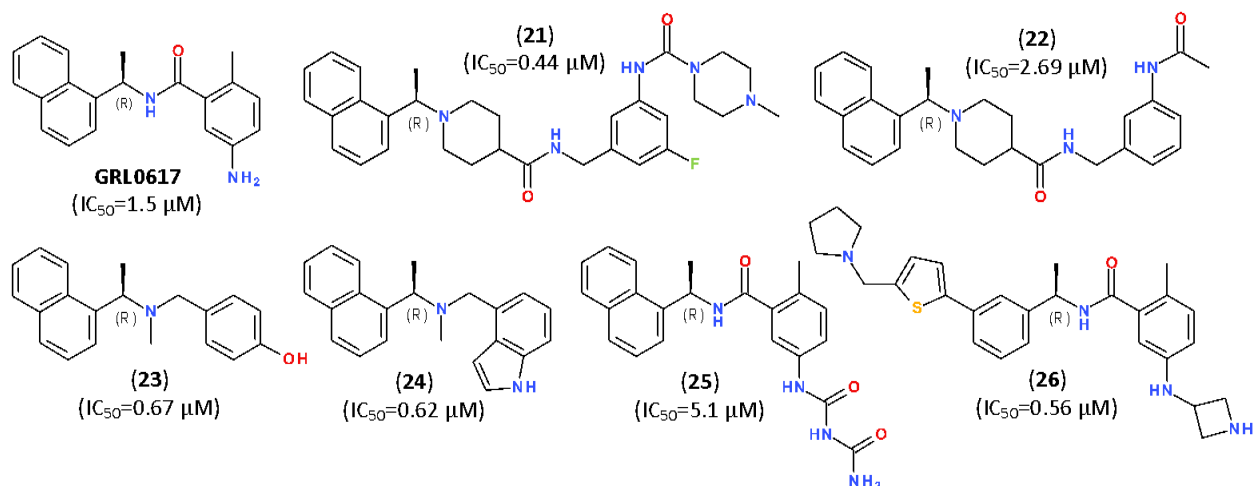


Рис. 1.18 - Високоєфективні інгібітори PL^{pro} , розроблені на основі скелету інгібітора нафталенового типу GRL-0617.

Останнє дослідження з репозиціювання препаратів проти HCV показало, що чотири інгібітори протеази HCV — симепревір, ваніпревір, парітопревір і гразопревір — також інгібували PL^{pro} SARS-CoV-2. Ці препарати проти HCV, які діють на PL^{pro} , синергічно працювали з інгібітором вірусної полімерази ремдесивіром (рис. 1.19), пригнічуючи реплікацію вірусу та збільшуючи противірусну активність ремдесивіру до 10 разів [187].

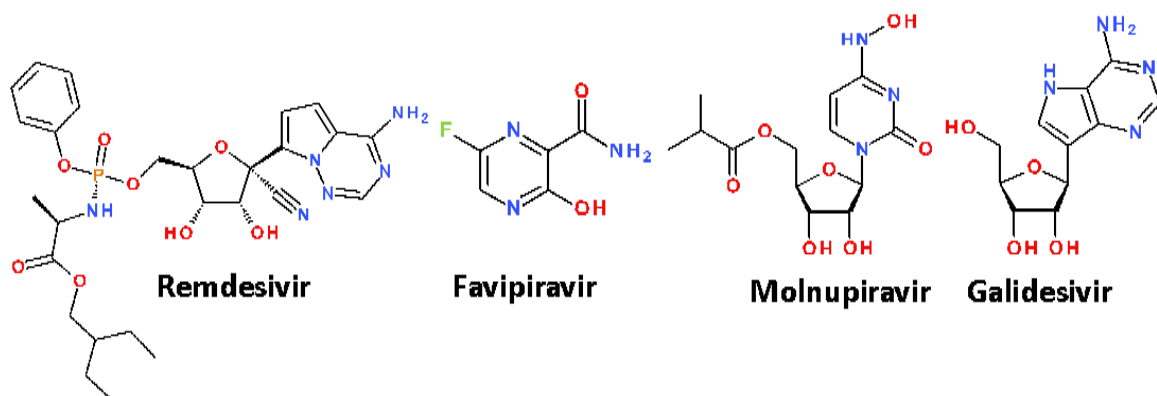


Рис. 1.19 - Деякі нуклеозидні аналоги, доступні для лікування COVID-19.

Було показано, що деякі інгібітори людської убіквітин-карбоксил-термінальної гідролази-2 (USP2), такі як аналоги тіопуринів, здатні інгібувати протеази PL^{pro}. Наприклад, 6-тіогуанін блокує реплікацію SARS-CoV-2 шляхом інгібування PL^{pro} із значенням EC₅₀ приблизно 2 мМ [188].

Використовуючи віртуальний скринінг у поєднанні з дослідженнями цитотоксичності *in vitro*, було встановлено, що похідна 1,3-бензотіазолу, відома як ZINC9325709 або Z93, виявила високу активність проти PL^{pro} [189].

Віртуальний скринінг хімічних бібліотек [169], що складаються з понад 50 тисяч сполук, дозволив розробити та синтезувати інші структурно різноманітні сполуки-лідери, здатні нековалентно інгібувати PL^{pro} коронавірусів із низькими IC₅₀ *in vitro* [190–192], що узагальнено на рис. 1.20.

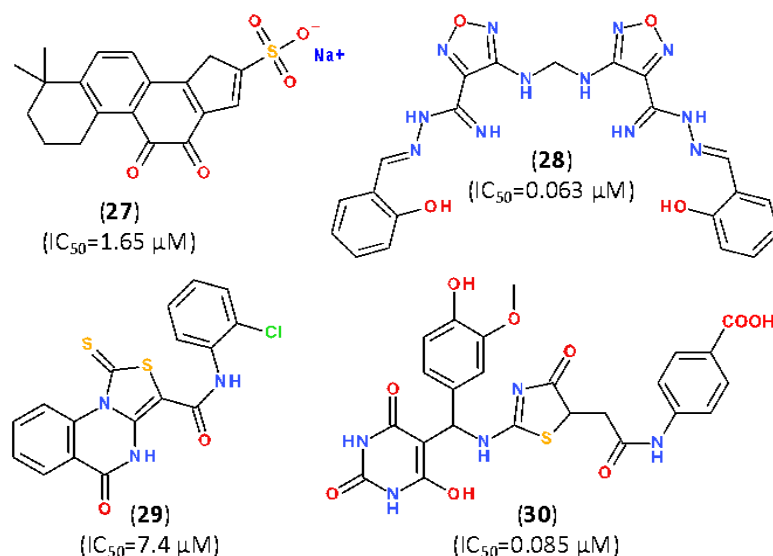


Рис. 1.20 - Структурно різноманітні інгібітори ферменту PL^{pro} SARS-CoV-2.

Окрім синтетичних низькомолекулярних інгібіторів, деякі природні сполуки, такі як флавоноїди, також виявили інгібуючу активність проти ферменту PL^{pro} [43,49,193].

1.10 Дуальні та мульти-таргетні інгібітори ферментів SARS-CoV-2

Сучасні тенденції у розробці лікарських засобів проти COVID-19 спрямовані на створення мульти-таргетних інгібіторів, здатних ефективно діяти

на кілька ключових білків SARS-CoV-2 [192,194–198]. Можливість ідентифікації інгібіторів із подвійною активністю проти M^{pro} та PL^{pro} підвищує шанси на успішну розробку препаратів проти нових варіантів SARS-CoV-2 [52,119,199–202]. Деякі дослідження вже виявили сполуки, які діють як подвійні інгібітори протеаз SARS-CoV-2, орієнтовані на M^{pro} та PL^{pro} (рис. 1.21) [203].

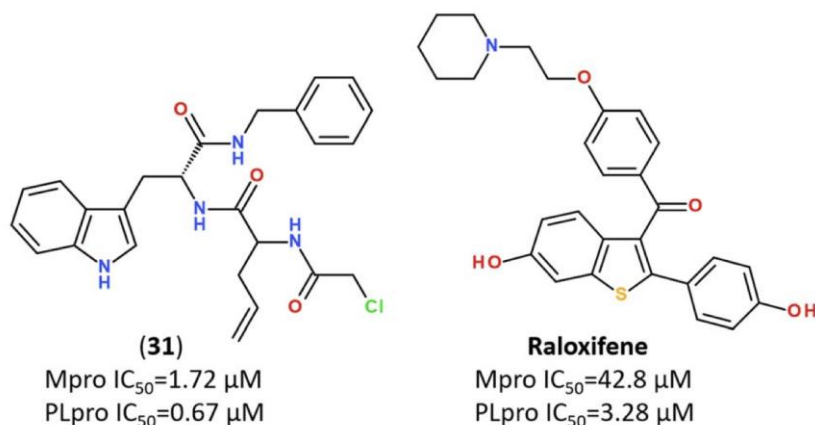


Рис. 1.21 - Інгібітори подвійного призначення проти ферментів M^{pro} та PL^{pro} .

Під час *in silico* скринінгу 688 нафтохіноїдових похідних проти M^{pro} протеази SARS-CoV-2 було ідентифіковано 24 похідні для подальшої оцінки у біохімічних тестах, серед яких чотири виявилися активними проти як проти M^{pro} , так і PL^{pro} . Ці чотири похідні інгібували M^{pro} зі значеннями IC_{50} в діапазоні від 0,41 мМ до 9,0 мМ, тоді як три з них інгібували PL^{pro} із IC_{50} від 1,9 мМ до 3,3 мМ відповідно [203].

Було також виконано скринінг лікарських сполук, таких як похідні фууро[2,3-d]піримідинів, а також інших 74 сполук як потенційних інгібіторів активних сайтів і модуляторів алостеричних гарячих точок M^{pro} і PL^{pro} SARS-CoV-2 [204]. Крім того, повідомляється, що певні лікарські рослини, такі як *Eurycoma harmandiana*, *Sophora flavescens* та *Andrographis paniculata*, містять фітосполуки (терпеноїди, флавоноїди та їх глікозиди), які діють проти PL^{pro} і M^{pro} протеаз вірусу SARS-CoV-2 [45,196,205].

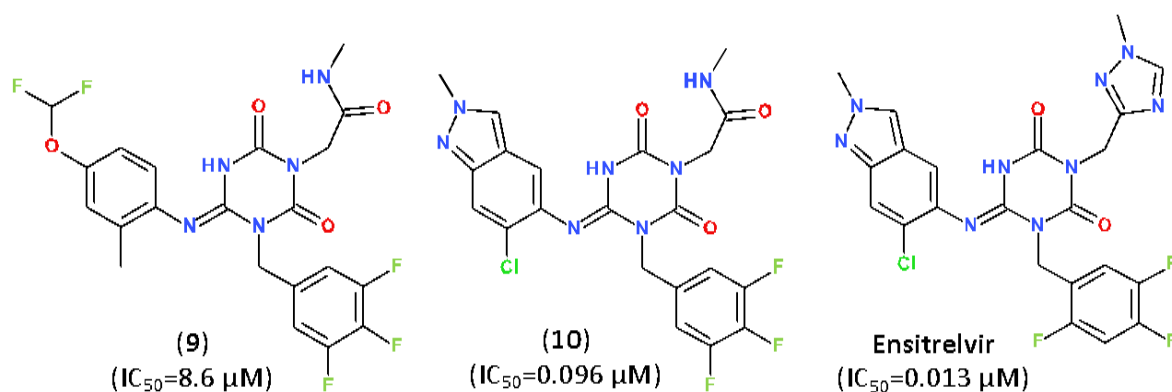


Рис. 1.23 - Ненуклеофільний агент, який можна приймати перорально, Енсїтрелвір (S-217622) та його аналоги з потужною широкоспектровою антикоронавірусною активністю.

Нарешті, у недавньому *in silico* молекулярному докінгу було ідентифіковано затверджений FDA антивірусний агент Рїлпівїрін (Rilpivirine) як мульти-таргетний препарат із високою інгібіторною активністю проти глікопротеїну Spike, рецепторів ACE2, протеаз PL^{pro} і M^{pro}, а також білка RdRp, що свідчить про його потенційну роль у пригніченні реплікації та складання вірусу SARS-CoV-2 [209].

Висновки до розділу 1

Проведено критичний аналіз сучасної науково-технічної та методичної літератури та зроблена оцінка сучасного стану щодо захворювання на COVID-19 та поточні тенденції поширення нових штамів SARS-CoV-2, обґрунтовано необхідність розробки інноваційних лікарських засобів від COVID-19 [169], 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 протівірусних препаратів [201,202].

Основні положення розділу викладені у публікаціях автора [30, 81, 169, 201, 202].

РОЗДІЛ 2

РОЗРАХУНКОВА ЧАСТИНА

2.1 Комп'ютерний дизайн нових інгібіторів

Комп'ютерний дизайн лікарських засобів став потужним інструментом для оптимізації структурального віртуального скринінгу великих хімічних баз даних, що відкриває нові можливості для економічно ефективної розробки нових лікарськоподібних лігандів [71]. В цьому розділі підсумовані основні методи, програмне забезпечення та описані процедури налаштування розрахунків з молекулярного докінгу та молекулярно-динамічного моделювання.

2.2 Оптимізація сполук лідерів методом еволюційних бібліотек

Існує декілька підходів до створення віртуальної хімічної бібліотеки нових молекул, які структурно схожі на цільову структуру. Наприклад, це може бути генерування комбінаційних бібліотек на основі затверджених лікарських засобів і природних сполук. Іншим підходом є створення еволюційної бібліотеки, яка починається з вихідного каркаса і проходить через невеликі мутації, оцінку придатності, ранжування та відбір у напрямку лікарськоподібних молекул [210].

Для створення еволюційної бібліотеки та розрахунку фізико-хімічних властивостей лігандів було використано програмне забезпечення OSIRIS DataWarrior версії 5.5.0 [211].

Програма MarvinSketch використовувалася для створення, відображення та характеристики хімічних структур (MarvinSketch 23.1., 2023, ChemAxon, <https://chemaxon.com/>, доступ станом на 1 лютого 2023 року).

Для кожного ліганда виконувалося три незалежні розрахунки. Найкращий режим зв'язування (стикуванню, докінгу) відповідав найбільшій спорідненості зв'язування (ВА) ліганда. Молекулярна графіка та візуалізація виконувалися за допомогою LigandScout 4.4.9.

2.3 Квантово-хімічні розрахунки

Оптимізація геометрії лігандів та конформаційний аналіз виконувались з використанням різних обчислювальних методів. Напівемпіричні методи, такі як PM6 [212] та PM7 [213], були використані для оцінки геометрії лігандів для молекулярного докінгу. Метод теорії функціоналу густини (DFT) [214] з гібридним функціоналом B3LYP у поєднанні з базисним набором 6-31G(d,p) [215] використовували для параметризації лігандів для МД моделювання. Структурні та термодинамічні розрахунки проводили у водному середовищі, використовуючи наближення поляризаційної моделі континууму (PCM) [216]. Усі розрахунки DFT виконано в програмному пакеті Gaussian 09 [217].

2.4 Молекулярний докінг

Молекулярний докінг був виконаний для всіх синтезованих сполук проти основної протеази M^{pro} (PDB: 8HEF та 7VH8) SARS-CoV-2. Підготовка рецептора та лігандів була виконана за допомогою програмного забезпечення LlgandScout, версія 4.5[104]. Розрахунки молекулярного докінгу були проведені з вбудованою версією програмного забезпечення AutoDock Vina 1.1.2 [107]. Було виконано напівгнучкий докінг, при якому рецептор залишався жорстким, а молекули лігандів були конформаційно гнучкими.

В розрахунках програмним пакетом AutoDock Vina використовувався ламаркiанський генетичний алгоритм як параметр дослідження. Для кожного ліганда було виконано три незалежні прогони з різними випадковими початковими значеннями. Найкращою конфігурацією зв'язування ліганду з рецептором обаралась та, яка відповідала найбільшій афінності або вільній енергії зв'язування ліганда.

2.5 Молекулярно-динамічне моделювання

Файли топології для PL^{pro} були згенеровані на основі його рентгеноструктурної моделі (PDB: 7SGW) за допомогою інструмента pdb2gmx з пакету GROMACS. Білок був розміщений у кубічну комірку, заповнену

приблизно 22 000 молекулами води, до якої додавалися іони Cl^- для нейтралізації зарядів білка. Усі моделювання виконувалися з використанням ансамблю NPT.

МД моделювання проводилося за допомогою програмного пакету GROMACS версії 2019.4 [120]. Референсна температура 298,15 К підтримувалася постійною за допомогою схеми слабкого зв'язування v-rescale [218] з постійною $\tau_T=0,1$ пс. Постійний тиск у 1 атм забезпечувався баростатом Паррінелло-Рахмана з постійною $\tau_P=1$ пс. Початкові швидкості атомів генерувалися за розподілом Максвелла при заданій абсолютній температурі. Періодичні граничні умови застосовувалися у всіх трьох напрямках моделювальної коробки.

Періодичні граничні умови застосовувалися в усіх трьох напрямках модельованої комірки. Електростатичні взаємодії моделювалися за допомогою методу Евалда з частковим сумуванням (PME) [219] із пороговим значенням для довгих відстаней у 1,1 нм. Порогова відстань для взаємодій Леннарда-Джонса також становила 1,1 нм. Крок MD-моделювання складав 2 фс, при цьому список сусідів оновлювався кожні 10 фс. Усі довжини зв'язків підтримувалися постійними за допомогою підпрограми LINCS [220,221].

2.6 Аналіз МД розрахунків

Стабільність згортання нативного білка в розчині відслідковувалася шляхом обчислення середньоквадратичного зміщення (RMSD) атомів основного ланцюга білка за рівнянням 2.1.

$$RMSD(\tau_1, \tau_2) = \left[\left[\frac{1}{M} \right] \sum_{i=1}^N m_i \cdot \| r_i(\tau_0) - r_i(\tau_i) \|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.1)$$

RMSD усіх атомів основного ланцюга білка було розраховано відносно їхніх позицій у нативній рентгеноструктурі за допомогою інструмента rms із

пакету GROMACS. Для цього поточна миттєва структура (τ_i) була підлаштована під початкову нативну структуру білка ($\tau_0 = 0$).

Відхилення окремих амінокислотних залишків від їхнього середнього положення оцінювалося шляхом обчислення середньоквадратичної флуктуації (RMSF), яка описує варіації або коливання атомів протягом усього періоду траєкторії. Цей розрахунок проводився за рівнянням 2.2, де символ $\langle \cdot \rangle$ позначає середнє значення за часом.

$$RMSF_i = [\langle \| r_i(\tau) - \langle r_i(\tau) \rangle \|^2 \rangle]^{\frac{1}{2}} \quad (2.2)$$

RMSF було розраховано за допомогою утиліти *rmsf*, що входить до пакету GROMACS.

2.7 Програмне забезпечення для візуалізації результатів та графіки.

Молекулярна графіка та візуалізація виконувалися за допомогою програм Biovia Discovery Studio v16.1 та VMD версії 1.9.3 [222].

Висновки до розділу 2

1) Наведено відомості про алгоритми, методи та програмне забезпечення, що використано для пошуку нових інгібіторів, а також процедури підготовки розрахунків та аналізу результатів [223].

2) Описано методики генерування еволюційних бібліотек та приведено загальні принципи відбору молекул-лідерів [224].

3) Наведено основні математичні формули та методи, що використано для обробки та аналізу 3D білків та їхніх комплексів з протеазами коронавірусу SARS-CoV-2.

Основні положення розділу викладені у публікаціях автора [81, 225, 226].

РОЗДІЛ 3

ДИЗАЙН НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕАЗИ M^{pro} НА ОСНОВІ АНАЛОГІВ НІРМІТРАЛВІРУ

3.1 Нірмітрелвір як інгібітор головної протеази M^{pro}

Незважаючи на значний обсяг доступних обчислювальних і експериментальних даних щодо лікування COVID-19, FDA затвердило лише ремдесивір, молнупіравір і нірматрелвір як препарати для лікування COVID-19 [50,181,227]. Paxlovid є одним із перших схвалених противірусних препаратів для лікування COVID-19, розробленим компанією Pfizer у 2021 році [179,182,184,228]. Основним компонентом Paxlovid є нірматрелвір (PF-07321332), який інгібує головну протеазу (M^{pro}) вірусу SARS-CoV-2 (рис. 3.1). Це перорально доступний препарат проти SARS-CoV-2 [5,12–15], що також демонструє противірусну активність проти інших коронавірусів людини [183,184,229].

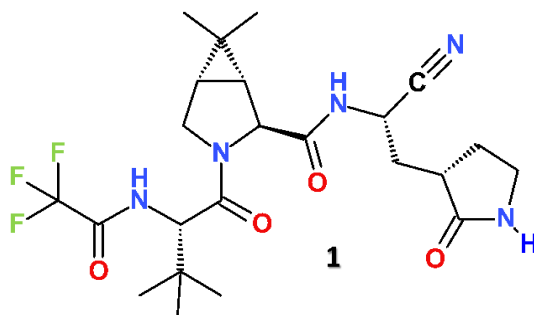


Рис. 3.1 - Молекулярна структура нірматрелвіру (PF-07321332).

Нірматрелвір має пептидоподібну структуру (рис. 3.1), і його кристалізований комплекс із протеазою M^{pro} відкриває можливості для розробки широкої родини три- або тетрапептидних міметиків, які містять електрофільний фрагмент, здатний взаємодіяти з каталітичною цистеїновою групою рецептору [181,227]. Таким чином, структура нірматрелвіру є перспективною основою для раціонального дизайну нових, більш ефективних противірусних препаратів. Зважаючи на його складний багатоступеневий синтез, нами був використаний

альтернативний підхід, заснований на комп'ютерному дизайні ліків та прогнозуванні взаємозв'язку між структурою похідних нірматрелвіру та їх здатністю зв'язуватися з активним сайтом ферменту M^{pro} SARS-CoV-2.

3.2 Методологія дослідження

Спершу було створено віртуальну бібліотеку аналогів нірматрелвіру, використовуючи еволюційний алгоритм, який імітує природну еволюцію лікарськоподібних сполук за допомогою програмного забезпечення DataWarrior [211]. Процедура включала такі етапи: алгоритм розпочинається з вихідної структури нірматрелвіру (1) (рис. 3.1), яка позначається як перше покоління. Далі серія схожих похідних створювалася шляхом застосування незначних випадкових структурних модифікацій до вихідної структури.

Кожна нова структурна модифікація оцінювалася за тим, наскільки вона відповідає до семи налаштовуваних критеріїв придатності, таких як молекулярна маса (M_w), $c\text{LogP}$, полярна поверхнева площа (PSA) [230], форма молекули, гнучкість тощо. Результати представлені у таблиці 3.1.

Молекулярна маса лікарськоподібної молекули є ключовим параметром, який допомагає співвіднести її біологічну активність із хімічними та фізичними властивостями. Відповідно до правила п'яти Ліпінскі [231], для того, щоб препарати були перорально доступними, їх M_w має бути менше 500 г/моль. Для нірматрелвіру M_w становить 499 г/моль, тому критерій придатності було встановлено в межах 490–515 г/моль (див. таблицю 3.1).

Розрахований логарифм коефіцієнта розподілу сполуки між н-октанолом і водою $\log(C_{\text{octanol}}/C_{\text{water}})$, відомий як $c\text{LogP}$, є одним із ключових критеріїв придатності. Це добре відомий показник гідрофільності препарату. Низька гідрофільність і, відповідно, високий $c\text{LogP}$ призводять до поганого всмоктування або проникнення. Для нірматрелвіру $c\text{LogP}$ дорівнює 0,98, тому відповідний критерій було встановлено в межах 0,8–1,2 (див. таблицю 3.1).

Таблиця 3.1

Критерії відбору та параметри придатності для створення віртуальної еволюційної бібліотеки аналогів нірматрелвіру.

Критерії відбору		
Кількість поколінь	100	
Кількість сполук на покоління	1.024	
Кількість сполук, що проходять у наступне покоління	128	
Налаштування відповідності		
Параметр	Значення	Вага
Молекулярна маса, M _w	490–515 г/моль	1.0
cLogP	0.8-1.2	1.0
Полярна площа поверхні	110-150 Å ²	1.0
Структурна схожість	Flexpore	1.0
Конформаційна схожість	PheSA	1.0
Молекулярна гнучкість	0.4-0.6	1.0
Форма молекули	0.3-0.5	1.0

PSA визначає суму поверхні всіх полярних атомів, таких як кисень, азот, сірка і фосфор, включаючи прикріплені атоми водню. PSA є поширеним критерієм у медичній хімії для оцінки проникності клітин. Лікарськоподібні молекули з $PSA > 140 \text{ Å}^2$ зазвичай погано проникають через клітинні мембрани. Крім того, щоб проникнути через гематоенцефалічний бар'єр, PSA має бути менше 60 Å^2 . У нірматрелвіру PSA становить 131 Å^2 , тому цей критерій було зафіксовано в межах $110\text{--}150 \text{ Å}^2$.

Окрім вищезазначених критеріїв, для оцінки форми та 3D-конформаційної подібності кількох конформерів молекул-кандидатів застосовувалися два

алгоритми: (i) Pharmacophore Enhanced Shape Alignment (PheSA) та (ii) OrgFunctions Descriptor. Ці інструменти дозволяють перевірити, чи мають дві молекули сумісну поведінку при зв'язуванні з білком з точки зору форми, розміру і гнучкості (див. таблицю 3.1).

Структурним мутаціям, які найкраще відповідають цим критеріям, надається вищий пріоритет під час створення нового хімічного простору. Нові аналоги в межах поточного покоління ранжуються відповідно до цих критеріїв, і молекули з найвищими рейтингами обираються для формування вихідних молекул для наступного покоління. Дотримуючись цього еволюційного алгоритму, було створено до ста поколінь із загальною кількістю 1866 віртуальних аналогів.

На рисунку 3.2 показано 2D-розподіл молекулярної маси M_w відносно $cLogP$ у створеній бібліотеці, який демонструє симетричний розподіл навколо центральної червоної точки, що відповідає вихідному німатрелвіру.

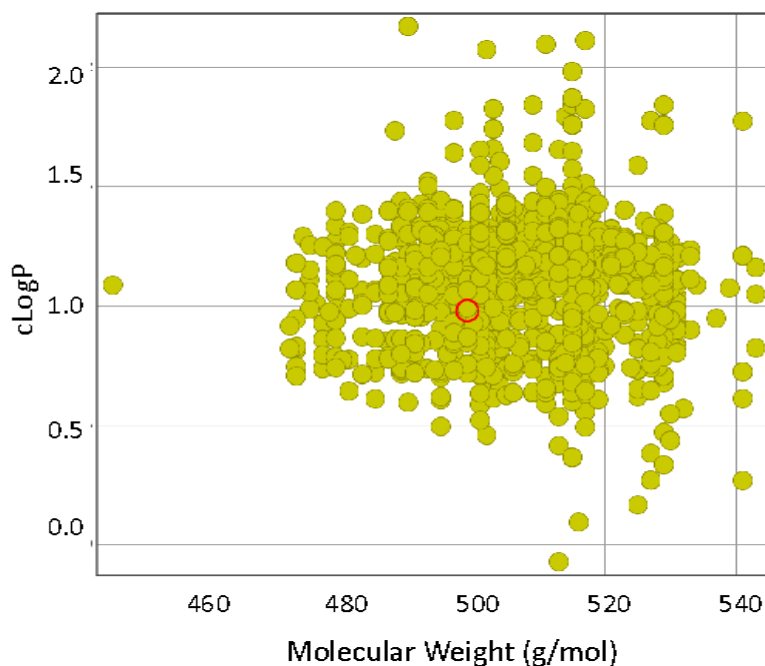


Рис 3.2 - Двовимірний графік розподілу параметрів молекулярної маси (M_w) відносно логарифма коефіцієнта розподілу ($cLogP$) для створеної еволюційної бібліотеки.

3D-скринінг за фармакоформними моделями. Згенерована еволюційна бібліотека є надто великою для застосування традиційного молекулярного докінгу проти ферменту M^{pro} . Тому вона була додатково попередньо оброблена та відфільтрована для відповідності п'ятиточковій 3D-фармакоформній моделі нінматрелвіру. Ця модель була побудована на основі першої доступної кристалічної структури нінматрелвіру в комплексі з M^{pro} (PDB: 7VH8) [32], використовуючи програмне забезпечення LigandScout, розроблене Волбером і Лангером [104].

3D-фармакоформна модель є своєрідним хімічним «відбитком пальця», що враховує певні хімічні властивості ліганда, такі як донори і акцептори водневих зв'язків, ліпофільні області, позитивно і негативно заряджені хімічні групи, які описують його взаємодію з навколишнім активним сайтом білка.

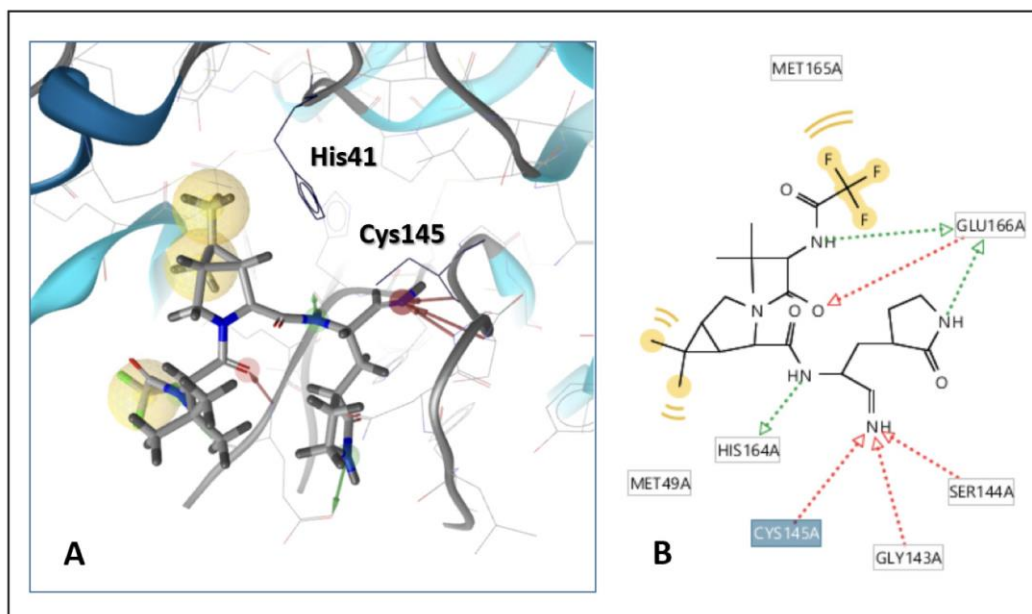


Рис 3.3 - (А) 3D п'яти-точкова фармакоформна модель нінматрелвіру, яка отримана з його кристалічної структури у комплексі з M^{pro} (PDB: 7VH8). Виділені залишки His41 і Cys145 належать каталітичній ділянці активного сайту M^{pro} . (В) Схема міжмолекулярних взаємодій нінматрелвіру з ключовими залишками навколишнього рецепторного середовища M^{pro} [225].

На рисунку 3.3 представлено п'ятиточкову фармакоформу модель для нінматрелвіру, яка виділяє дві ключові фармакоформні точки: периферійну

трифторацетильну групу і фрагмент 6,6-диметил-3-азабіцикло[3.1.0]гексан. Така п'ятиточкова 3D-фармакофорна модель використовується для характеристики ключових взаємодій у комплексі нїрматрелвіру з M^{pro} [180].

Застосування процедури фармакофорного скринінгу дозволило зменшити хімічний простір еволюційної бібліотеки з 1866 до 32 активних кандидатів. Для оцінки спорідненості зв'язування (ВА) 32 обраних активних молекул було проведено розрахунки молекулярного докінгу на основі структури за допомогою програмного забезпечення LigandScout [104]. LigandScout використовує вбудовану версію AutoDock Vina 1.1 [107].

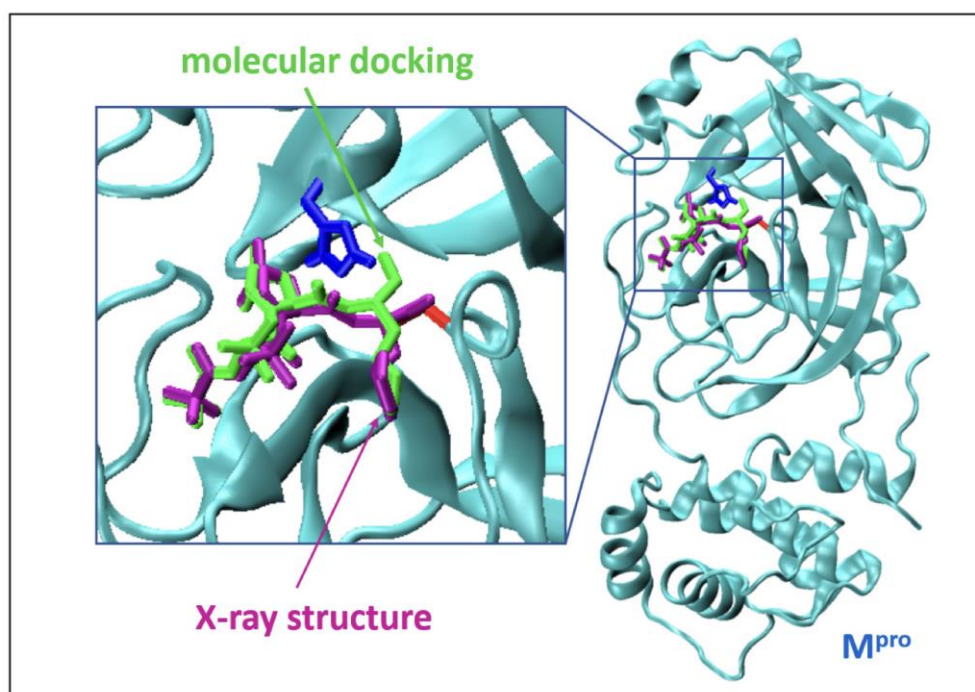


Рис. 3.4 - Порівняння результатів молекулярного докінгу нїрматрелвіру з його рентгенівською структурою в комплексі з M^{pro}. Геометрія впровадження нїрматрелвіру в молекулу основного протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2 (PDB: 7VH8). Каталітичні амінокислотні залишки His41 і Cys145 активного центру протеази показані синім або червоним кольором. Режим зв'язування ліганд, оцінений молекулярним докінгом, показаний зеленим кольором, тоді як рентгенівська структура представлена фіолетовим [225].

З метою підтвердження коректності алгоритму докінгу ліганда з протеазою, було проведено повторний докінг нірматрелвіру, а його геометрію було порівняно з відповідною рентгенівською структурою ліганда, зв'язаного з M^{pro} (PDB: 7VH8), як показано на рисунку 3.4.

Результати молекулярного докінгу для найкращої конформації нірматрелвіру та його експериментальної кристалографічної структури добре узгоджуються, що дозволяє використовувати цей метод для кількісного аналізу спорідненості M^{pro} до нових похідних нірматрелвіру.

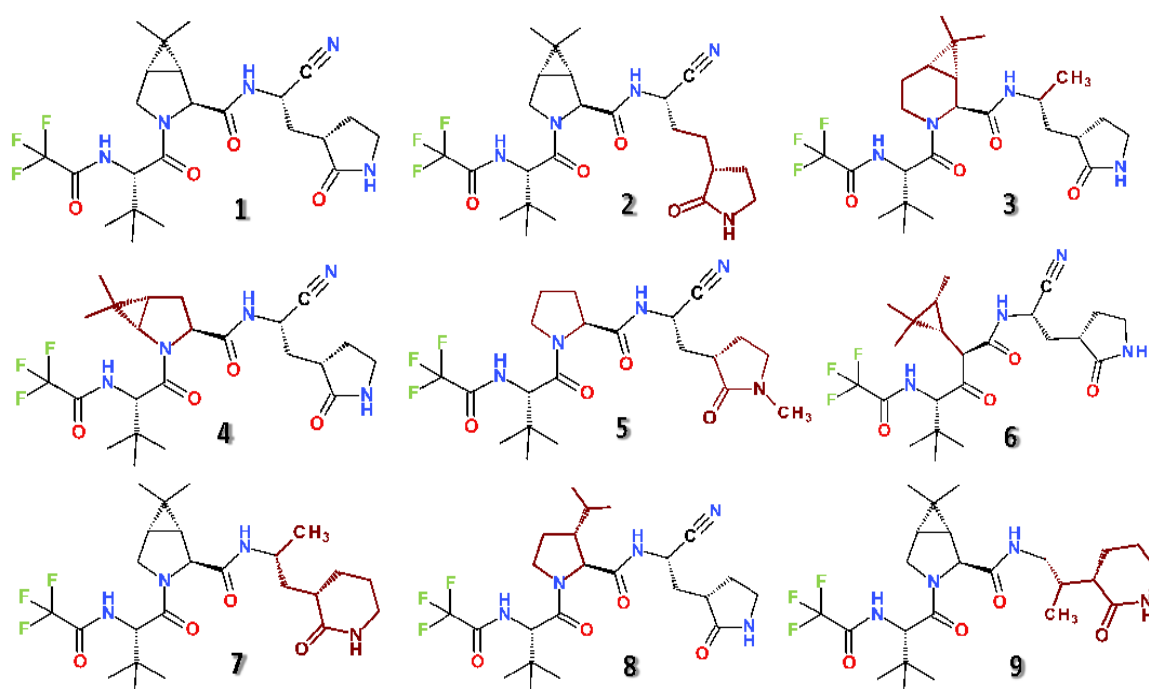


Рис. 3.5 - Молекулярна структура нірматрелвіру (1) та його розроблених аналогів, що демонструють вищу зв'язувальну афінність. Мутовані фрагменти виділені вишневим кольором.

Зрештою, спорідненість зв'язування 32 обраних високоранжованих аналогів нірматрелвіру була оцінена за допомогою молекулярного докінгу проти двох різних рентгенівських структур ферменту M^{pro} . Перша структура M^{pro} відповідає білку з його ко-кристалізованого комплексу з нірматрелвіром (PDB

7VH8). Друга структура M^{pro} відповідає білку без ліганда, отриманому при температурі 310 K (PDB 7MHK) [232].

Таким чином, процедура *in silico* скринінгу дозволила ідентифікувати до восьми сполук, які мають вищу спорідненість зв'язування, ніж у вихідного нірматрелвіру (див. рис. 3.5).

3.3 Результати віртуальної бібліотеки та її фільтрація

Молекулярний докінг та спорідненість зв'язування. З метою оцінки ВА 32 відібраних кандидатів до рецептора M^{pro}, було застосовано стандартні розрахунки молекулярного докінгу за допомогою програмного забезпечення LigandScout [233]. Результати докінгу показали, що до восьми відібраних аналогів мали значення ВА, вище за вихідний нірматрелвір, як це підсумовано на рисунку 3.5 і в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Результати молекулярного докінгу нірматрелвіру та його аналогів проти двох різних рентгенівських структур (PDB: 7VH8 та 7MHK) та їх фізико-хімічні параметри.

Ліганди	AutoDock Vina BA (kcal/mol)		MMF94 BE (kcal/mol)		Ligand Scout BA score		M _w (g/mol)	cLogP	PSA
	7VH8	7MHK	7VH8	7MHK	7VH8	7MHK			
1	-7.2	-6.9	-10.4	-14.0	-13.6	-16.1	499	0.98	131
2	-7.5	-6.9	-11.3	-23.0	-22.3	-14.6	513	1.43	131
3	-7.8	-6.5	-13.1	-4.4	-2-.1	-19.4	502	2.08	108
4	-7.8	-6.6	-15.7	-22.6	-19.1	-14.7	499	1.03	131
5	-7.2	-6.6	-20.9	-25.1	-17.3	-18.3	473	0.73	123
6	-7.7	-6.3	-24.3	-18.2	-15.7	-16.2	486	1.68	128
7	-8.6	-6.6	-38.9	-22.2	-15.6	-18.1	502	2.08	108
8	-7.4	-6.6	-25.5	-17.9	-14.6	-19.5	501	1.42	131
9	-8.2	-6.6	-15.6	-9.8	-13.7	-19.7	502	1.93	108

Оцінка енергетичних характеристик зв'язування ліганд-рецептор. У таблиці 3.2 наведено енергетичні характеристики взаємодії протеази з лігандом та деякі фізико-хімічні властивості найкращих аналогів.

Основними критеріями оцінки аффіності зв'язування є:

1. Параметр ВА, оцінений за алгоритмом докінгу AutoDock Vina.
2. Ентальпія зв'язування (Binding Energy, BE) комплексу білок–ліганд, розрахована LigandScout з використанням емпіричного силового поля MMF94.
3. Оцінка спорідненості зв'язування (BAS), розрахована за допомогою програми LigandScout. Цей параметр є внутрішньою оціночною функцією (scoring function) LigandScout та додатково враховує зміну сольватації ліганду.

Розраховане значення ентальпії зв'язування (BE) для нірматрелвіру становить -10.4 ккал/моль, що добре узгоджується з експериментальним значенням, визначеним методом ізотермічної титраційної калориметрії (-10.75 ккал/моль) [31].

Режими зв'язування ліганд-рецептор. На рисунку 3.6 показано типові режими зв'язування нірматрелвіру та його аналогів у активному центрі ферменту M^{pro}. Всі відібрані інгібітори характеризувалися нековалентним механізмом дії. Незначні структурні модифікації, такі як заміна 3-етил-2-оксопіролідину на 3-пропіл-2-оксопіролідин (аналог 2), призводили до збільшення BE та BAS з -13.6 до -22.3 , відповідно.

Вибір фармакофornoї моделі. Результати скринінгу підтверджують, що основні структурні модифікації, які підвищують спорідненість зв'язування, розташовані у двох фрагментах молекули нірматрелвіру — азабіцикло[3.1.0]гексані та оксопіролідині (рис. 3.6).

Обрані 32 найкращі аналоги були також повторно перевірені у докінгу до іншої рентгеноструктурної моделі рецептору M^{pro}, яка не містила ліганду (PDB 7MНК), що підтвердило основні тренди зв'язування для більшості аналогів, за винятком 2 і 4 (див. таблицю 3.2).

Таким чином, отримані результати демонструють можливість подальшої структурної модифікації зазначених ділянок молекули для створення інгібіторів з більш високою противірусною активністю.

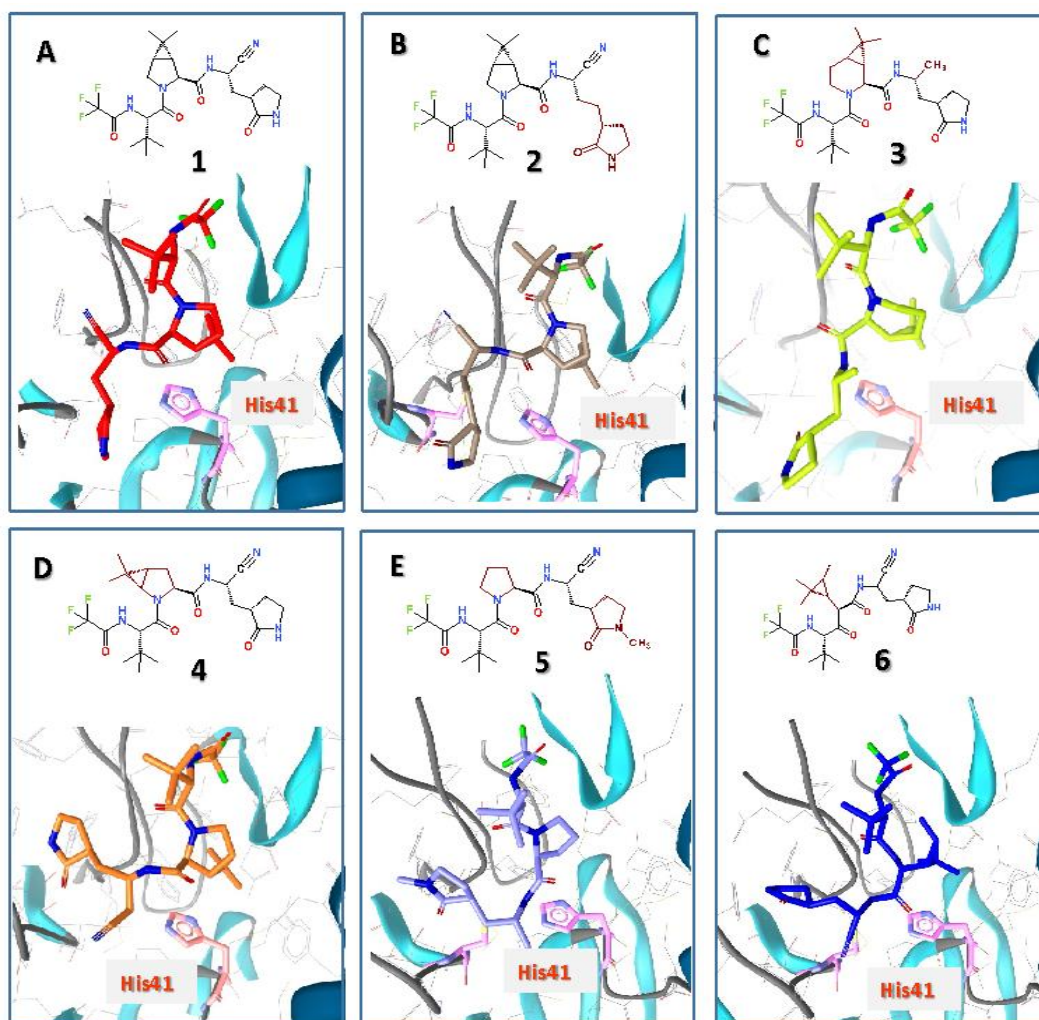


Рис. 3.6 - Найкращі режими зв'язування нірматрелвіру (1) та його аналогів в активному центрі ферменту M^{pro}, оцінені за допомогою молекулярних докінгових обчислень [225].

Висновки до розділу 3

Проведено рецептор-орієнтований пошук та комп'ютерний дизайн нових інгібіторів протеази M^{pro} з метою ідентифікації нових аналогів нірматрелвіру [169,233], які мають кращі структурно-енергетичні характеристики зв'язування з активним центром рецептора M^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2 та встановлено наступне:

- Створено нову віртуальну еволюційну бібліотеку лігандів, що містить 1866 аналогів нірматрелвіру. Генерація бібліотеки виконувалась за допомогою еволюційних алгоритмів та продовжувалась 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 [234].

- Структурна оптимізація та скринінг на основі 3D-фармакофорної моделі вихідного нірматрелвіру, дозволили зменшити хімічний простір бібліотеки та відібрати 32 молекул-лідера [224].

- Структурно-енергетичне ранжування відібраних кандидатів з використання молекулярного докінгу та двох різних PCA структур протеази M^{pro} дозволило ідентифікувати вісім аналогів нірматрелвіру з вищою афінністю зв'язування (від -7,5 до -8,6 ккал/моль), ніж вихідний нірматрелвір (-7,2 ккал/моль).

- Вперше показано, що основні структурні модифікації, які посилюють загальний інгібуючий ефект нових аналогів, локалізовані в азабіцикло[3.1.0]-гексановому та 2-оксопіролідіновому 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.

Основні положення розділу викладені у публікаціях автора [169, 224, 225, 233].

РОЗДІЛ 4

ДИЗАЙН НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕАЗИ PL^{pro} НА ОСНОВІ АНАЛОГІВ ЕНСІТРЕЛВІРУ

4.1 Енсїтрелвір як противірусний препарат проти SARS-CoV-2

Фармацевтична компанія Shionogi, у співпраці з Хоккайдоським університетом, розробила непептидний пероральний препарат під назвою енсітрелвір (експериментальна назва S-217622, систематична назва 1-(2,4,5-трифторобензил)-3-[(1-метил-1H-1,2,4-триазол-3-іл)метил]-(6E)-6-[(6-хлоро-2-метил-2H-індазол-5-іл)-іміно]-1,3,5-триазинан-2,4-діон, див. рис. 4.1a). Цей препарат був затверджений для продажу в Японії 22 листопада 2022 року [161].

Новий противірусний препарат був розроблений за допомогою процесу, що включав віртуальний скринінг, біологічний аналіз та оптимізацію вихідної сполуки із застосуванням підходу, заснованого на структурному дизайні лікарських засобів [235]. Рентгеноструктурний аналіз кристалічного комплексу енсітрелвіру з ферментом M^{pro} демонструє, що зв'язок 1-метил-1H-1,2,4-триазолу в позиції S1 формує водневий зв'язок довжиною 2,99 Å з бічним ланцюгом NH залишку H163 (див. рис. 4.1b) [161,236–239].

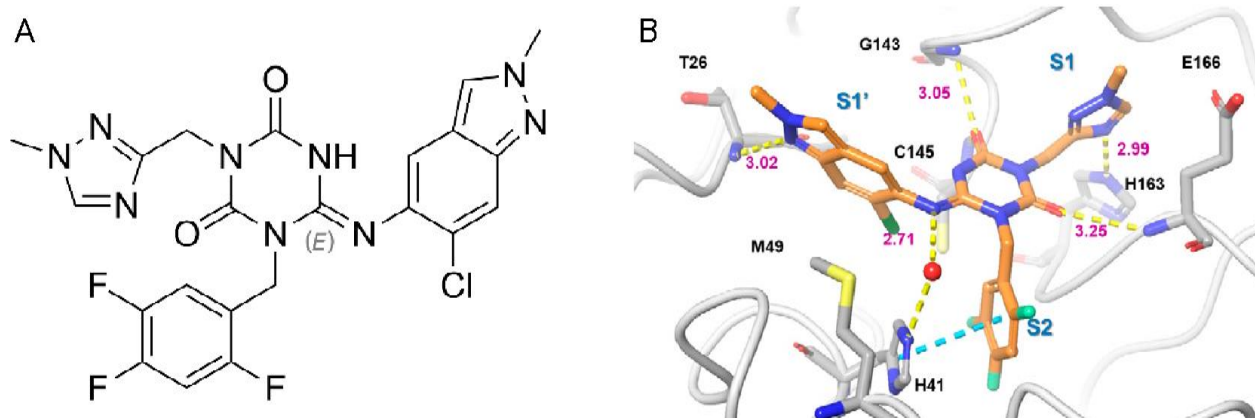


Рис. 4.1. - (A) Хімічна структура енсітрелвіру. (B) Рентгенівська кристалічна структура комплексу енсітрелвіру з M^{pro} (PDB: 8HEF).

Крім того, трифлуоробензильна група енсітрелвіру займає гідрофобну кишеню S2, вирівнюючись паралельно кільцю гістидину H41, що покращує

контакт. Фрагмент 6-хлоро-2-метил-2H-індазолу, розташований в кишені S1', утворює водневий зв'язок довжиною 3,02 Å з NH головного ланцюга T26 та підтримує гідрофобні взаємодії з M49. Нарешті, одна з карбонільних груп 1,3,5-триазинан-2,4-діонового фрагмента утворює водневий зв'язок довжиною 3,25 Å з NH E166.

Енсїтрелвір продемонстрував значну інгібуючу активність щодо SARS-CoV-2 M^{pro} як непептидний, нековалентний інгібітор з значенням IC₅₀ 0,013 мкМ та ефективною противірусною активністю з значенням EC₅₀ 0,37 мкМ [161,237]. Він показав противірусну активність проти ряду варіантів SARS-CoV-2 [240] та коронавірусів *in vitro*, а також сприятливі метаболічні і фармакокінетичні характеристики для перорального застосування [241–243].

Враховуючи вищезгадане, наступним етапом нашого дослідження був пошук нових аналогів енсїтрелвіру з використанням віртуальної еволюційної бібліотеки, створеній на його основі та виявлення сполуки-лідера, що демонструє кращу афінність до основної протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2.

4.2 Алгоритм генерації еволюційної бібліотеки аналогів енсїтрелвіру

Для генерації еволюційної бібліотеки аналогів енсїтрелвіру була застосована процедура аналогічна до описаній у Розділі 3, а саме з використанням програмного забезпечення OSIRIS DataWarrior [211]. Еволюційний алгоритм імітував природну еволюцію і починався з невеликого початкового набору молекул (нульове покоління) [116]. На наступному етапі створюються кілька нових, але схожих молекул шляхом застосування невеликої випадкової структурної модифікації (перше покоління нащадків). Застосовуються модифікації, такі як заміна одного атому, вставка атома, перерозподіл зв'язків, міграція замісників, ароматизація кілець, інверсія хірального центру тощо (див. рис. 4.2). Кожна модифікація потім оцінюється з точки зору того, наскільки добре вона відповідає цільовим критеріям.

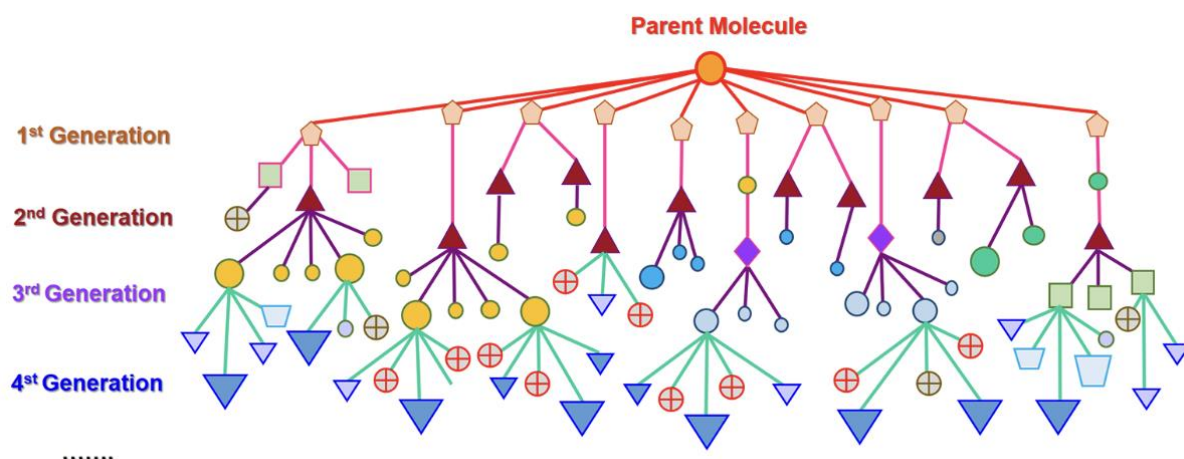


Рис. 4.2. - Загальна схема створення еволюційного дерева бібліотеки. Більші символи представляють 1-ше, 2-ге, 3-є та 4-те покоління, що вижили, в той час як менші символи ілюструють деякі невдалі гілки, які не еволюціонували в наступне покоління.

На наступному етапі еволюційний алгоритм застосовує налаштовувані критерії придатності для ранжування молекул нового покоління відповідно до цих критеріїв. Найкращі молекули з цього покоління обираються для виживання та формування материнських молекул для наступного покоління. Зазвичай, після декількох сотень поколінь молекул алгоритм досягає структур, які оптимально відповідають визначеним критеріям придатності.

4.2.1 Створення еволюційної бібліотеки аналогів енсїтрелвіру

Для створення бібліотеки нових молекул, які структурно подібні до початкової структури енсїтрелвіру, ми розглядали декілька способів [81]. Досвід нашого попереднього дослідження з оптимізації будови нїрматрелвіру [233] (розділ 3) показав, що один з перспективних методів полягає у створенні віртуальної бібліотеки аналогів енсїтрелвіру за допомогою програмного забезпечення DataWarrior [211].

Цей процес використовує еволюційний алгоритм, який імітує природну еволюцію лікарських сполук [234]. Створення нових молекул слїдує певній процедурі: починається з молекули енсїтрелвіру (рис. 4.1a), яку називають

«першим поколінням» (рис. 4.2). З цієї початкової точки генеруються серії подібних похідних шляхом застосування незначних випадкових структурних модифікацій до материнської структури. Кожна нова модифікація потім оцінюється за її відповідністю дев'яти обраним критеріям придатності, включаючи молекулярну масу (M_w), логарифм коефіцієнта поділу (cLogP), полярну поверхневу площу (PSA) [230], молекулярну форму, гнучкість та інші (таблиця 4.1). Принципи відбору цих критеріїв придатності детальніше обговорюються в наших останніх роботах [116,244].

Таблиця 4.1.

Обрані критерії придатності та їх параметри, що використовуються для створення віртуальної еволюційної бібліотеки аналогів енсітрелвіру.

Критерій придатності	Налаштування
Кількість поколінь	25
Сполуки на покоління	2048
Сполуки, що вижили в поколінні	256
Структурна подібність	"алгоритм OrgFunctions, target - енсітрелвір"
Конформаційна подібність	алгоритм PheSA
Молекулярна маса (M_w)	400-500 г/моль
cLogP	2-4
Площа полярної поверхні	80-120 Å ²
Молекулярна гнучкість	0.3-0.7
Молекулярна форма	0.3-0.7
Н-донори	3-5
Н-акцептори	5-10
Кількість обертальних зв'язків	4-8

Структурні мутації, які відповідають цим критеріям, мають більшу ймовірність виникнення. У поточному поколінні нові аналоги були організовані

відповідно до цих критеріїв, що дозволило вибрати молекули з найвищим рейтингом для виживання та використання їх як материнські молекули для наступного покоління. В результаті застосування цього еволюційного алгоритму було створено всього 25 поколінь, що дало 6334 віртуальних аналога енсїтрелвіру.

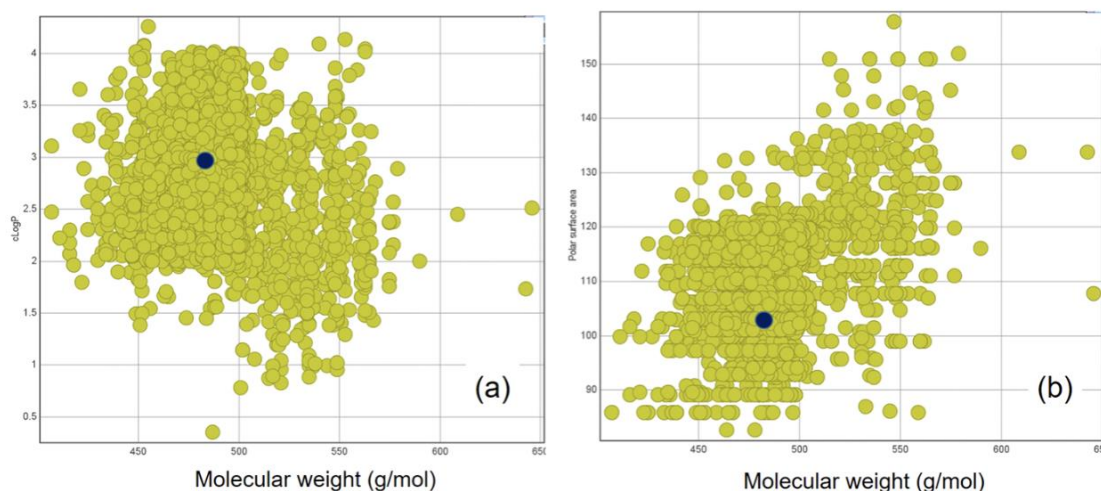


Рис. 4.3. - Двовимірні графіки розподілу молекулярної маси щодо cLogP (a) та PSA (b) параметрів для створеної еволюційної бібліотеки. Сині точки вказують на молекулу початкового енсїтрелвіру.

Еволюційну бібліотеку похідних енсїтрелвіру було створено на основі принципу структурної варіації, а також з застосуванням конкретних критеріїв придатності (див. таблицю 4.1). Ці критерії включали молекулярну масу ($400 \text{ г/моль} < M_w < 500 \text{ г/моль}$), полярну поверхневу площу ($80 \text{ Å}^2 < \text{PSA} < 120 \text{ Å}^2$) та значення cLogP ($2 < \text{cLogP} < 4$). Рисунок 4.3 ілюструє двовимірний розподіл цих параметрів у створеній бібліотеці, яка демонструє симетричний розподіл.

4.2.2 3D-фармакофорний скринінг

Створена еволюційна бібліотека залишається достатньо великою, для того, щоб було можливо провести ранжування молекул за структурно-енергетичними параметрами за допомогою методу молекулярного докінгу. Тому на першому етапі, бібліотеку було додатково проаналізовано та відфільтровано за допомогою

віртуального скрінінгу згідно з критерієм відповідності кожної нової молекули 3D-моделі фармакофору енсїтрелвіру [245]. Модель фармакофору була створена за допомогою програмного пакету LigandScout [104] (рис. 4.4) на основі першої доступної кристалічної структури енсїтрелвіру в комплексі з M^{pro} (PDB: 8HEF) [16]. Процедура скрінінгу щодо 3D-фармакофорної моделі енсїтрелвіру дозволила зменшити хімічний простір бібліотеки з 6334 віртуальних молекул до 41 активного похідного енсїтрелвіру, які мають фармакофорну структурну схожість з початковою структурою.

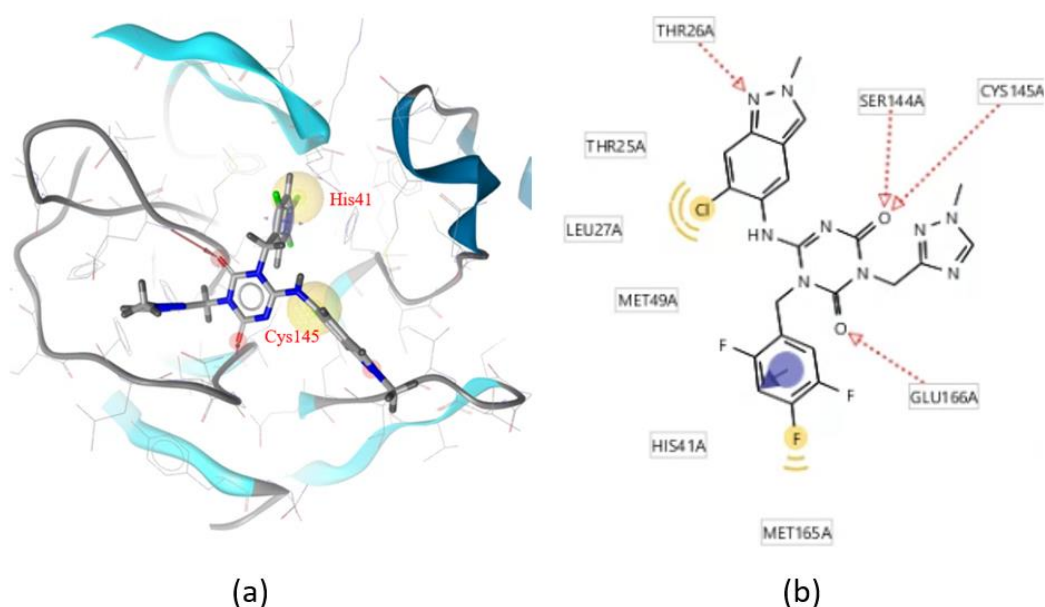


Рис. 4.4. - (a) 3D модель фармакофору енсїтрелвіру, побудована на основі його кристалічної структури в комплексі з M^{pro} (PDB: 8HEF) [16]. Позначені амінокислотні залишки His41 і Cys145 є активним сайтом M^{pro} . (b) Схема міжмолекулярних взаємодій енсїтрелвіру з ключовими сусідніми залишками M^{pro} .

4.2.3 Молекулярний докінг еволюційної бібліотеки

З метою виявлення потенційних сполук-лідерів серед еволюційної бібліотеки, ми оцінили афінність зв'язування 41 вибраного активного кандидата, проводячи молекулярний докінг з M^{pro} за допомогою програмного забезпечення LigandScout [104]. LigandScout містить вбудовану версію широко

використовуваного методу молекулярного докінгу AutoDock Vina. Для калібрування та валідації алгоритму докінгу ліганд-протеаза ми провели докінгове дослідження енсїтрелвіру і порівняли його геометрію з відповідними даними кристалографічної структури.

Молекулярний докінг був проведений для вибраних інгібіторів головної протеази M^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2. Просторова структура головної протеази M^{pro} (PDB ID: 8HEF) була отримана з бази даних білків (рис. 4.5a-b) [92]. Результати молекулярного докінгу для енсїтрелвіру разом з експериментальними кристалографічними даними його комплексу з M^{pro} добре співпадають (рис. 4.5c). Ця узгодженість дозволяє нам використовувати цей метод для кількісного аналізу афінності нових похідних енсїтрелвіру до M^{pro} (рис. 4.6).

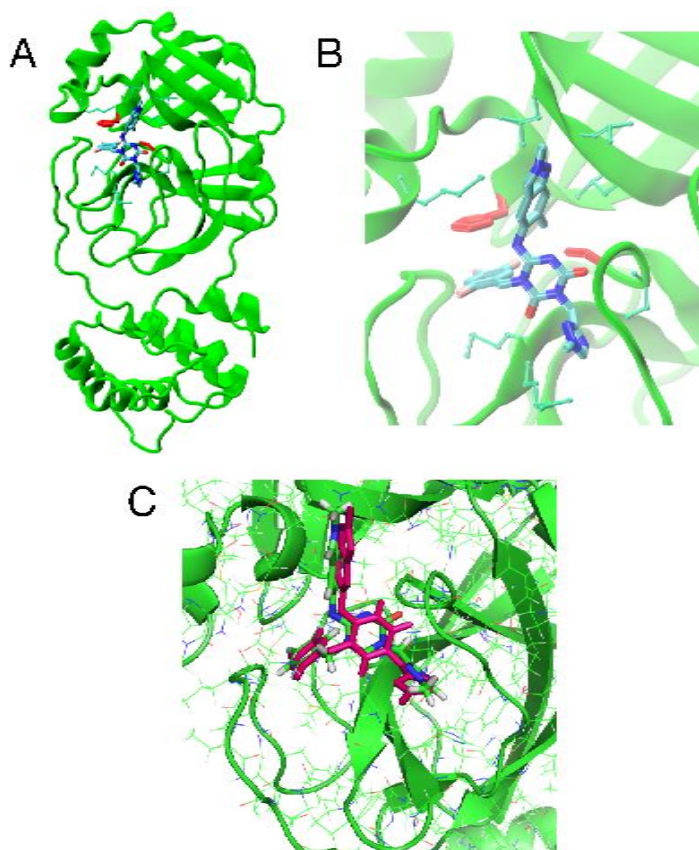


Рис. 4.5. – (А, В) Конфігурація включення енсїтрелвіру в активний центр протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2 (PDB: 8HEF) [236]. Каталітичні амінокислотні залишки His41 і Cys145 показані червоним кольором. (С) Порівняння результатів молекулярного докінгу енсїтрелвіру з його кристалографічною структурою в

комплексі з M^{pro} . Конфігурація ліганду, оцінена методом молекулярного докінгу, показана рожевим кольором.

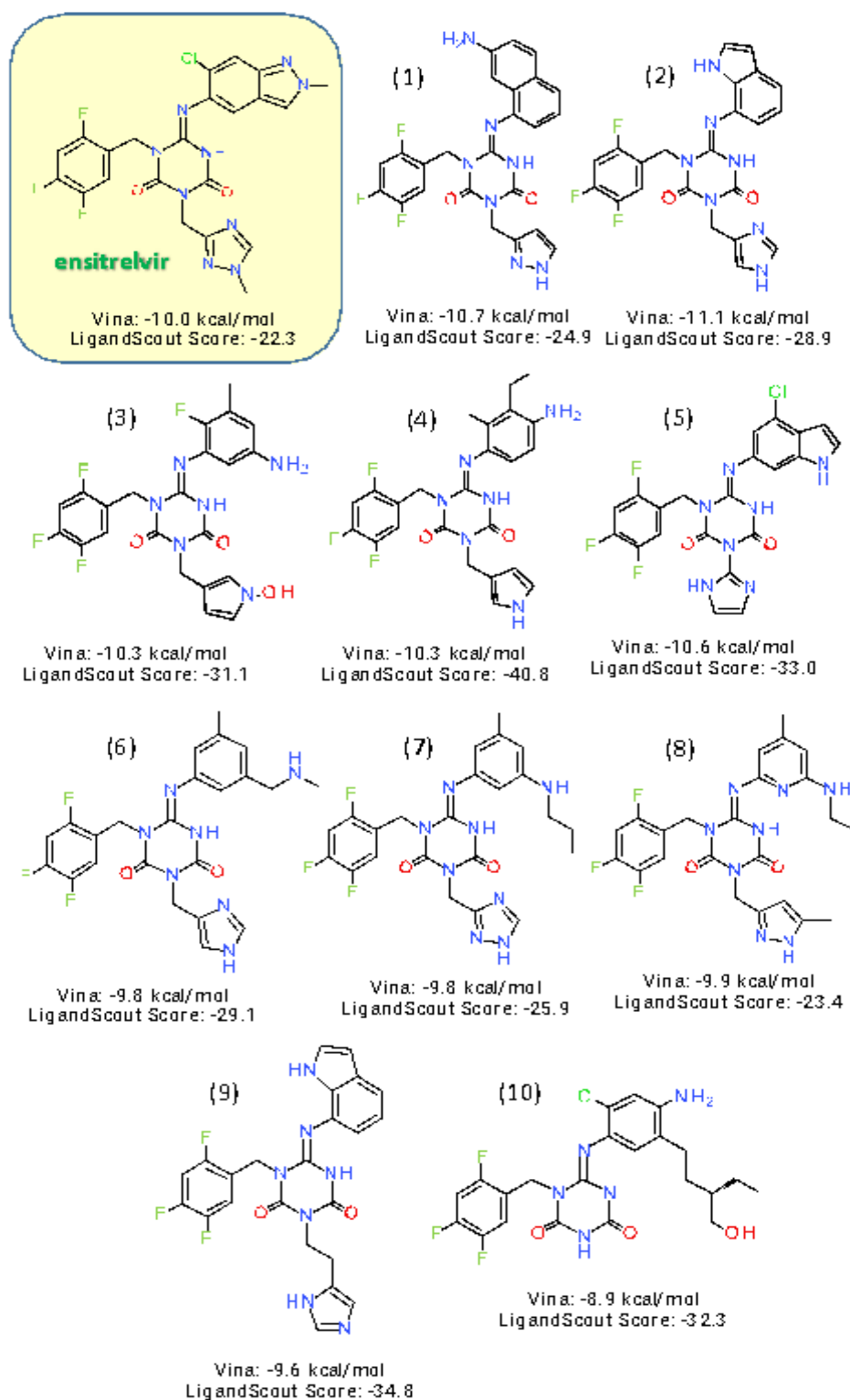


Рис. 4.6. – Молекулярна структура енсїтрелвіру та його аналогів (1-10), які демонструють вищу спорідненість зв'язування з M^{pro} у порівнянні з початковим енсїтрелвіром.

Результати молекулярного докінгу для вибраних 41 активних похідних показали, що 10 аналогів продемонстрували вищу афінність до M^{pro} , ніж початковий енсїтрелвір. Рисунок 4.6 ілюструє структури п'яти лідерних лігандів разом з їх енергетичними характеристиками, що стосуються взаємодії протеази-ліганд.

Для оцінки енергетичних характеристик зв'язування були розглянуті такі параметри:

1. Енергія зв'язування, визначена за алгоритмом докінгу AutoDock Vina.
2. Оцінка афінності зв'язування (BAS), розрахована за допомогою програмного пакету LigandScout.
3. Показник BAS враховує як ентальпію зв'язування протеїну та ліганду, так і ефекти розчинника. BAS вважається найбільш репрезентативним індикатором і, відповідно, був обраний для відбору лідерних лігандів.

Ключовою структурною особливістю зв'язування та докінгу вибраних інгібіторів з активним сайтом M^{pro} є збереження конфігурації трифторбензильного фрагмента, що спостерігається у похідних 1-10, зображених на рисунку 4.7. Зусилля замінити 2,4,5-трифторбензильний фрагмент енсїтрелвіру не призвели до покращення спорідненості зв'язування. Загальне підвищення спорідненості зв'язування цих інгібіторів зумовлено структурними модифікаціями інших частин молекули. Основні структурні модифікації, спостереженні у інгібіторах 1-10, відбуваються у двох специфічних фрагментах молекули енсїтрелвіру: 1-метил-1H-1,2,4-триазолу та 6-хлоро-2-метил-2H-індазолу (див. рис. 4.6).

Результати, наведені на рисунках 4.6 і 4.7, свідчать, що підвищення енергії зв'язування та покращення загального показника спорідненості є результатом парних структурних модифікацій початкової структури енсїтрелвіру (1). Ці зміни включають: заміну метил-1,2,4-триазолу та 6-хлоро-2-метил-2H-індазолу на піразольне кільце та амінонафтол (ліганд 1), імідазольне кільце та індольне кільце (ліганд 2), хлороіндольне та імідазольне кільце (ліганд 5),

фторметиланілін та гідроксипірольне кільце (ліганд 3), а також етилметиланілін і пірольне кільце (ліганд 4). Ці модифікації значно сприяють підвищенню противірусної ефективності похідних енсїтрелвіру.

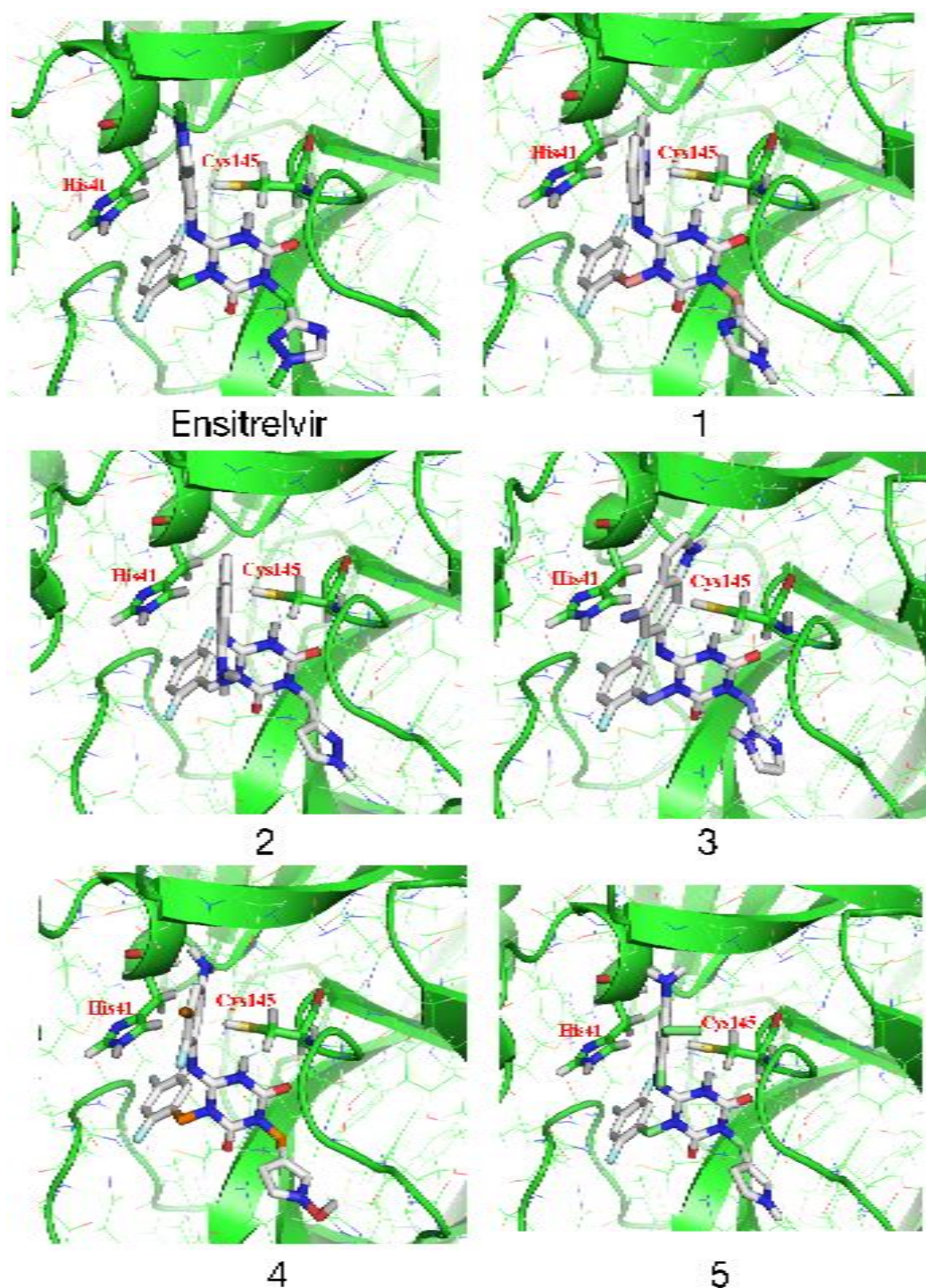


Рис. 4.7 - Найкращі режими зв'язування енсїтрелвіру та його аналогів 1-5 з активним центром M^{pro} протеази вірусу SARS-CoV-2 (PDB: 8HEF)

4.3 Аналіз отриманих аналогів енсїтрелвіру

Бібліотека з 6334 похідних енсїтрелвіру, структурно схожих на вихідну молекулу, була створена з використанням набору з десяти критеріїв придатності, зокрема молекулярної маси (M_w), cLogP, площі полярної поверхні, структурної та конформаційної схожості, гнучкості, молекулярної форми, кількості торсійних кутів та донорів-акцепторів водневого зв'язку. Подальша фільтрація цієї бібліотеки на основі відповідності 3D фармакофорній моделі енсїтрелвіру дозволила ідентифікувати 41 перспективний похідний. Після цього було проведено детальний структурний та енергетичний аналіз спорідненості зв'язування цих кандидатів із протеазою M^{pro} за допомогою методів молекулярного докінгу.

Цей аналіз дозволив виділити 10 аналогів енсїтрелвіру, які демонструють сильнішу спорідненість до протеази M^{pro} порівняно з оригінальним інгібітором енсїтрелвіром. Було вперше показано, що ключові структурні модифікації, які підвищують загальну противірусну ефективність інгібітора, знаходяться у фрагментах 1-метил-1H-1,2,4-триазолу та 6-хлоро-2-метил-2H-індазолу енсїтрелвіру. Запропонований робочий процес еволюційної оптимізації існуючих каркасів затверджених лікарських засобів є перспективною та економічно вигідною стратегією для розробки нових противірусних агентів проти COVID-19 [64].

Висновки до розділу 4

Енсїтрелвір є нековалентним, непептидним інгібітором головної протеази SARS-CoV-2 (M^{pro}), який показав ефективну противірусну активність проти різних штамів коронавірусу *in vitro* та має сприятливі профілі метаболізму та фармакокінетики, що дозволило його пероральне застосування. Таким чином, розробка нових аналогів енсїтрелвіру має велике наукове-практичне значення. В метою рецепторно-орієнтованого дизайну та пошуку його аналогів було використано метод еволюційної структурної оптимізації початкового скаффолду та встановлено наступне [235]:

- створено віртуальну еволюційну бібліотеку, що складалася з 6334 нових аналогів, на основі десяти критеріїв придатності, зокрема Mw, cLogP, площі полярної поверхні, структурної та конформаційної схожості, гнучкості, молекулярної форми, кількості торсійних кутів та донорів-акцепторів водневого зв'язку.

- скринінг еволюційної бібліотеки аналогів енсїтрелвіру з використанням 3D фармакофornoї моделі, створеної на основі рентгеноструктурної структури комплексу енсїтрелвір-M^{pro} (PDB ID 8HEF), дозволив зменшити розмір бібліотеки до 41 кандидата.

- структурно-енергетичний аналіз відібраних кандидатів методами молекулярного докінгу дозволив ранжувати ліганди за їхньою спорідненістю зв'язування та селективністю до рецептора M^{pro} та ідентифікувати десять аналогів енсїтрелвіру, які мають кращу спорідненість до протеази M^{pro} порівняно з енсїтрелвіром.

- структурно-еволюційна оптимізація показала, 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.

Основні положення розділу викладені у публікаціях автора [233, 234, 235].

РОЗДІЛ 5

МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМІЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БУДОВИ ТА СТАБІЛЬНОСТІ КОМПЛЕКСІВ ІНГІБІТОР-ПРОТЕАЗА У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ

Методи віртуального скринінгу та молекулярний докінг є потужними інструментами для дизайну нових противірусних препаратів та низькомолекулярних інгібіторів. Проте ці методи не враховують вплив сольватації та специфічну міжмолекулярну взаємодію в системі ліганд-рецептор-розчинник, і головне у багатьох випадках моделюють жорстку геометрію рецептора. Всі ці ефекти стає можливим врахувати при використанні методів класичного молекулярно-динамічного моделювання. У Розділі 5 представлені результати розробки та тестування силових полів для МД моделювання протеаз M^{pro} та PL^{pro} у водному розчині а також представлені дослідження стабільності комплексів ліганд-рецептор.

5.1 МД моделювання фолдінгу протеази M^{pro}

Головна протеаза M^{pro} завдяки низькій здатності до мутацій є однією з найбільш перспективних мішеней для інгібування активності реплікації вірусу SARS-CoV-2 і розглядається як перспективна стратегія для зупинки поширення коронавірусу (рис. 5.1a). У сучасних протоколах з пошуку нових інгібіторів M^{pro} при розробці ліків проти SARS-CoV-2 методами *in silico*, МД моделювання стає одним з ключових обов'язкових етапів у вивченні взаємодій ліганд-біомолекула у водному розчині [246,247]. Поєднання цього методу з *in silico* скринінгом дозволяє швидко аналізувати надвеликі бібліотеки молекул, виявляючи перспективні кандидати та механізми їхньої дії, що значно пришвидшує створення ефективних терапевтичних засобів [248].

5.1.1 Аналіз стабільності мономерної форми протеази M^{pro}

Структура головної протеази M^{pro} , визначена методом рентгенівської кристалографії (PDB ID 6LU7) [31], інтенсивно використовувалася як початкова

структура для розрахунків з молекулярного докінгу [81,116]. В літературі зустрічаються роботи з молекулярного докінгу з використанням рентгенівської структури M^{pro} , яка була отримана з різною роздільною здатністю та в яких протеаза входила до складу комплексів з лігандами (PDB ID: 5R82 [139], 6LU7 [145–150,153,249] та 6Y84 [149,150]). Деякі рентгенівські структури мономерної M^{pro} використовувалися для розробки емпіричних силових полів та проведення МД розрахунків (PDB ID: 5RFV [138], 5R82 [139], 6LU7 [7,140–143,145–148,153,249], 6Y84 [149,150] та 7BQY [143], відповідно).

Типовий протокол для пошуку нових фармацевтичних засобів проти COVID-19 базується на скринінгу та докінгу великих бібліотек лігандів, а потім на МД моделювання перевірки структурної стабільності та енергетики обраних кандидатів [81,248]. Недоліком таких досліджень є несистематичне використання різних силових полів [146], таких як AMBER [7,44,124,138,143,147,250], AMBER14SB [251,252], OPLS-AA [139,140,148,173], CHARMM27 [153,249], CHARMM36 [83,141,142,146,149], GROMOS G43a6 [253] та G54a7 [145], відповідно. Хоча більшість досліджень розглядали мономерну форму M^{pro} , у деяких роботах також повідомлялося про МД моделювання димеру M^{pro} [251,252].

Для визначення оптимальних умов МД моделювання протеази M^{pro} у водному розчині ми провели порівняльний аналіз шести популярних біомолекулярних силових полів: OPLS-AA, CHARMM27, CHARMM36, AMBER03, AMBER14SB та G54a7, відповідно. МД моделювання проводилось у водному розчині, тому додатково було протестовано кілька моделей води, таких як SPC, TIP3P і TIP4P [169].

Критеріями оптимальних умов моделювання є структурна стабільність та збереження нативної структури протеази M^{pro} у розчині під час мікросекундного МД моделювання. У разі збереження нативної структури, це дозволяє використовувати цю модель для подальших досліджень взаємодії білка з лігандами. Стабільність нативної структури протеази оцінювалася шляхом

обчислення RMSD атомів головного ланцюга (див. Розділ 2) [223]. Приклад МД комірки для моделювання показано на рис. 5.1б.

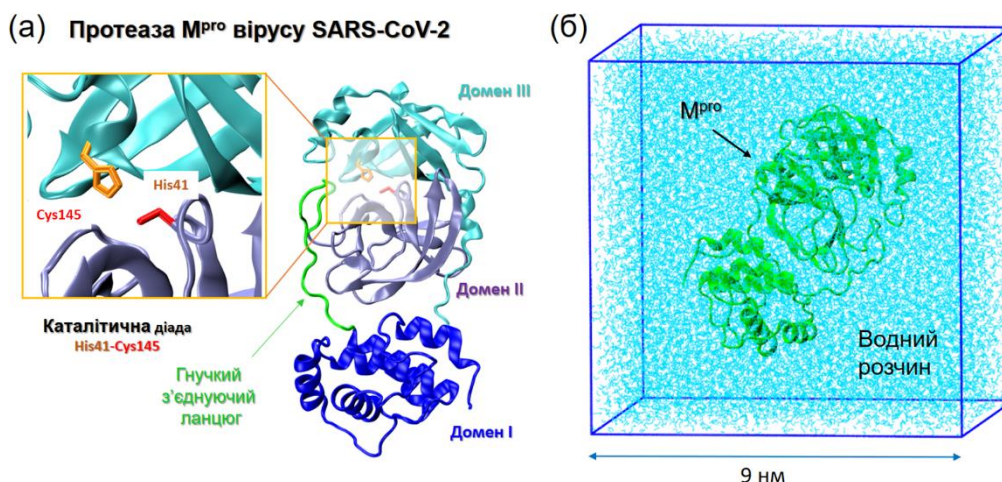


Рис. 5.1 – (а) Нативна будова протеази M^{pro} та її каталітичний центр. (б) Кубічна МД комірка, що містить протеазу M^{pro} у водному розчині.

На рисунку 5.2 представлені МД-траєкторії RMSD для атомів головного ланцюга протеази M^{pro}, отримані на основі моделювання із використанням шести обраних силових полів.

RMSD усіх атомів головного ланцюга було обчислено відносно їхніх положень у нативній рентгенівській структурі за допомогою програми GROMACS *rms*, яка розраховує відповідність поточної геометрії (τ_2) відносно її початкової нативної структури ($\tau_1=0$).

З рисунку видно, що всі досліджувані силові поля відтворювали нативну структуру мономерної форми M^{pro} протягом перших 350 нс, причому значення RMSD не перевищували 0,3–0,4 нм. Такий часовий інтервал зазвичай використовується у літературних дослідженнях на стабільність ліганд-протеїн.

На рис. 5.2 також видно, що при більш тривалому часі моделювання, які є типовими для оцінки вільної енергії Гіббса зв'язування інгібітора з рецептором, поведінка силових полів відрізнялася. Менші значення RMSD спостерігалися для моделей CHARMM27/TIP3P і OPLS-AA/TIP4P (рис. 5.2, *криві 1–2*). МД моделі G54a7 і AMBER03 демонстрували значне відхилення RMSD, що вказує

на часткову втрату білком його нативної структури після 350 нс (рис. 5.2, криві 3–4).

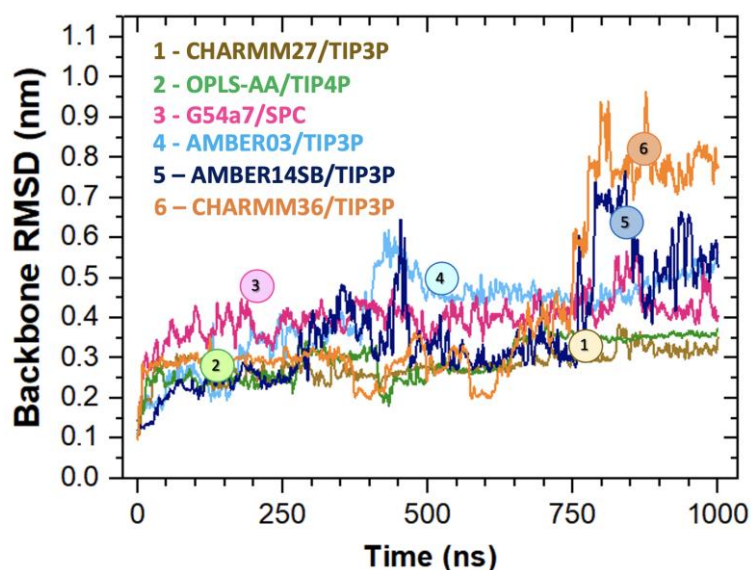


Рис. 5.2 - Порівняння часових залежностей відхилень RMSD для атомів поліпептидного ланцюга M^{pro} (PDB ID: 6LU7), розрахованих уздовж МД траєкторії з використанням шести різних комбінацій силових полів і моделей води: 1 –CHARMM27/TIP3P; 2 – OPLS-AA/TIP4P; 3 – G54a7-UA/SPC; 4 – AMBER03/TIP3P; 5 – AMBER14SB/TIP3P; 6 – CHARMM36/TIP3P.

Цікаво, що нові версії силових полів CHARMM і AMBER, такі як AMBER14SB, що були оптимізовані для моделювання третинної будови білків [254], і CHARMM36 [45], демонстрували хорошу відтворюваність впродовж перших 750 нс. Проте після проходження цього діапазона обидві моделі швидко втрачали нативний фолд таргетного рецептора M^{pro} (рис. 5.2, криві 5–6). Можливою причиною слабкої відтворюваності силовим полем AMBER14SB може бути те, що це силове поле віддає перевагу стабілізації α -спіральним структурам замість іншим елементам третинної структури, таким як β -листи, які якраз присутні в макромолекулі M^{pro} [35].

У той час як RMSD описує загальну розбіжність структури білка відносно його референсної конформації, інша структурна характеристика, така як

середньоквадратичне відхилення флуктуацій (RMSF) (Розділ 2), зазвичай використовується для оцінки стабільності окремих структурних фрагментів і доменів білка.

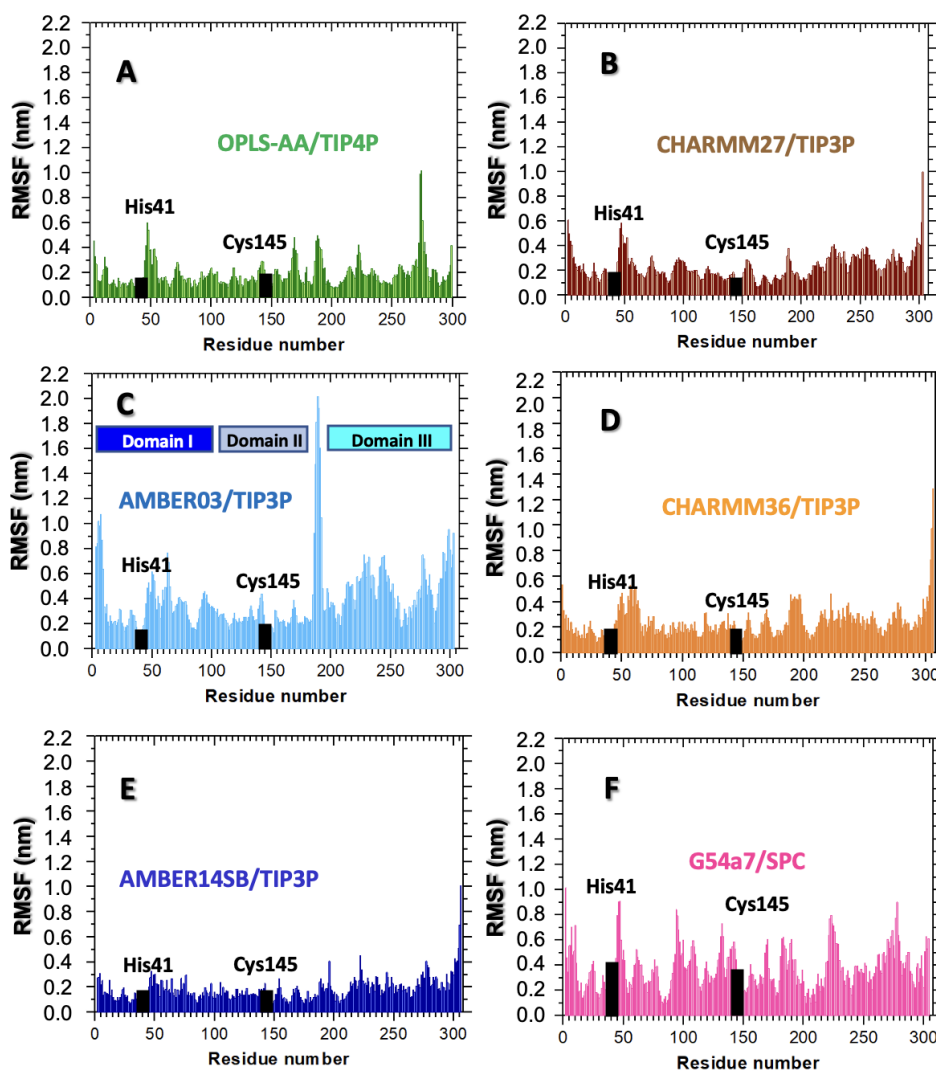


Рис. 5.3 - Розподіл RMSF для Ca атомів окремих амінокислотних залишків протеази M^{pro} . А – OPLS-AA/TIP4P; В – CHARMM27/TIP4P; С – AMBER/TIP3P; D – CHARMM36/TIP3P; Е – AMBER14SB/TIP3P; F – G54a7/SPC. Для усереднення RMSF використано останні 100 нс з МД траєкторії. Додаткові стовпчики підкреслюють на позиції каталітичних залишків His41 і Cys145, відповідно.

RMSF окремих амінокислотних залишків, розраховане для Ca атомів головного ланцюга M^{pro} , узагальнено на рис. 5.3. Варто відзначити, що

найбільший внесок у загальне відхилення RMSD зробили амінокислотні залишки, які не формують чітко визначеної третинної структури. Зокрема, залишки N-кінця 1–8 та C-кінця і 290–302 характеризуються як гнучка ланцюги. Найзначніші відхилення RMSF, за даними моделі AMBER03/TIP3P, були виявлені для залишків 170–180, які належать до петлі, що з'єднує домени (рис. 5.1a).

У порівнянні з цим, малі значення RMSF для залишків у доменах I, II та III свідчать про їх високу структурну стабільність. Графіки RMSF, оцінені за допомогою моделей OPLS-AA/TIP4P, CHARMM27/TIP3P, CHARMM36/TIP3P і AMBER14SB/TIP3P, демонструють добре збереження структури M^{pro} (рис. 5.3A, B, D і E).

МД траєкторія для кривих RMSD головного ланцюга поліпептиду або його середні значення RMSF для окремих амінокислотних залишків протеази M^{pro} дозволяють оцінити глобальну стабільність білка та його згортання. Однак, що стосується каталітичної активності M^{pro} , критично важливо зберегти нативну структуру активного центру та певну тривимірну конфігурацію та геометрію каталітичних амінокислотних залишків. Для протеази M^{pro} активним центром є каталітична діада амінокислот His41 і Cys145 [30].

На рис. 5.4 показано порівняння рівноважних конформацій всієї протеази та 3D конфігурація залишків її активного центру, оцінених за допомогою різних силових полів і моделей води. Можна відзначити, що результати фолдингу M^{pro} узгоджуються з розрахунками його будови за такими параметрами, як RMSD і RMSF (рис. 5.2 і 5.3), що свідчить про те, що серед розглянутих МД моделей найкращу відтворюваність нативної конфігурації активного центру протеази M^{pro} показали силові поля OPLS-AA/TIP4P та CHARMM27/TIP3P.

З рис. 5.4 видно, що згідно з МД розрахунками для силового поля OPLS-AA/TIP4P, конформація каталітичної пари His41 і Cys145 залишалася майже незмінною після 1 мкс моделювання.

Рис. 5.4 також дозволяє пояснити причини дещо більших значень RMSD головного ланцюга, оцінених за допомогою моделі CHARMM36/TIP3P (рис. 5.2,

крива б). Видно, що хоча ця модель добре відтворює нативну структуру домену II та взаємодію доменів II-III (рис. 5.1a), його слабка продуктивність у відтворенні неструктурованої гнучкої петлі призводить до певної втрати третинної структури між доменами.

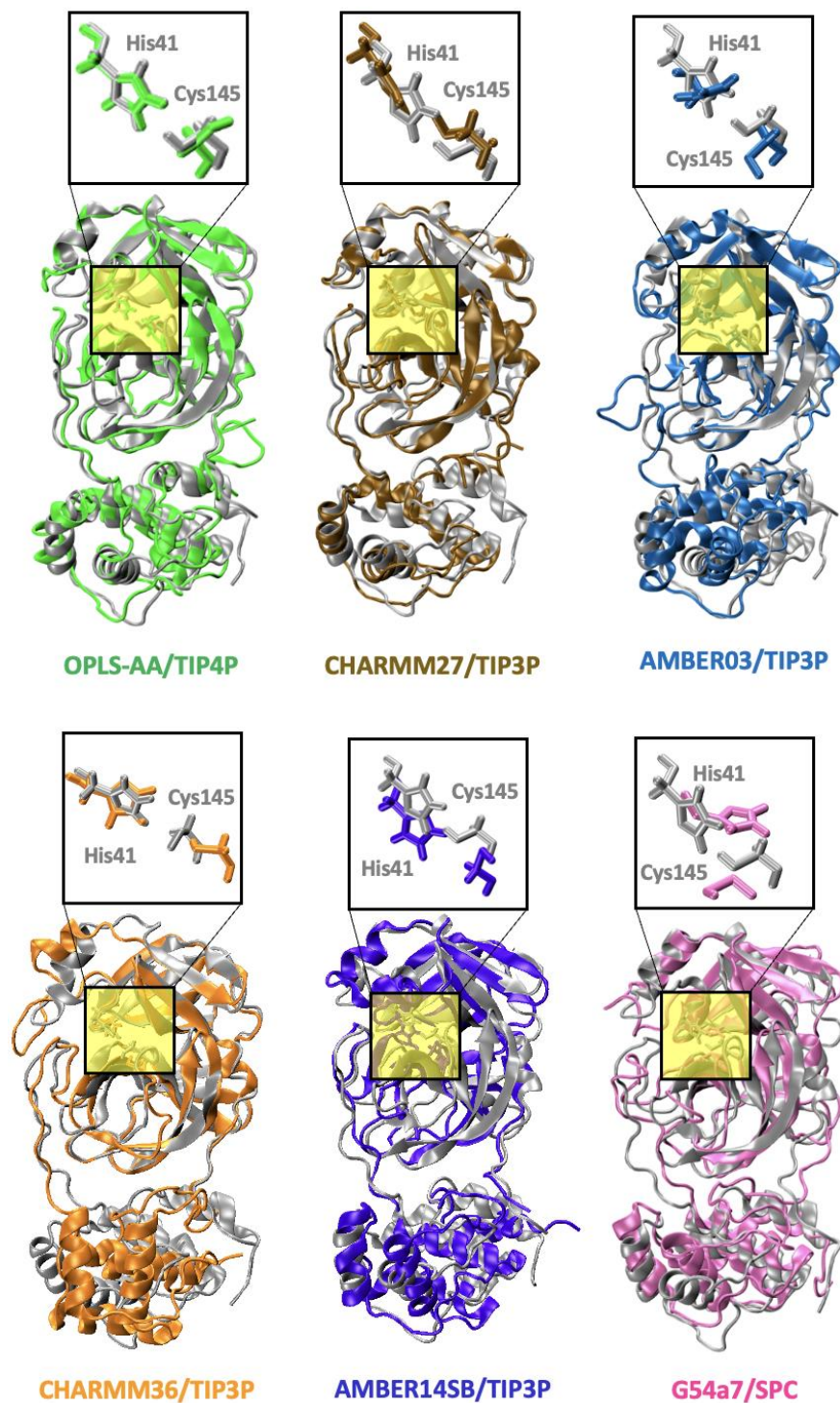


Рис. 5.4 - Порівняння рівноважної структури мономерної протеази M^{pro} (PDB ID: 6LU7), оціненої за допомогою МД моделювання із використанням

шести різних силових полів і моделей води. Верхні панелі показують накладання початкових (сірий) і фінальних (кольорові) положень каталітичних залишків His41 і Cys145, відповідно.

Роль протеази M^{pro} у реплікації коронавірусу SARS-CoV-2 полягає у розщепленні поліпептидів pp1a та pp1b [30,255]. Таким чином, активність ферменту M^{pro} критично залежить від правильної тривимірної конфігурації та відстані між каталітичною парою амінокислотних залишків His41 та Cys145. На рис. 5.5 порівнюються часові залежності відстані між атомами Cα-Cα залишків His41 та Cys145, розраховані за допомогою шести різних силових полів.

Відстань Cα-Cα між His41 та Cys145 у рентгенівській структурі M^{pro} становить 0,939 нм (рис. 5.1. а, PDB ID: 6LU7) [31,256]. Як видно з рис. 5.5, силове поле OPLS-AA/TIP4P відтворює це значення протягом усієї 1-мікросекундної МД траєкторії (рис. 5.5A). Силове поле CHARMM27/TIP3P демонструє невелике переоцінювання цієї відстані до 0,98–1,01 нм (рис. 5.5B).

Цікаво, що, незважаючи на слабку здатність відтворювати загальну структуру білка, обидва досліджувані силові поля AMBER могли зберігати експериментальну відстань між атомами Cα-Cα каталітичної діади (рис. 5.5C та 5.5E). Крім того, відповідно до часової залежності RMSD головного ланцюга (рис. 5.2), модель CHARMM36/TIP3P показувала добру узгодженість протягом перших 750 нс, після чого спостерігалася швидка втрата експериментальної будови та відхилення від референтної відстані Cα-Cα (рис. 5.5D).

Нарешті слід відмітити, що середньозернисте (united-atom) силове поле G54a7-UA/SPC демонструє систематичну тенденцію до значного зменшення відстані Cα-Cα до 0,75–0,82 нм (рис. 5.5F).

Цікаво, що, незважаючи на відносно низьку здатність силових полів AMBER03 і AMBER14SB відтворювати загальну тривимірну структуру білка, їх здатність відтворювати локальну відстань Cα-Cα між His41 і Cys145 виявилася близькою до значення, отриманого методом рентгенівської кристалографії. Таким чином, ці силові поля є хорошими кандидатами та часто використовуються у тестах на стабільність білків і лігандів методом МД

моделювання. Проте висока амплітуда змін відстані $C\alpha-C\alpha$, а також значні відхилення від референтного значення в останні 100 нс МД розрахунку не дозволяють рекомендувати ці силові поля для систематичного вивчення взаємодії білків і лігандів та для комп'ютерного скринінгу нових інгібіторів протеази M^{pro} .

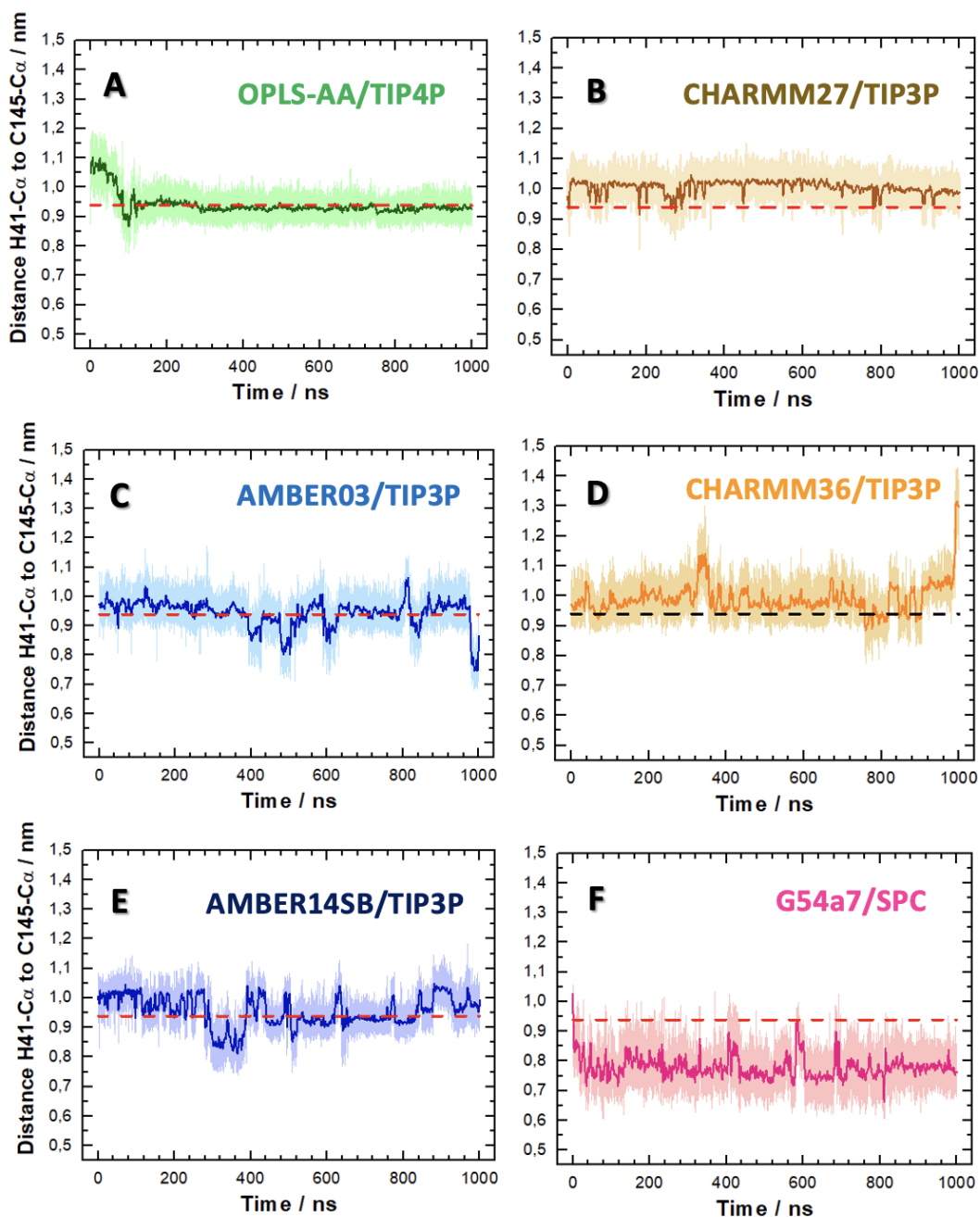


Рис. 5.5 - Порівняння часових залежностей відстані $C\alpha-C\alpha$ між α -вуглецевими атомами амінокислотних залишків His41 і Cys145 каталітичної пари протеази M^{pro} SARS-CoV-2, за результатами МД моделювання з використанням різних силових полів і моделей води: А – OPLS-AA/TIP4P; В –

CHARMM27/TIP3P; C – AMBER03/TIP3P; D – CHARMM36/TIP3P; E – AMBER14SB/TIP3P; F – G54a7/SPC. Пунктирна лінія відповідає відстані Ca-Ca, отриманій із рентгеноструктурного аналізу M^{pro} (PDB ID: 6LU7).

5.1.2 Вплив NaCl і температури на фолдинг M^{pro}

МД моделювання противірусних препаратів проти вірусу SARS-CoV-2, в яких розглядаються заряджені ліганди та цвіттер-іонні пептидоміметики, вимагає врахування умов максимально наближених до умов фізіологічного розчину [257,258].

З метою імітування впливу іонної сили та високої концентрації солі у розчині та температури тіла людини на відтворюваність природної конформації мономерної форми ферменту M^{pro}, ми додатково протестували дві з відібраних моделей — OPLS-AA/TIP4P та CHARMM27/TIP3P — на предмет моделювання у присутності 100 mM NaCl та за підвищеної температури 310 K (рис. 5.6).

На рис. 5.6A-B показано порівняння часових залежностей RMSD головного ланцюга, розрахованих за стандартних умов (0 mM NaCl, T = 298.15 K) та фізіологічних умов (100 mM NaCl, T = 310 K). Видно, що модель CHARMM27/TIP3P майже не виявило відмінностей у збереженні природної конформації M^{pro} за умов моделювання у фізіологічному розчині. Цікаво, що МД моделювання з використанням моделі OPLS-AA/TIP4P демонструє деяке зменшення значень RMSD головного ланцюга, що свідчить про стабілізацію природної конформації M^{pro} під впливом присутності солі та підвищеної температури 310 K.

Подібна тенденція спостерігається у відтворенні відстані Ca-Ca між залишками каталітичної діади, як показано на рис. 5.6C-D. МД модель OPLS-AA/TIP4P (100 mM NaCl, 310 K) демонструє відмінну відтворюваність структури активного центру M^{pro} протягом 1 мкс МД розрахунку, що дозволяє рекомендувати цю модель як основну для комп'ютерного скринінгу стабільності та енергетики комплексів M^{pro} з інгібуючими лігандами.

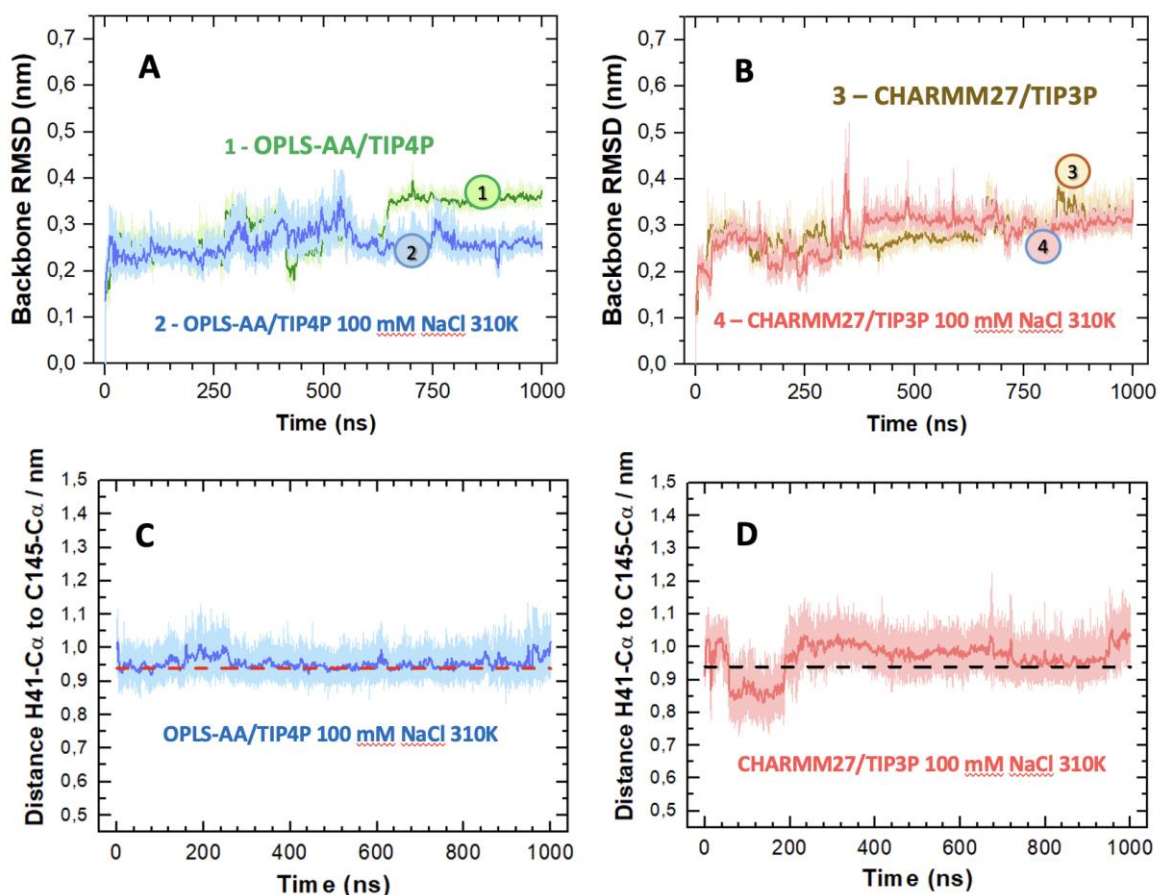


Рис. 5.6 - Вплив NaCl та підвищеної температури 310 K на фолдинг протеази M^{pro} на прикладі двох моделей OPLS-AA/TIP4P та CHARMM27/TIP3P. (A-B) Порівняння часових проміжків RMSD відхилень для атомів остова M^{pro}, розрахованих за стандартних і фізіологічних умов (100 mM NaCl, T = 310 K): A - OPLS-AA/TIP4P; B - OPLS-AA/TIP4P; C - CHARMM27/TIP3P. CHARMM27/TIP3P. (C-D) Часові залежності відстані C α -C α між α -вуглецевими атомами для амінокислотних залишків His41 та Cys145, розраховані за фізіологічних умов C - OPLS-AA/TIP4P; D - CHARMM27/TIP3P. Пунктирна лінія відповідає відстані C α -C α , взятій з рентгенівської структури M^{pro} (PDB ID: 6LU7).

5.1.3 МД моделювання димерної форми протеази M^{pro}

Останні літературні дані свідчать про те, що протеаза M^{pro} у активній фазі реплікації та проліферації вірусу SARS-CoV-2 може виступати у формі гомодимеру, що складається з двох ідентичних субодиниць A і B [30]. Крім того,

в літературі згадується кілька протівірусних стратегій, спрямованих на інгібування димеризації протеази M^{pro} [252,259,260]. З іншої сторони, на сьогодні відсутні дані стосовно затверджених інгібіторів здатних блокувати безпосередньо димеризацію мономерів M^{pro} . Натомість кількість розроблених інгібіторів, спрямованих на сайт зв'язування активного центру M^{pro} SARS-CoV-2 постійно зростає [261]. У зв'язку з цим, нами було також протестовано відтворюваність димерної структури M^{pro} відібраними у попередній частині роботи моделями OPLS-AA/TIP4P і CHARMM27/TIP3P.

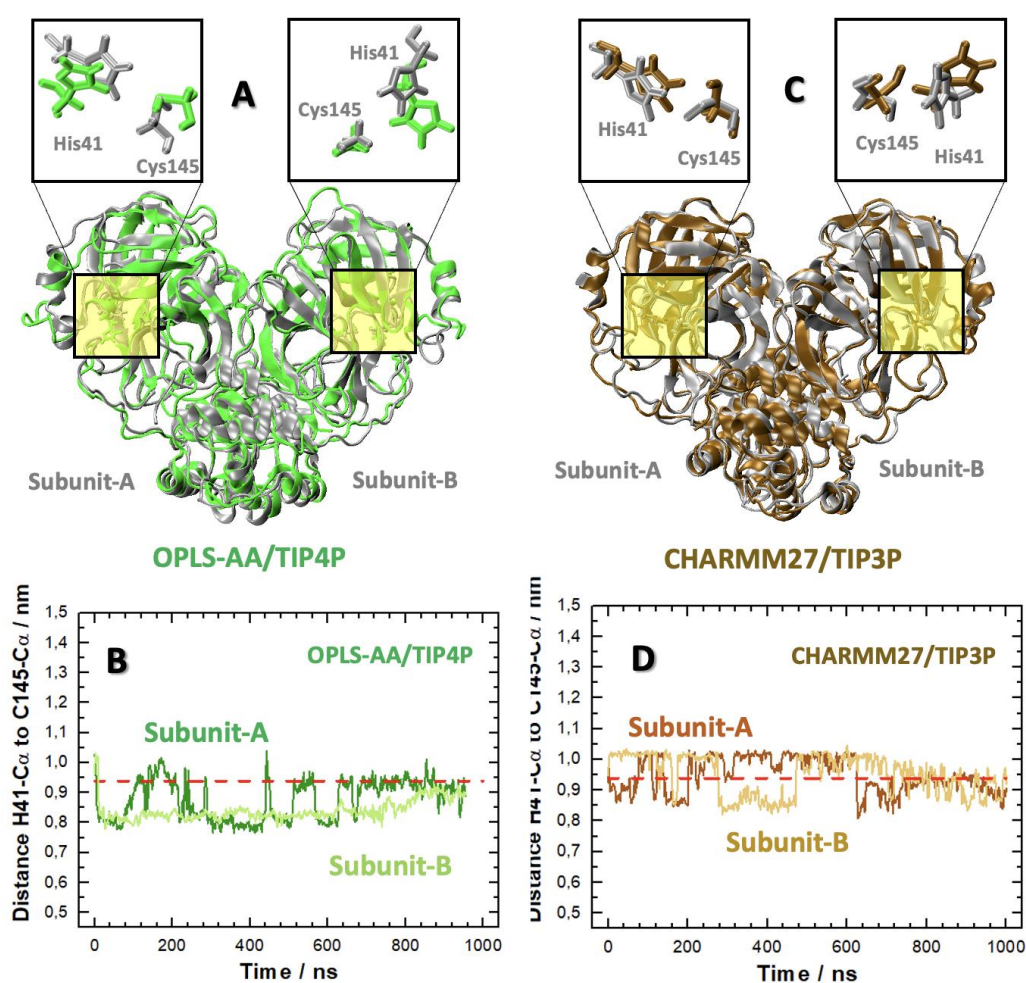


Рис. 5.7 - Тестування МД моделей OPLS-AA/TIP4P (A-B) та CHARMM27/TIP3P (C-D) у відтворенні фолдингу гомодимера M^{pro} (PDB ID: 6LU7). Порівняння загального збереження структури димерної форми M^{pro} (A і C). (B і D) Часові залежності відстані Cα-Cα між α-вуглецевими атомами

амінокислотних залишків His41 і Cys145, розраховані окремо для кожної з двох субодиниць А і В, відповідно.

На рис. 5.7 підсумовано МД результати відтворення нативної конформації та структури каталітичної субодиниці димерної форми M^{pro} . Видно, що обидва вибрані МД моделі добре відтворили нативну конформацію гомодимеру M^{pro} протягом 1 мкс моделювання. Однак більш детальний аналіз збереження тривимірної структури каталітичних доменів II і III у субодиницях А і В, а також відтворення рентгенівської відстані $Ca-Ca$ між діадою His41 і Cys145 вказує на дещо кращу продуктивність моделі CHARMM27/TIP3P (рис. 5.7C-D).

Таким чином, МД моделювання вказує на важливу роль гнучкого лінкера між доменом I та доменами II/III M^{pro} у стабілізації білкових взаємодій при димеризації M^{pro} . Крім того, ці результати також демонструють, що хороша відтворюваність певним силовим полем фолдингу мономеру білка не гарантує такого ж рівня відтворюваності для його димеру.

5.1.4 МД моделювання комплексів «ліганд- M^{pro} »

Молекулярний докінг надає цінну інформацію про сприятливий спосіб зв'язування та спорідненість ліганду до ферменту, однак, його основним недоліком є те, що метод не дозволяє враховувати специфічну взаємодію з молекулами розчинника та сольватаційні ефекти. Тому стабільність комплексів інгібітор-фермент, які отримані методом молекулярного докінгу, була оцінена методом молекулярно-динамічного моделювання в об'ємному водному розчині. Для розрахунків МД використовувалася повноатомна модель протеази M^{pro} та силове поле OPLS-AA.

На рисунку 5.7 показана МД комірка, яка містить комплекс нірмітралвіру з протеазою M^{pro} (Розділи 3.1 та 3.3). Початкова геометрія комплексу відповідала найбільш вигіднішій структурі за результатами молекулярного докінгу. МД комірка заповнювалася молекулами води (TIP3P).

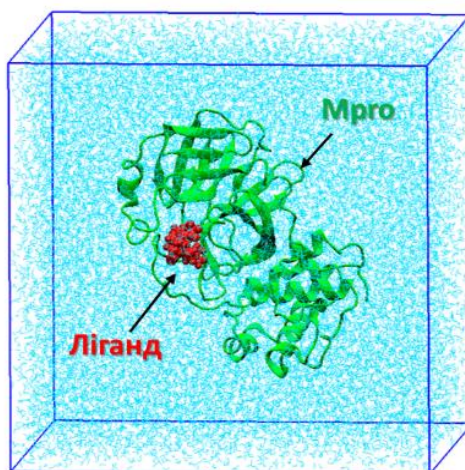


Рис. 5.7 – МД комірка з комплексом нірмітралвіру з ферментом M^{pro} для повноатомного МД моделювання OPLS-AA/TIP3P.

Результати МД моделювання показали високу стабільність комплексу нірмітралвіру (1) з протеазою M^{pro} (рис. 5.8).

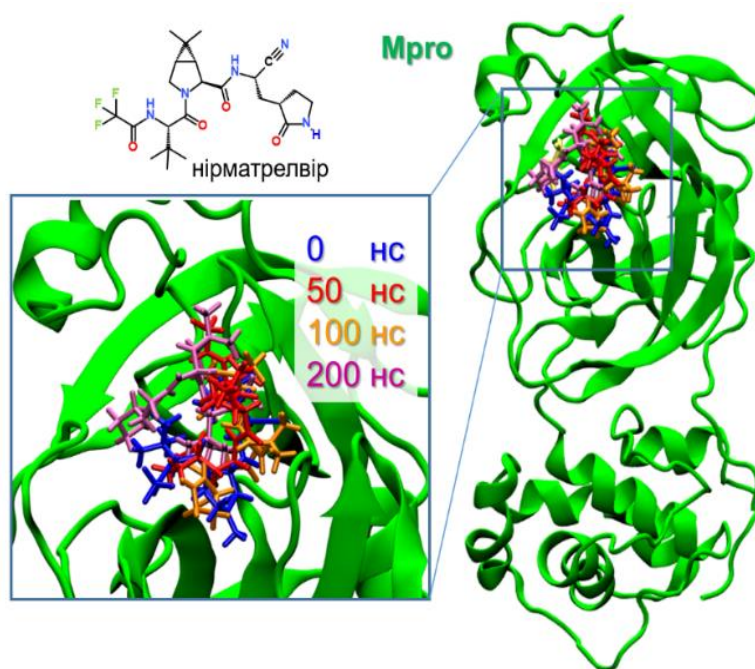


Рис. 5.8 – Розташування інгібітору нірматрелвіру у активному центрі протеази M^{pro} у різні часові інтервали (0, 50, 100 та 200 нс) за результатами МД моделювання у водному розчині.

Хоча молекула нірматрелвіру (1) у складі комплексу мала високу конформаційну лабільність, вона залишалася зв'язаною з ферментом в продовж 200 нс МД моделювання, як представлено на рисунку 5.8. При цьому, молекула інгібітору весь час знаходилася у активному центрі протеази та блокувала доступ інших реагентів до каталітичної діади His41-Cys145.

Конформаційна лабільність молекули нібмітралвіру (1) у комплексі з ферментом головної протеази M^{pro} була кількісно оцінена [116], як середньоквадратичне відхилення RMSD поточних координат молекули відносно референтної геометрії, яка відповідала структурі з молекулярного докінгу. На рисунку 5.9. показана траєкторія зміни RMSD, як функція часу МД моделювання.

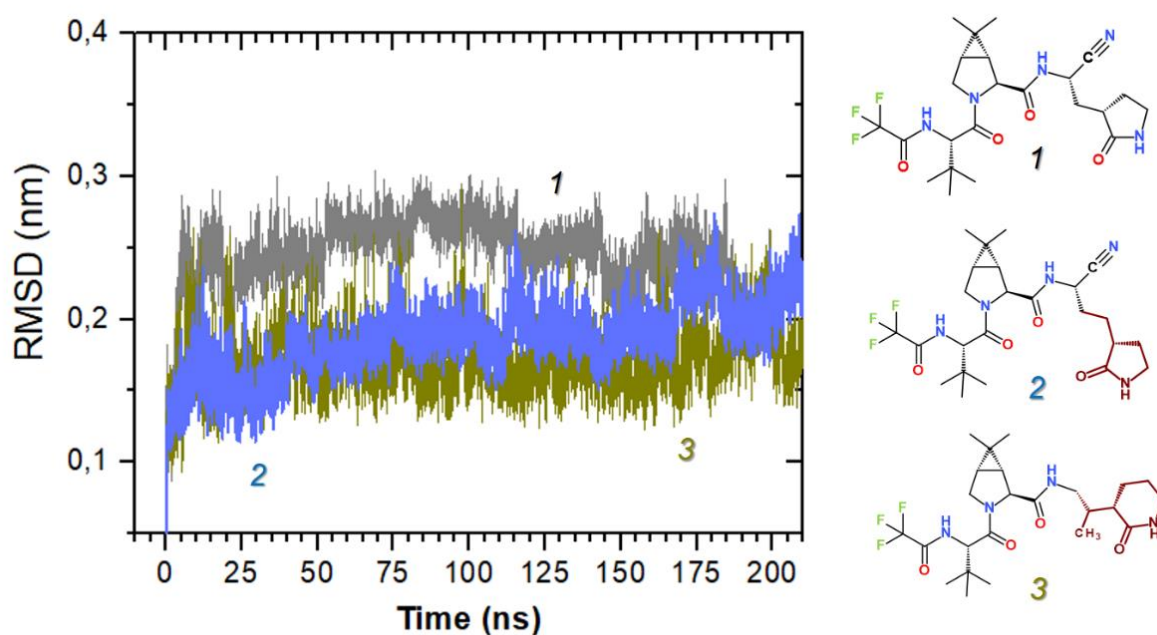


Рис. 5.9 – Середньоквадратичне відхилення координат референсного інгібітора нірматрелвіру 1 та двох його аналогів 2-3 у комплексі з ферментом протеази M^{pro} за результатами МД моделювання.

З рисунку 5.9 видно, що відхилення координат молекули інгібітору від референтних значень знаходилось у діапазоні 0.2-0.25 нм, при цьому починаючи з 25 нс моделювання крива RMSD досягала цих значень та виходила на плато,

що вказує на досягнення рівноважної будови комплексу. Аналогічні розрахунки для двох аналогів нірматрелвіру 2 та 3 показали менші значення RMSD на рівні 0.16-0.22 нм, що вказує на меншу рухливість молекул цих похідних у активному центрі ферменту, як показано на рис. 5.9.

5.2 МД моделювання папаїноподібної протеази (PL^{pro}) вірусу SARS-CoV-2

Папаїноподібна протеаза (PL^{pro}) коронавірусу SARS-CoV-2 є ключовим ферментом для реплікації вірусу, відповідальним за обробку неструктурних білків Nsp1, Nsp2 і Nsp3 шляхом розщеплення N-кінця реплікативного поліпротеїну (Розділ 1). В літературі показано, що інгібування протеази PL^{pro} може відбуватися за різними механізмами [30,262]. Пряме інгібування націлюється на активний центр ферменту за допомогою молекул, які імітують природний субстрат, ефективно блокуючи його функцію [263,264]. Альтернативним механізмом є алостеричне інгібування, що передбачає вплив на інші регуляторні ділянки білка, що змінює його локальну структуру та модулює його активність [25,59,265].

Пептидні інгібітори, включаючи пептидоміметики, підвищують стабільність і селективність, взаємодіючи з активним центром протеази PL^{pro} (рис. 5.10) [266]. У цьому контексті методи комп'ютерного дизайну лікарських засобів [30,116,267,268], такі як віртуальний скринінг, молекулярний докінг та молекулярна динаміка стали перспективними інструментами для відкриття нових ефективних інгібіторів PL^{pro} [81,93,264,269].

Для прогнозування спорідненості PL^{pro} до лігандів і вивчення взаємодій ліганд-рецептор на молекулярному рівні ефективним є використання обчислювальних інструментів, таких як молекулярний докінг і молекулярно-динамічне моделювання, із застосуванням різних емпіричних силових полів, зокрема CHARMM27 [270], CHARMM36 [19,271–274], різних версій AMBER [250,275–278], OPLS-3e [279–281], OPLS-AA [282,283], GROMOS FF [284] і GROMOS96 54a7 [285,286].

Для ефективного проектування нових інгібіторів PL^{pro} важливо встановити консенсус щодо найбільш точних силових полів для подальших досліджень [1], що забезпечить надійні та відтворювані результати під час *in silico* скринінгу ефективних інгібіторів.

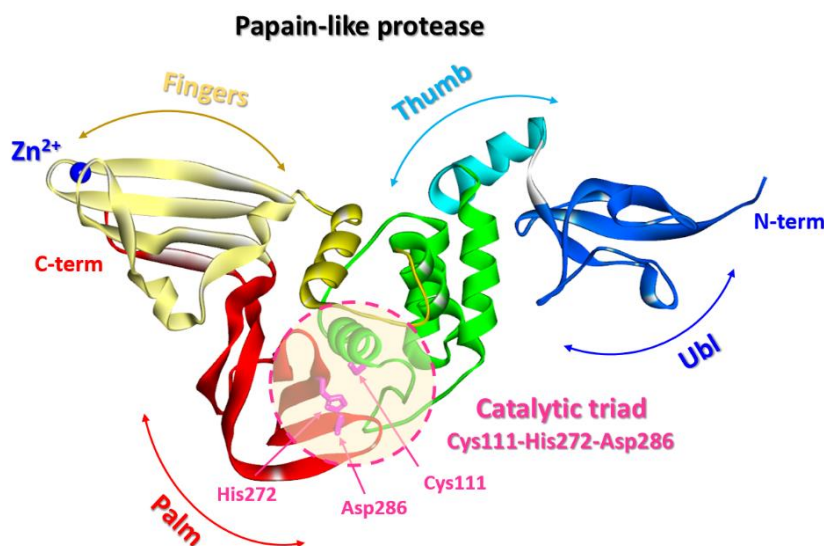


Рис. 5.10 – Структура протеази PL^{pro}: убіквітиноподібний (Ubl) домен на N-кінці, домен, що зв'язує іон цинку, та каталітичний домен thumb-palm. Каталітичний активний центр, що містить каталітичну тріаду Cys111-His272-Asp286 (позначено затемненим колом) (PDB 6WX4).

5.2.1 Порівняння силових полів для моделювання фолдингу PL^{pro}

В науковій літературі вже використовувались окремі МД розрахунки для вивчення структури, енергетики та стабільності комплексів PL^{pro}-ліганд з типовою часовою шкалою від 50 до 200 нс [285,286]. Типовий протокол такого МД моделювання містив стандартні структурно-енергетичні параметри, такі як RMSD, RMSF окремих амінокислотних залишків та радіус інерції (radius of gyration, R_g) всієї макромолекули. Однак точність і надійність цих параметрів вимагають надійної відтворюваності природної будови (native fold) досліджуваного білка за допомогою емпіричних силових полів. Тому, важливим було провести критичний аналіз літературних даних та виконати власні тестові

розрахунки з метою визначення найбільш оптимального силового поля для МД моделювання протеази PL^{pro} у фізіологічних умовах.

Для порівняння ефективності деяких популярних біомолекулярних силових полів було проведено МД моделювання протеази PL^{pro}, використовуючи чотири різні силові поля:

1. OPLS-AA
2. CHARMM27
3. CHARMM36
4. AMBER03

На додаток, МД моделювання здійснювалося у поєднанні з різними силовими полями та моделями води, такими як, TIP3P, TIP4P та TIP5P, відповідно. Кожна тестова система PL^{pro} досліджувалася протягом до 1 мкс. Деякі важливі деталі МД моделювання представлені в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1.

Параметри МД моделювання для досліджуваних систем PL^{pro}

Силове поле та умови моделювання	Кількість молекул води	Кількість протиіонів	Розмір комірки для моделювання (нм)
CHARMM27/TIP3P	22344	5 Cl ⁻	8.99×8.99×8.99
CHARMM36/TIP3P	22342	5 Cl ⁻	8.91×8.91×8.91
AMBER03/TIP3P	22334	5 Cl ⁻	8.97×8.97×8.97
OPLS-AA/TIP3P	22341	5 Cl ⁻	9.00×9.00×9.00
OPLS-AA/TIP4P	22638	5 Cl ⁻	9.00×9.00×9.00
OPLS-AA/TIP5P	22155	5 Cl ⁻	8.97×8.97×8.97
OPLS-AA/TIP3P 100mM NaCl, 310 K	22255	44 Na ⁺ , 49 Cl ⁻	9.02×9.02×9.02
OPLS-AA/TIP4P 100mM NaCl, 310 K	22254	44 Na ⁺ , 49 Cl ⁻	9.01×9.01×9.01

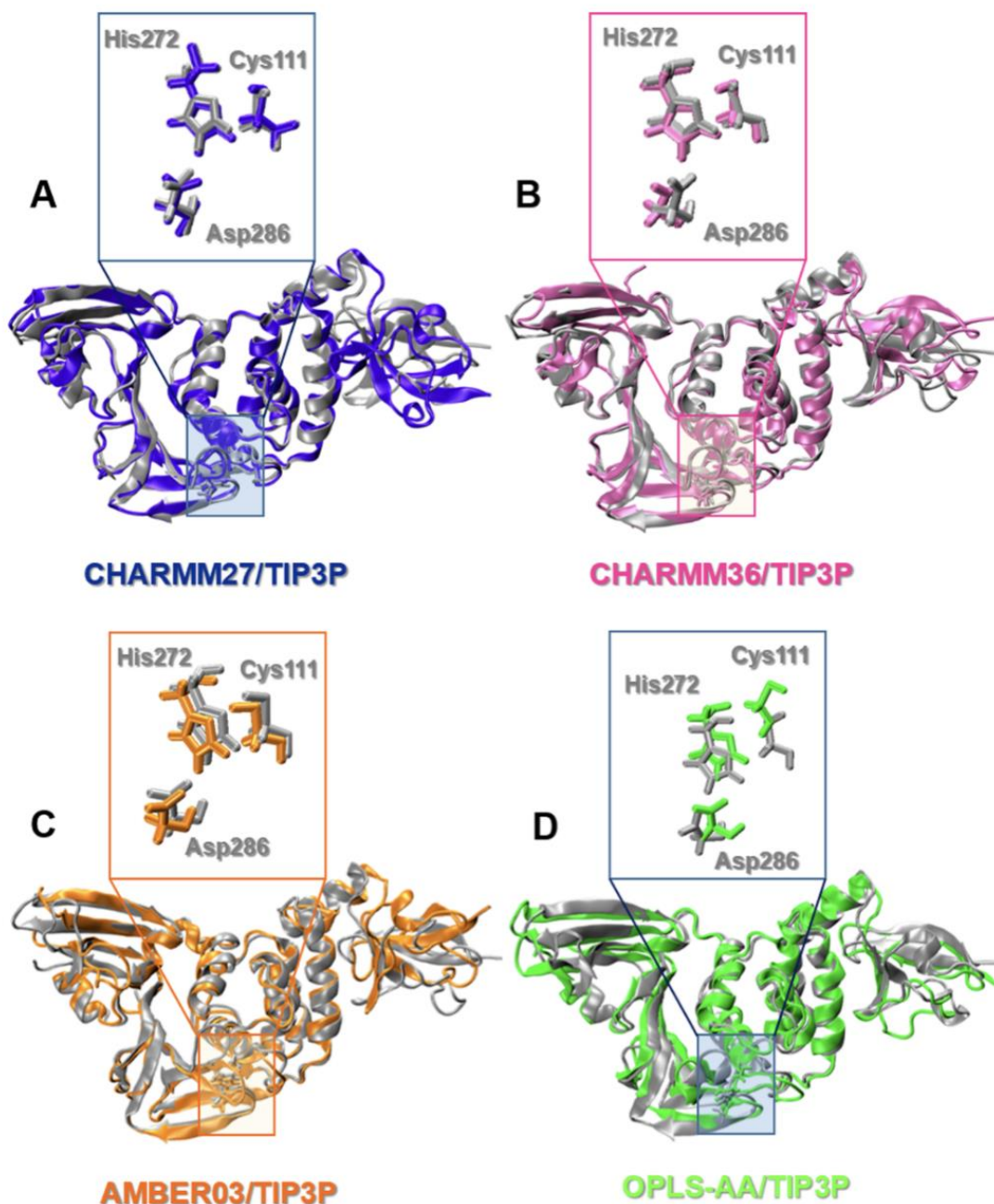


Рис. 5.11 - Порівняння рівноважної структури протеази PL^{pro} (PDB: 7SGW), отриманої за допомогою МД-моделювання із використанням чотирьох різних силових полів та моделі води TIP3P наприкінці 1 мкс моделювання. Верхні панелі демонструють накладання початкових (сірий колір) і фінальних (кольорові) положень каталітичних залишків Cys111, His272 та Asp286, відповідно.

Структура протеази PL^{pro} представлена на рис. 5.10. PL^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2 складається з 315 амінокислотних залишків і має високий вміст цистеїнів (3,5%). Структура PL^{pro} містить три домени: невеликий убіквітиноподібний (Ubl) домен на N-кінці, домен, що зв'язує цинк, та каталітичний домен thumb-palm, який іноді розглядають як два окремі субдомени.

Рисунок 5.11 демонструє результати МД моделювання та накладання початкової рентгенівської структури протеази PL^{pro} на фінальну структуру, отриману після рівноважного МД моделювання, взяту наприкінці 1 мкс траєкторії. Можна помітити добру відтворюваність складки білка у доменах thumb-palm та zinc-binding. Однак у всіх досліджених силових полях систематично спостерігалось локальна денатурація (unfolding) N-кінцевого Ubl-домену.

Панелі-вставки на рис. 5.11 демонструють розташування ключових каталітичних залишків, зроблені на початку та наприкінці МД моделювання. Незважаючи на локальні порушення будови (misfolding) у сегменті thumb-palm, загальна 3D-конформація каталітичної тріади (Cys111, His272, Asp286) залишалася стабільною.

На рисунку 5.12 МД-траєкторії показано зміщення RMSD поліпептидного ланцюга протеази PL^{pro}, змодельовані з використанням чотирьох різних силових полів. Усі силові поля показали, що нативний фолдинг PL^{pro} відтворюється протягом перших 350–400 наносекунд, причому значення RMSD залишаються нижче 0,4 нм.

У більшості досліджень стабільності комплексів ліганд-протеїн зазвичай використовується часовий інтервал 100–200 нс. Важливо зазначити, що наші розрахунки свідчать про те, що впродовж перших 200 нс всі тестові системи демонструють доволі невеликі значення середньоквадратичного відхилення RMSD атомів поліпептидного ланцюга (рис. 5.12). Однак, після 500 нс моделювання деякі силові поля, такі як силове поле CHARMM,

продemonстрували різке зростання RMSD, що свідчить про розгортання білка та втрату нативної будови.

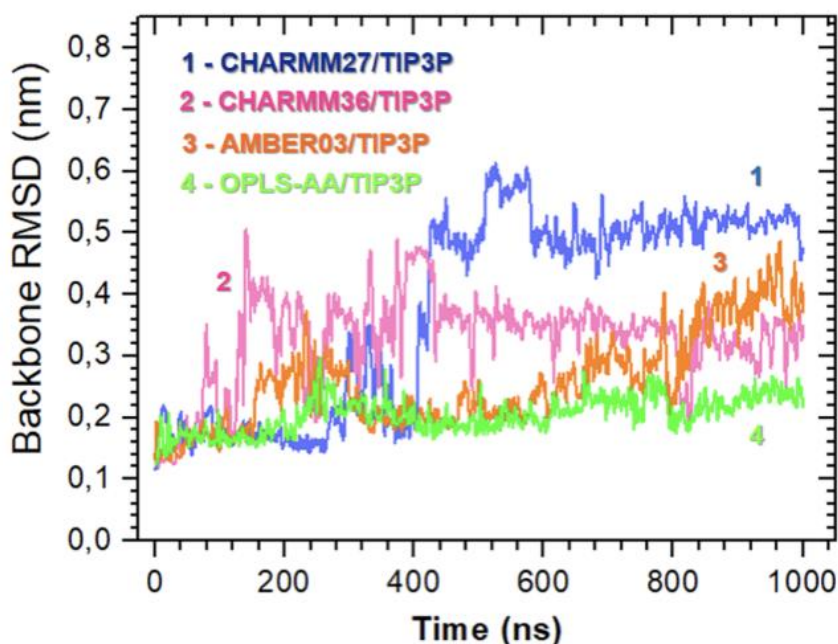


Рис. 5.12 - Порівняння часових залежностей RMSD для атомів поліпептидного ланцюга PL^{pro} (PDB: 7SGW) як функція часу, розрахованих із використанням чотирьох різних силових полів і моделі води TIP3P: 1 – CHARMM27/TIP3P; 2 – CHARMM36/TIP3P; 3 – AMBER03/TIP3P; 4 – OPLS-AA/TIP3P.

Відомо, що такий параметр, як середньоквадратичне відхилення (RMSD) поліпептидного ланцюга є мірою загальної відтворюваності експериментальної третинної будови та тривимірної конформації макромолекули, проте цей параметр може суттєво відрізнятися у різних ділянках білка, таких як α -спіралі, β -складки та гнучкі неструктуровані петлі [257,258,287–290]. Ця різниця спостерігалась при МД тестування протеази M^{pro}, як показано у Розділі 5.1. Тому відхилення окремих залишків PL^{pro} від їхнього середнього положення було оцінено через аналіз іншого параметру, такого як RMSF окремих амінокислотних залишків, як показано на рис. 5.13.

Аналіз кривої RMSF демонструє рухливість кожного амінокислотного залишку, що дозволяє виявити найбільш гнучкі ділянки білка. Аналіз кривих

RMSF вказує, що найбільші піки амплітуди спостерігалися для таких фрагментів: Ubl- та Fingers-субдоменах, петлі BL2 у palm-субдомені, залишках 195–197 та 222–225. Попередні літературні дослідження показали, що петля BL2 на вході в активний центр PL^{pro} має високу пластичність, що може бути критичним фактором для алостеричного зв'язування інгібіторів більшого розміру [250].

Подібний патерн RMSF спостерігався в літературі після 1 мкс МД моделювання PL^{pro}, проведеного з використанням силового поля GAFF2 та водної моделі TIP3P [275].

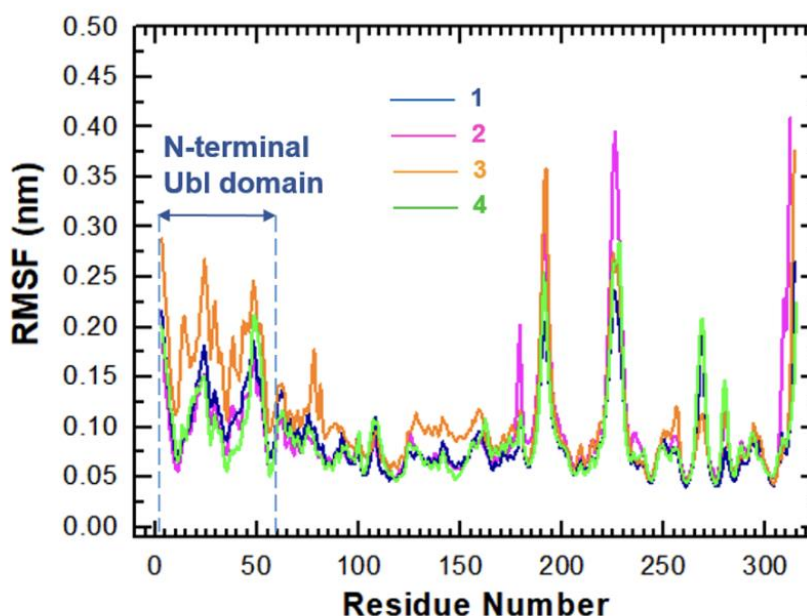


Рис. 5.13 – Порівняння RMSF для окремих амінокислотних залишків протеази PL^{pro} (PDB: 7SGW), оцінене за допомогою різних силових полів: 1 – CHARMM27/TIP3P; 2 – CHARMM36/TIP3P; 3 – AMBER03/TIP3P; 4 – OPLS-AA/TIP3P.

На рис. 5.13 видно два чітких піки RMSF у залишках петлі BL2 (195–197 і 222–225). Крім того, спостерігається підвищена рухливість у N-кінцевому Ubl-домені (залишки 3–71). Ця гнучка ділянка білка може бути відповідальною за високоамплітудну поведінку на графіках RMSD, показаному на рис. 5.12.

У зв'язку з тим, що висока рухливість N-кінцевого Ubl-домену, який не є каталітично активним, може вносити високу похибку в оцінку загального середньоквадратичного відхилення всієї макромолекули, було доцільним перерахувати RMSD для протеази PL^{pro} без урахування конформаційної динаміки N-кінцевого Ubl-домену. Результати такого перерахунку та порівняння з розрахунков для всього білка, показані на рис. 5.14. Як видно, графіки RMSD для каталітичного thumb-palm- та Fingers-доменів демонструють мінімальні коливання поліпептидного ланцюга, причому силові поля AMBER03/TIP3P та OPLS-AA/TIP3P показали значення RMSD нижче 0.3 нм.

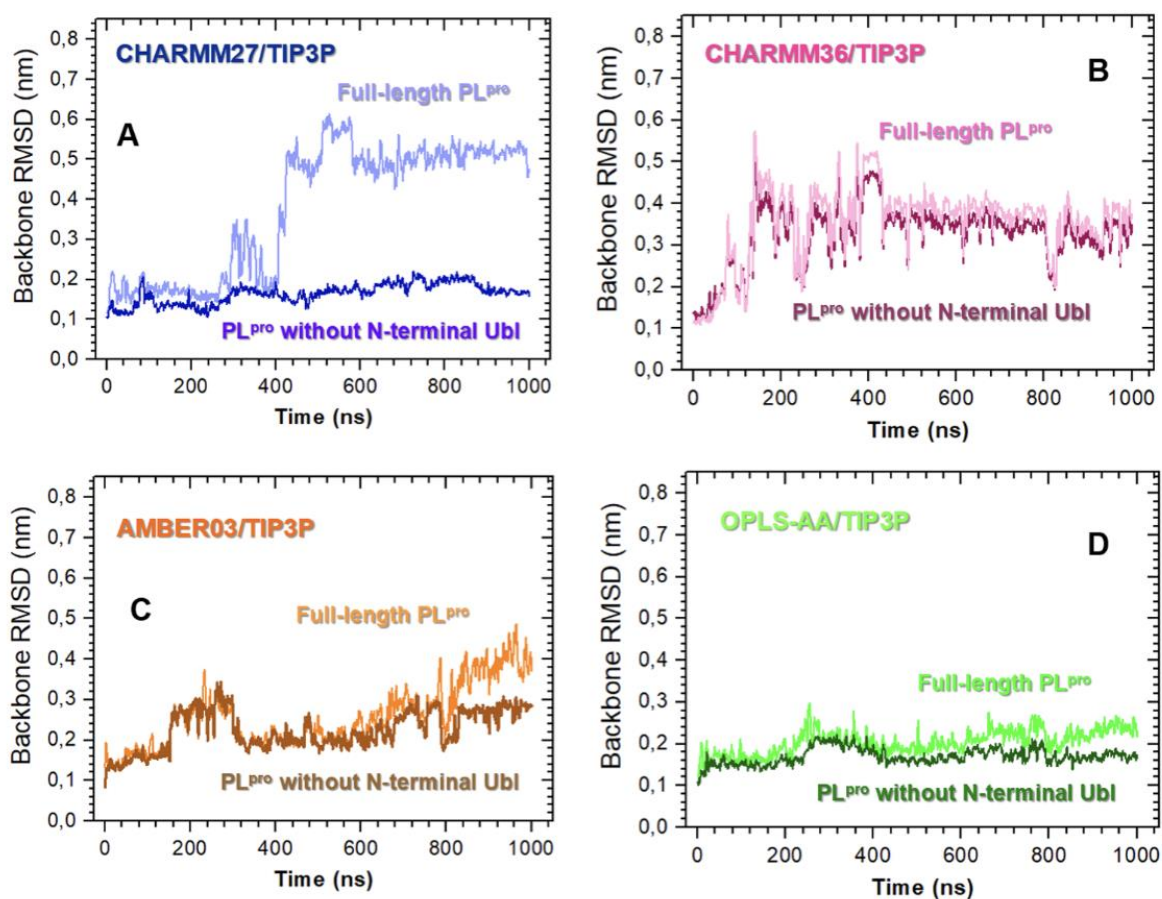


Рис. 5.14 - Порівняння графіків часової залежності RMSD для повнорозмірного білка та усіченого PL^{pro} без N-кінцевого Ubl-домену (PDB: 7SGW). RMSD розраховували як функцію часу моделювання з використанням чотирьох різних силових полів та моделі водни TIP3P: A – CHARMM27/TIP3P; B – CHARMM36/TIP3P; C – AMBER03/TIP3P; D – OPLS-AA/TIP3P.

Протеаза PL^{pro} відіграє ключову роль у протеолізі та реплікації коронавірусу SARS-CoV-2 [30,263]. Аналіз наукової літератури показав, що ферментативна активність PL^{pro} на пряму залежить від правильної 3D-конфігурації та відстані між каталітичною парою амінокислот Cys111-His272. У цій каталітичній парі: Cys111 виконує функцію нуклеофіла, а залишок His272 діє як кислотно-основний каталізатор. Таким чином, зміни у відстані Cys111-His272 безпосередньо впливають на протонування/депротонування та формування іонної пари Cys111⁻/His272H⁺ під час ферментативного каталізу [30,51].

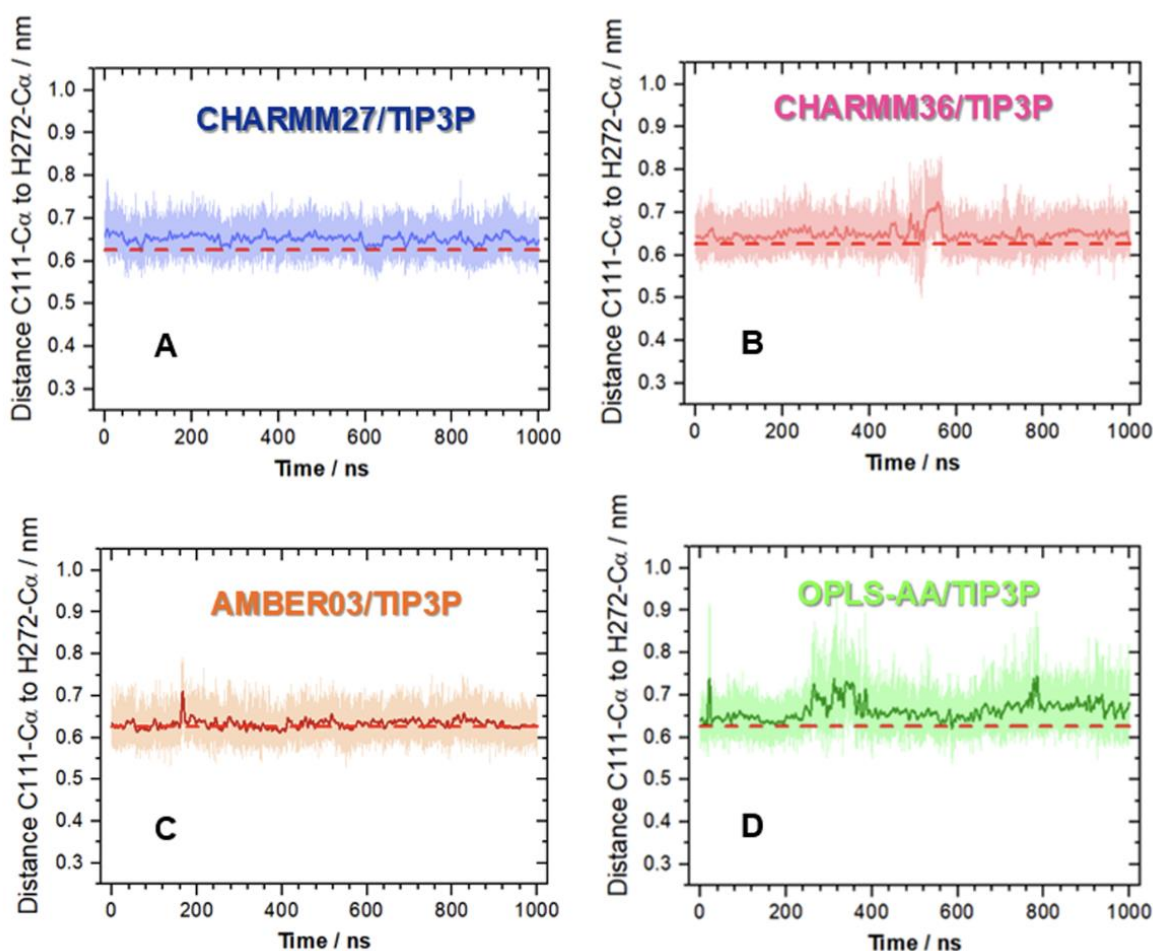


Рис. 5.15 - Часові залежності відстані C α -C α між α -вуглецевими атомами каталітичних залишків Cys111 і His272 у протеазі PL^{pro}, розраховані з використанням різних силових полів: А – CHARMM27/TIP3P; В – CHARMM36/TIP3P; С – AMBER03/TIP3P; D – OPLS-AA/TIP3P. Пунктирна лінія відповідає відстані C α -C α 0.626 нм, отриманий із рентгенівської структури PL^{pro} (PDB: 7SGW).

На рис. 5.15 показано порівняння часової залежності відстані між атомами C_{α} - C_{α} амінокислот Cys111 і His472 у PL^{pro} , розрахованих з використанням чотирьох різних силових полів. Слід відмітити, що у рентгенівській структурі PL^{pro} (PDB: 7SGW) ця відстань C_{α} - C_{α} між Cys111 і His472 становить 0.626 нм.

5.2.2 Порівняння силового поля OPLS-AA при моделюванні фолдингу PL^{pro} у поєднанні з різними моделями води

Окрім правильного вибору біомолекулярних силових полів, вибір моделі розчинника, в намошу випадку води, має значний вплив на МД моделювання рівноважну конформацію макромолекул і стабільність всього комплексу білок-ліганд [285,291–293]. Тому нами було виконано додаткову перевірку того, як зміна параметрів силового поля розчинника впливає на відтворюваність нативної будови протеази PL^{pro} .

МД моделювання з використанням трьох різних моделей води дали подібні результати щодо середньоквадратичного відхилення атомів поліпептидного ланцюга, як у випадку повної версії протеази PL^{pro} , так і для її версії без N-кінцевого домену, як показано на рис. 5.16A-C.

Моделювання з використанням популярної моделі TIP3P показало найменші варіації та флуктуації атомів поліпептидного ланцюга PL^{pro} порівняно з більш складними чотириточковою моделлю TIP4P та п'ятиточковою моделлю TIP5P, як проілюстровано на рис. 5.16D-F. Щодо відтворювання експериментальних значень відстані C_{α} - C_{α} між каталізаторними залишками Cys111 та His272, п'ятиточкова модель TIP5P показала чудову відповідність із рентгенівським значенням (див. рис. 5.16J). Причиною цього може бути те, що модель TIP5P має відповідний розподіл зарядів по молекулі води, що призводить до більш фізично релевантного електростатичного опису взаємодій білок-розчинник і покращеної стабілізації третинної білкової структури [293].

Однак, як обчислювальний інструмент для скринінгу великих бібліотек лігандів, модель TIP5P здається занадто вимогливою з точки зору необхідних обчислювальних ресурсів. Підсумовуючи, слід відмітити, що комбінація

силового поля білка і модель води, така як OPLS-AA/TIP3P, має оптимальний баланс між обчислювальною ефективністю та структурною точністю серед усіх вивчених систем.

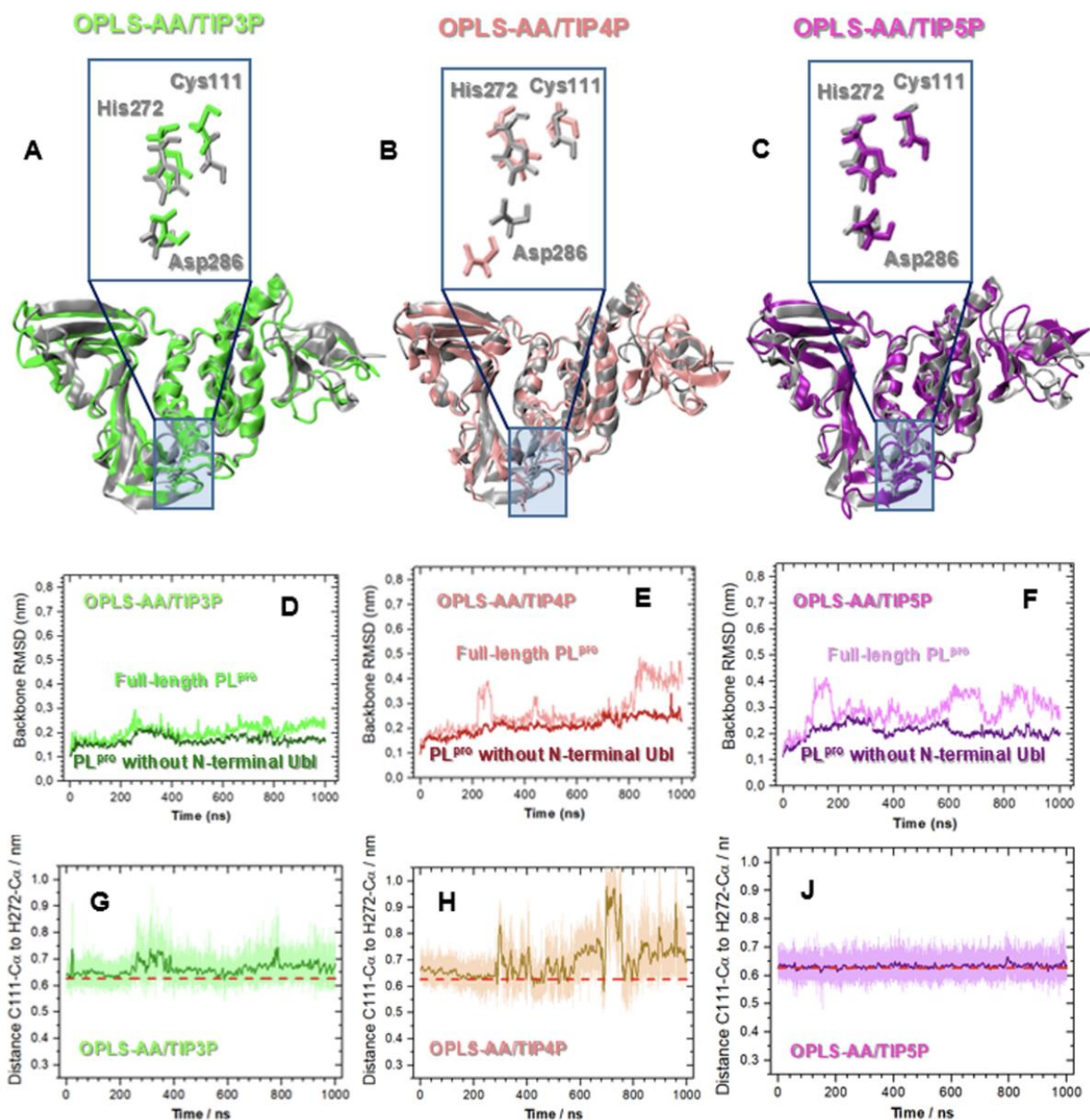


Рис. 5.16 - Порівняння силового поля OPLS-AA у поєднанні з різними моделями води щодо відтворення нативної будови PL^{pro}. Порівняння моделей води TIP3P, TIP4P та TIP5P у відтворенні 3D-будови протеази (A-C), поліпептидного RMSD (D-F) та відстані C α -C α для ключових каталітичних залишків Cys111 та His272 (G-I).

5.2.3 Вплив іонної сили розчину та температури на фолдинг PL^{pro}

Розробка реалістичної моделі для молекулярно динамічного моделювання для ферменту PL^{pro}, що взаємодіє з зарядженими та цвиттеріонними лігандами присутніми у водному розчині, потребує врахування фізіологічних умов, таких як відповідна іонна сила та температура, подібна до температури людського тіла [116]. Для відтворення фізіологічних умов, МД моделювання проводилось за умов присутності високої концентрації солі 100 mM NaCl та підвищеної температури 310 K, що відповідає температурі тіла людини.

Дві моделі OPLS-AA/TIP3P та OPLS-AA/TIP4P були використані для МД тесту, як це підсумовано в Рисунку 5.17. Слід зазначити, що ефект іонної сили та температура 310 K дещо стабілізують нативну структуру PL^{pro}, як показано в Рисунках 5.16G-H та Рисунку 5.17 B. Подібну тенденцію було спостережено при тестах головної протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2 [116] (див. Розділ 5.2).

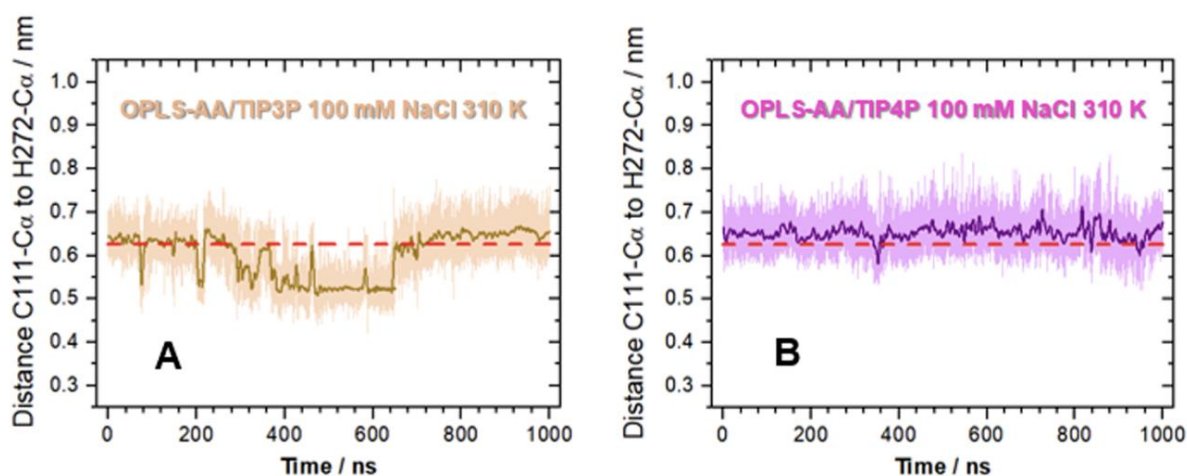


Рис. 5.17 - Вплив NaCl та підвищеної температури 310 K на будову PL^{pro} для комбінації силового поля OPLS-AA з моделями води TIP3P та TIP4P. (A-B) Часові траєкторії відстані C_α-C_α для залишків Cys111 та His272, розраховані за фізіологічних умов (100 mM NaCl, T=310 K). Пунктирна лінія відповідає відстані C_α-C_α, яка відповідає рентгенівській структурі PL^{pro} (PDB: 7SGW).

5.2.4 Аналіз вторинної структури PL^{pro}

Аналіз RMSD вимірює відхилення положень атомів і забезпечує кількісну оцінку структурних відмінностей; однак він не надає конкретної інформації про зміни у вторинній структурі. Натомість алгоритм DSSP (Define Secondary Structure of Protein) є більш інформативним для аналізу переходів у вторинній структурі, таких як перетворення спіралі в клубок. DSSP ідентифікує та класифікує елементи вторинної структури — такі як α -спіралі, β -шари та клубки (coil) — на основі моделей водневих зв'язків і геометрії основного ланцюга[294].

Таким чином, DSSP краще підходить для оцінки фактичного складу та переходів у вторинних структурах, тоді як RMSD зосереджений на загальній подібності структур [295].

Таблиця 5.2.

Внесок типів вторинної структури у згортання PL^{pro} (у відсотках), визначений за допомогою аналізу DSSP

	Невпорядкована	β -складка	β -місток	Згин	Петля	α -спіраль ^а	5-спіраль ^б	3-спіраль ^с
PL^{pro}								
PL^{pro} X-ray Structure	16	34	1	13	12	23	0	2
PL^{pro} , AMBER03/TIP3P	19	29	2	13	10	24	0	3
PL^{pro} , CHARMM27/TIP3P	24	25	2	14	14	19	0	2
PL^{pro} , CHARMM36/TIP3P	22	27	2	14	13	20	0	2
PL^{pro} , OPLS-AA/TIP3P	20	31	2	14	9	23	0	1
PL^{pro} , OPLS-AA/TIP4P	18	32	1	12	13	22	0	2
PL^{pro} , OPLS-AA/TIP5P	22	30	1	15	11	21	0	1
PL^{pro} в комплексі з лігандом								
PL^{pro} with GRL0617, OPLS-AA/TIP3P	20	30	2	14	10	23	0	1
PL^{pro} with XR8-89, OPLS-AA/TIP3P	17	33	1	14	12	21	0	3
PL^{pro} with XR8-89, CHARMM27/TIP3P	24	27	1	14	13	20	0	1

а — α -спіраль: характерний спіральний мотив із водневими зв'язками між залишками $i \rightarrow i+4$, приблизно 3.6 амінокислот на один оберт.
 б — 3₁₀-спіраль (3-спіраль): водневі зв'язки між залишками з інтервалом у три амінокислоти ($i \rightarrow i+3$); короткі, компактні спіралі.

c — 5_{16} -спіраль (5-спіраль або π -спіраль): водневі зв'язки між залишками з інтервалом у п'ять амінокислот ($i \rightarrow i+5$); рідкісні, видовжені спіралі.

У таблиці 5.2 наведено узагальнення результатів аналізу DSSP для ферменту PL^{pro}, отриманих із використанням різних комбінацій силових полів. Важливо відзначити, що вторинні структури, зокрема β -шари та α -спіралі, становлять відповідно 34% і 23% від загального згортання білка PL^{pro}. Разом із неупорядкованими койл-ділянками та гнучкими петлями ці елементи складають 73% вторинної структури ферменту.

Крім того, усі моделі на основі силового поля OPLS-AA успішно підтримували високий вміст β -шарів — понад 30%, що переважно формується в N-кінцевому Ubl-домені та "пальцеподібному" домені (Finger domain), як показано на рис. 1. Для порівняння, силові поля на основі CHARMM демонстрували часткову втрату β -шарів і α -спіралей, що призводило до структурних змін, зокрема розкручування спіралей у неупорядковані койли (див. таблицю 3).

Цікаво, що хоча білок PL^{pro} дійсно зазнає конформаційних змін, зокрема розгортання α -спіралі в койл, загальне положення основного ланцюга білка (backbone) залишається стабільним, про що свідчать низькі значення RMSD (див. рис. 5). Отже, DSSP є чудовим інструментом для аналізу вторинної структури, тоді як RMSD залишається корисним для оцінки загальної структурної стабільності та крупномасштабних змін. У поєднанні ці методи дають всебічне уявлення про структуру й динаміку PL^{pro}.

5.2.5 Стабільність комплексів ліганд-PL^{pro}

Нещодавно було виявлено кілька інгібіторів PL^{pro}, серед яких GRL0617 (рис. 5.18) є найпотужнішим з IC₅₀ 2,3 мМ [35,51]. Також було повідомлено про кілька інших нафтилових похідних, які мають інгібуючу активність у мікромольному діапазоні та які вдалося сокрystalізувати з протеазою PL^{pro}, як показано у відповідних структурах (PDB коди 7KOL, 7JRN [51] та 7TZJ [296]),

Найновіші відкриття стосуються нових інгібіторів ряду 2-фенілотіофенів (PDB 7LBR) з наномолярною інгібіційною активністю [297].

Доступні у науковій літературі сокрystalізовані комплекси PL^{pro}-ліганд показали, що ці невеликі молекули-інгібітори мають нековалентний режим зв'язування з алостеричним сайтом рецептора та займають субсайти S3 і S4 активного сайту зв'язування субстрату. Цей фрагмент рецептора часто називають "поглибленням" BL2, у якому ліганди не утворюють ковалентного зв'язку з каталітичним залишком Cys111 [51,265,296,297], як показано на рис. 5.18.

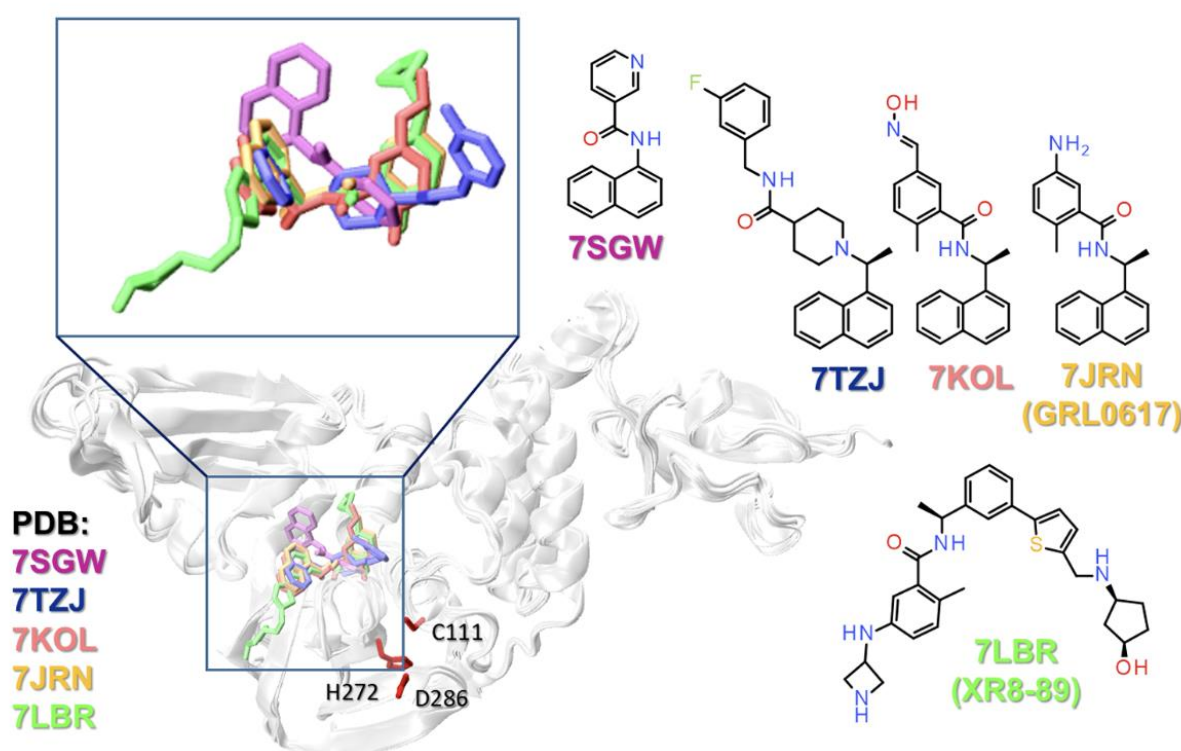


Рис. 5.18 - Деякі доступні рентгенівські структури комплексів PL^{pro}-ліганд. Подібна локалізація п'яти лігандів показує алостеричний режим зв'язування у комплексах PL^{pro}. Кожен ліганд позначені його PDB кодом.

Каталітична тріада Cys111–His272–Asp286 знаходиться на межі між піддоменами "палець" та "долоня", поруч з петлею BL2 (рис. 5.10 і 5.18) [35]. Повідомлялося, що така структура субсайтів S3 та S4 призводить до певних проблем при проєктуванні нових нековалентних інгібіторів PL^{pro} [265].

В нечисленних літературних джерелах вже опубліковані результати використання МД моделювання для оцінки стабільності комплексів PL^{pro} з деякими нековалентними інгібіторами у водному розчині. Наприклад, МД моделювання за допомогою силового поля CHARMM27 були проведені для оцінки стабільності комплексів Nafamostat і VR23 з протеазами M^{pro} і PL^{pro} тривалістю до 100 нс. Це моделювання показало стабільну структуру зв'язування Nafamostat, на відміну від інгібітора VR23 [270]. Крім того, стабільний комплекс PL^{pro}-GRL0617 було спостережено при використанні силового поля CHARMM27/SPC [273]; однак моделювання проводилася лише на досить короткому часовому масштабі 50 нс [273].

Наші результати МД моделювання комплексу PL^{pro}-GRL0617 з силовим полем OPLS-AA/TIP3P показало, що структура комплексу добре відтворюється протягом перших 100 нс. Однак після цього відбувалося певне переміщення ліганду GRL0617. Це важливе спостереження, оскільки у науковій літературі типовий час МД моделювання часто не перевищує 100 нс. На відміну від цього, МД розрахунки комплексу PL^{pro}-XR8-89, показали, що його структура залишалася стабільною впродовж 1 мкс, як показано на рис. 5.19.

Структура комплексу PL^{pro}-XR8-89 добре зберігалась протягом усієї МД-траєкторії (див. рис. 5.19А). Важливо відмітити, що часові криві RMSD для атомів головного ланцюга показали схожі тенденції як для апоформи, так і для голоформи PL^{pro}, що вказує на те, що зв'язування субстрату не змінює нативну структуру PL^{pro} (рис. 5.19В).

Однак також важливо відзначити, що присутність нековалентного інгібітора XR8-89 індукувала деякі конформаційні зміни в каталітичному домені протеази. Рисунок 5.19С показує, що у голоформі відстань C_α-C_α між парою каталітичних залишків Cys111 і His472 значно збільшилася до 1,27 нм порівняно з 0,626 нм у нативній апоформі. Вважається, що такі конформаційно індуковані зміни в конфігурації каталітичної тріади відіграють важливу роль в алостеричному механізмі інгібування активності PL^{pro} [250,281,298,299].

Таким чином слід підсумувати, що отримані результати мають важливе науково-практичне значення та вказують про важливу роль ліганд-індукованої конформаційної динаміки в апо- і голоформах PL^{pro} для проєктування і розробки нових нековалентних інгібіторів через алостерично регульовану природу каталізаторної активності PL^{pro}. Таким чином, така алостерична гнучкість рецептора є важливим чинником, які не враховується у багатьох розрахунках з використання традиційного напівгнучкого молекулярного докінгу.

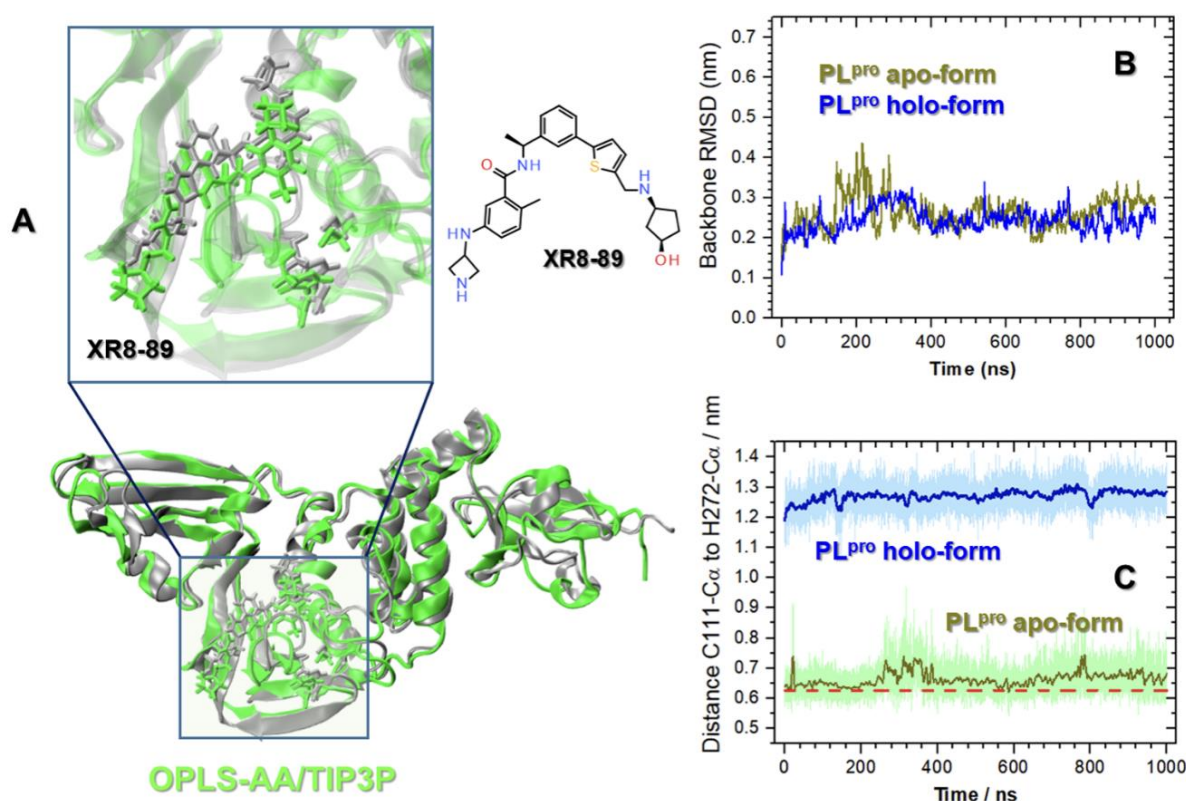


Рис. 5.19 - (A) МД моделювання комплексу PL^{pro} з сокрystalізованим інгібітором XR8-89 (PDB: 7LBR) у силовому полі OPLS-AA/TIP3P. Панелі вгорі показують накладання початкових (сірий) і кінцевих (зелений) положень ліганда XR8-89. Часові криві RMSD для атомів головного ланцюга (B) та відстані C_α-C_α для залишків Cys111 та His272 (C) для апоформи і голоформи PL^{pro} в комплексі з XR8-89.

Висновки до розділу 5

Головна (M^{pro}) та папаїноподібна протеаза (PL^{pro}) коронавірусу SARS-CoV-2 відіграють ключову роль у процесингу білків та є перспективними мішенями для розробки нових противірусних препаратів при лікуванні гострої інфекції COVID-19. Створення та розробка атомістичних молекулярно-динамічних моделей для дослідження 3D будови та взаємодії ліганд-протеаза у водному розчині та за фізіологічних умов є важливим етапом при дизайні ліків. З метою встановлення оптимальних умов та параметризації був проведений порівняльний аналіз популярних силових полів (OPLS-AA, CHARMM27, CHARMM36 і AMBER03) та оцінено їхню здатність відтворювати нативну структуру протеаз M^{pro} та PL^{pro} у водному середовищі за фізіологічних умов та встановлено наступне:

- порівняльний аналіз шести силових полів, OPLS-AA, CHARMM27, CHARMM36, AMBER03, AMBER14SB and GROMOS G54A7 та чотирьох емпіричних параметрів моделей водного розчину (SPC, TIP3P, TIP4P, TIP5P) показав кращу узгодженість з експериментальними даними щодо нативного фолдингу протеази M^{pro} для моделей CHARMM27/TIP3P та OPLS-AA/TIP4P;
- показано, що нативний фолдинг протеази M^{pro} добре відтворюється комбінацією силового поля OPLS-AA та моделлю TIP4P для водного розчину за фізіологічних умов, в присутність 100 mM NaCl та температурі 310 K, що є основою для моделювання комплексів з високополярними та зарядженими лігандами [223];
- нативний фолдинг протеази M^{pro} у димерній формі добре відтворюється моделлю OPLS-AA/TIP4P, яка рекомендована як основна для швидкого комп'ютерного скринінгу та моделювання стабільності комплексів ліганд-протеаза у водному розчині.
- використовуючи структурні критерії, такі як середньоквадратичне зміщення (RMSD) і флуктуації атомів головного ланцюга (RMSF), а також відстань $Ca(\text{Cys111})-Ca(\text{His272})$ 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 демонструє кращу відтворюваність нативного фолдингу каталітичного домену.

- структурно-динамічна стабільність комплексів PL^{pro}-ліганд з нековалентним інгібітором XR8-89 краще відтворювалась силовим полем OPLS-AA та моделлю водного розчину TIP3P.

- показано, що ліганд-індуковані конформаційні зміни у тривимірній конфігурації каталітичної тріади відіграють важливу роль в алостеричному механізмі інгібіювання активності протеази PL^{pro}.

Основні положення розділу викладені у публікаціях автора [223, 226].

ВИСНОВКИ

Комплексне використання молекулярного дизайну, 3D-фармакофорного скринінгу та рецептор-орієнтованого молекулярного докінгу дозволило виконати основну мету роботи – комп'ютерний дизайн нових інгібіторів протеаз M^{pro} та PL^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2 з використанням віртуальних еволюційних бібліотек, провести структурну оптимізацію молекул-хітів та виконати *in silico* оцінку їх інгібуючої активності та встановити наступне:

1) Створено нову віртуальну еволюційну бібліотеку лігандів з використанням семи фізико-хімічних та структурних критеріїв придатності, таких як молекулярна маса (Mw), cLogP, площа полярної поверхні, структурна схожість з батьківським скаффолдом, конформаційна схожість лігандів, молекулярна гнучкість та кількість торсійних кутів, об'єм молекули, що містить 1866 аналогів нірматрелвіру.

2) Структурна оптимізація та 3D-фармакофорний скринінг бібліотеки 1866 аналогів нірматрелвіру дозволили зменшити її хімічний простір до 32 молекул-лідерів. Структурно-енергетичне ранжування відібраних кандидатів з використання молекулярного докінгу до протеази M^{pro} дозволило ідентифікувати вісім аналогів нірматрелвіру з вищою афінністю зв'язування (від -7,5 до -8,6 ккал/моль), ніж вихідний нірматрелвір (-7,2 ккал/моль).

3) Вперше показано, що основні структурні модифікації, які посилюють загальний інгібуючий ефект нових аналогів нірматрелвіру, локалізовані в азабіцикло[3.1.0]-гексановому та 2-оксопіролідиновому фрагментах.

4) Побудовано віртуальну еволюційну бібліотеку з 6334 нових аналогів енсїтрелвіру, на основі десяти критеріїв придатності, зокрема маси (M_w), cLogP, площі полярної поверхні, структурної та конформаційної схожості, гнучкості, молекулярної форми, кількості торсійних кутів та донорів-акцепторів водневого зв'язку, яка є основою для пошуку нових більш ефективних інгібіторів.

5) 3D фармакофорний скринінг еволюційної бібліотеки з 6334 аналогів енсїтрелвіру зменшив розмір бібліотеки до 41 кандидата, а подальший структурно-енергетичний аналіз відібраних кандидатів методами молекулярного

докінгу дозволив ранжувати та ідентифікувати десять аналогів енсїтрелвіру, які мають кращу спорідненість до протеази M^{pro} порівняно з енсїтрелвіром. *Вперше показано*, що основні структурні модифікації, які підвищують загальний протівірусний ефект енсїтрелвіру, локалізовані у фрагментах 1-метил-1H-1,2,4-тріазолу та 6-хлоро-2-метил-2H-індазолу.

6) Порівняльний аналіз популярних силових полів (OPLS-AA, CHARMM27, CHARMM36 і AMBER03) дозволив запропонувати оптимальні умови для молекулярно-динамічного моделювання нативної 3D структуру та фолдингу протеаз M^{pro} та PL^{pro} , що є основою для оцінки стабільності їхніх комплексів з лігандами у водному середовищі за фізіологічних умов.

7) Молекулярно-динамічне моделювання структури та стабільності комплексів ліганд-протеаза виявило важливу роль ліганд-індукованих конформаційних зміни у тривимірній конфігурації каталітичної тріади, що має критичний вплив при алостеричному механізмі інгібування активності протеази PL^{pro} .

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gil C, Ginex T, Maestro I, Nozal V, Barrado-Gil L, Cuesta-Geijo MÁ, et al. COVID-19: Drug Targets and Potential Treatments. *J Med Chem.* 2020, 63(21):12359–86.
2. Scavone C, Brusco S, Bertini M, Sportiello L, Rafaniello C, Zoccoli A, et al. Current pharmacological treatments for COVID-19: What's next? *British J Pharmacology.* 2020, 177(21):4813–24.
3. Xia J, Lu L, Zhao KL, Zeng QL. Resistance Transition of *Pseudomonas aeruginosa* in SARS-CoV-2-Uninfected Hospitalized Patients in the Pandemic. *IDR.* 2023, Volume 16:6717–24.
4. Al-Shargi OY, Alzaid SM, Al-Dosari BS, Alzubaidi AS. Adverse events associated with COVID-19 treatment and its possible relationship with patient characteristics: A narrative review. *J App Pharm Sci,* 2023, 13(5): 41-5.
5. Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol.* 2023, 21(3):133–46.
6. Wang R, Hozumi Y, Yin C, Wei GW. Decoding SARS-CoV-2 Transmission and Evolution and Ramifications for COVID-19 Diagnosis, Vaccine, and Medicine. *J Chem Inf Model.* 2020, 60(12):5853–65.
7. Kumar A, Asghar A, Singh HN, Faiq MA, Kumar S, Narayan RK, et al. SARS-CoV-2 Omicron Variant Genomic Sequences and Their Epidemiological Correlates Regarding the End of the Pandemic: In Silico Analysis. *JMIR Bioinform Biotech.* 2023, 4: e42700.
8. Wu C rong, Yin W chao, Jiang Y, Xu HE. Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant: drug design templates for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin.* 2022, 43(12):3021–33.
9. Polatoğlu I, Oncu-Oner T, Dalman I, Ozdogan S. COVID-19 in early 2023: Structure, replication mechanism, variants of SARS-CoV-2, diagnostic tests, and vaccine & drug development studies. *MedComm.* 2023, 4(2):e228.

10. Markov PV, Ghafari M, Beer M, Lythgoe K, Simmonds P, Stilianakis NI, et al. The evolution of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2023, 21(6):361–79.
11. Zhu W, Shyr Z, Lo DC, Zheng W. Viral Proteases as Targets for Coronavirus Disease 2019 Drug Development. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2021, 378(2):166–72.
12. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol.* 2021, 19(11):685–700.
13. Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng ZM. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci.* 2021, 11(1):136.
14. Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, Maga G, Berisio R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells.* 2020, 20;9(5):1267.
15. Yan W, Zheng Y, Zeng X, He B, Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Sig Transduct Target Ther.* 2022 Jan 27;7(1):26.
16. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022, 23(1):3–20.
17. Pizzato M, Baraldi C, Boscato Sopetto G, Finozzi D, Gentile C, Gentile MD, et al. SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions. *Front Virol.* 2022, 1:815388.
18. Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Sig Transduct Target Ther.* 2021, 6(1):233.
19. Wu A, Shi K, Wang J, Zhang R, Wang Y. Targeting SARS-CoV-2 entry processes: The promising potential and future of host-targeted small-molecule inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2024, 263:115923.
20. Hanson QM, Wilson KM, Shen M, Itkin Z, Eastman RT, Shinn P, et al. Targeting ACE2–RBD Interaction as a Platform for COVID-19 Therapeutics: Development

- and Drug-Repurposing Screen of an AlphaLISA Proximity Assay. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2020, 3(6):1352–60.
21. Suvarnapathaki S, Chauhan D, Nguyen A, Ramalingam M, Camci-Unal G. Advances in Targeting ACE2 for Developing COVID-19 Therapeutics. *Ann Biomed Eng.* 2022, 50(12):1734–49.
 22. Santos-Mendoza T. The Envelope (E) Protein of SARS-CoV-2 as a Pharmacological Target. *Viruses.* 2023, 15(4):1000.
 23. Hardenbrook NJ, Zhang P. A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Current Opinion in Virology.* 2022, 52:123–34.
 24. Pillaiyar T, Wendt LL, Manickam M, Easwaran M. The recent outbreaks of human coronaviruses: A medicinal chemistry perspective. *Medicinal Research Reviews.* 2021, 41(1):72–135.
 25. Evseeva LV, Ivanov VV, Karpina VR, Kovalenko SS, Kuznetsov IE, Langer T, et al. The virtual screening application for searching potential antiviral agents to treat COVID-19 disease. *J Org Pharm Chem.* 2020, 18(2):3–15.
 26. She Z, Yao Y, Wang C, Li Y, Xiong X, Liu Y. M^{pro}-targeted anti-SARS-CoV-2 inhibitor-based drugs. *Journal of Chem. Res.* 2023, 47(4):17475198231184799.
 27. Vuong W, Fischer C, Khan MB, Van Belkum MJ, Lamer T, Willoughby KD, et al. Improved SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors based on feline antiviral drug GC376: Structural enhancements, increased solubility, and micellar studies. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2021, 222:113584.
 28. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020, 10:587269.
 29. Gorkhali R, Koirala P, Rijal S, Mainali A, Baral A, Bhattarai HK. Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. *Bioinform Biol Insights.* 2021, 15:11779322211025876.
 30. Yevsieieva LV, Lohachova KO, Kyrychenko A, Kovalenko SM, Ivanov VV, Kalugin ON. Main and papain-like proteases as prospective targets for

- pharmacological treatment of coronavirus SARS-CoV-2. *RSC Adv.* 2023, 13(50):35500–24.
31. Kneller DW, Phillips G, O'Neill HM, Jedrzejczak R, Stols L, Langan P, et al. Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography. *Nat Commun.* 2020, 11(1):3202.
 32. Zhao Y, Fang C, Zhang Q, Zhang R, Zhao X, Duan Y, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease in complex with protease inhibitor PF-07321332. *Protein & Cell.* 2022, 13(9):689–93.
 33. Cannalire R, Cerchia C, Beccari AR, Di Leva FS, Summa V. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities. *J Med Chem.* 2022, 65(4):2716–46.
 34. Cooper MS, Zhang L, Ibrahim M, Zhang K, Sun X, Röske J, et al. Diastereomeric Resolution Yields Highly Potent Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease. *J Med Chem.* 2022, 65(19):13328–42.
 35. Gao X, Qin B, Chen P, Zhu K, Hou P, Wojdyla JA, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 papain-like protease. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2021, 11(1):237–45.
 36. Gupta Y, Kumar S, Zak SE, Jones KA, Upadhyay C, Sharma N, et al. Antiviral evaluation of hydroxyethylamine analogs: Inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (3CLpro), a virtual screening and simulation approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2021, 47:116393.
 37. Hou N, Shuai L, Zhang L, Xie X, Tang K, Zhu Y, et al. Development of Highly Potent Noncovalent Inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro. *ACS Cent Sci.* 2023, 9(2):217–27.
 38. Li P, Kim Y, Dampalla CS, Nhat Nguyen H, Meyerholz DK, Johnson DK, et al. Potent 3CLpro inhibitors effective against SARS-CoV-2 and MERS-CoV in animal models by therapeutic treatment. Meng XJ, Kehn-Hall K, editors. *mBio.* 2024, 15(2):e02878-23.
 39. Luttens A, Gullberg H, Abdurakhmanov E, Vo DD, Akaberi D, Talibov VO, et al. Ultralarge Virtual Screening Identifies SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors

- with Broad-Spectrum Activity against Coronaviruses. *J Am Chem Soc.* 2022, 144(7):2905–20.
40. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science.* 2020, 368(6489):409–12.
 41. Badshah SL, Faisal S, Muhammad A, Poulson BG, Emwas AH, Jaremko M. Antiviral activities of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021, 140:111596.
 42. Bahun M, Jukić M, Oblak D, Kranjc L, Bajc G, Butala M, et al. Inhibition of the SARS-CoV-2 3CLpro main protease by plant polyphenols. *Food Chemistry.* 2022, 373:131594.
 43. Bizzoca ME, Leuci S, Mignogna MD, Muzio EL, Caponio VCA, Muzio LL. Natural compounds may contribute in preventing SARS-CoV-2 infection: a narrative review. *Food Science and Human Wellness.* 2022, 11(5):1134–42.
 44. Dey D, Hossain R, Biswas P, Paul P, Islam MdA, Ema TI, et al. Amentoflavone derivatives significantly act towards the main protease (3CLPRO/MPRO) of SARS-CoV-2: in silico admet profiling, molecular docking, molecular dynamics simulation, network pharmacology. *Mol Divers.* 2023, 27(2):857–71.
 45. Lopes AJO, Calado GP, Fróes YN, Araújo SAD, França LM, Paes AMDA, et al. Plant Metabolites as SARS-CoV-2 Inhibitors Candidates: In Silico and In Vitro Studies. *Pharmaceuticals.* 2022, 15(9):1045.
 46. Owis AI, El-Hawary MS, El Amir D, Aly OM, Abdelmohsen UR, Kamel MS. Molecular docking reveals the potential of *Salvadora persica* flavonoids to inhibit COVID-19 virus main protease. *RSC Adv.* 2020, 10(33):19570–5.
 47. Uma Reddy B, Routhu NK, Kumar A. Multifaceted roles of plant derived small molecule inhibitors on replication cycle of SARS-CoV-2. *Microbial Pathogenesis.* 2022, 168:105512.
 48. Xiong Y, Zhu GH, Zhang YN, Hu Q, Wang HN, Yu HN, et al. Flavonoids in *Ampelopsis grossedentata* as covalent inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro:

- Inhibition potentials, covalent binding sites and inhibitory mechanisms. *Intern. J. Biol. Macromol.* 2021, 187:976–87.
49. Antonopoulou I, Sapountzaki E, Rova U, Christakopoulos P. Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (Mpro) by repurposing/designing drug-like substances and utilizing nature's toolbox of bioactive compounds. *Comput. Struct. Biotech. J.* 2022, 20:1306–44.
 50. Fischer C, Feys JR. SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors: Achieved Diversity, Developing Resistance and Future Strategies. *Future Pharmacology.* 2023, 3(1):80–107.
 51. Osipiuk J, Azizi SA, Dvorkin S, Endres M, Jedrzejczak R, Jones KA, et al. Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors. *Nat Commun.* 2021, 12(1):743.
 52. Tan H, Hu Y, Jadhav P, Tan B, Wang J. Progress and Challenges in Targeting the SARS-CoV-2 Papain-like Protease. *J Med Chem.* 2022, 65(11):7561–80.
 53. Hajbabaie R, Harper MT, Rahman T. Establishing an Analogue Based In Silico Pipeline in the Pursuit of Novel Inhibitory Scaffolds against the SARS Coronavirus 2 Papain-Like Protease. *Molecules.* 2021, 26(4):1134.
 54. Ibrahim TM, Ismail MI, Bauer MR, Bekhit AA, Boeckler FM. Supporting SARS-CoV-2 Papain-Like Protease Drug Discovery: In silico Methods and Benchmarking. *Front Chem.* 2020, 8:592289.
 55. Ma C, Sacco MD, Xia Z, Lambrinidis G, Townsend JA, Hu Y, et al. Discovery of SARS-CoV-2 Papain-like Protease Inhibitors through a Combination of High-Throughput Screening and a FlipGFP-Based Reporter Assay. *ACS Cent Sci.* 2021, 7(7):1245–60.
 56. Shan H, Liu J, Shen J, Dai J, Xu G, Lu K, et al. Development of potent and selective inhibitors targeting the papain-like protease of SARS-CoV-2. *Cell Chemical Biology.* 2021, 28(6):855-865.e9.
 57. Rut W, Lv Z, Zmudzinski M, Patchett S, Nayak D, Snipas SJ, et al. Activity profiling and crystal structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2 papain-like

- protease: A framework for anti–COVID-19 drug design. *Sci Adv.* 2020, 6(42):eabd4596.
58. Klemm T, Ebert G, Calleja DJ, Allison CC, Richardson LW, Bernardini JP, et al. Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2. *The EMBO Journal.* 2020, 39(18):e106275.
 59. Ton AT, Pandey M, Smith JR, Ban F, Fernandez M, Cherkasov A. Targeting SARS-CoV-2 papain-like protease in the postvaccine era. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2022, 43(11):906–19.
 60. Sivakumar D, Stein M. Binding of SARS-CoV Covalent Non-Covalent Inhibitors to the SARS-CoV-2 Papain-Like Protease and Ovarian Tumor Domain Deubiquitinases. *Biomolecules.* 2021, 11(6):802.
 61. Sanders B, Pohkrel S, Labbe A, Mathews I, Cooper C, Davidson R, et al. Potent and Selective Covalent Inhibitors of the Papain-like Protease from SARS-CoV-2. *Res. Sq.* 2021, rs-906621/v1
 62. Chien M, Anderson TK, Jockusch S, Tao C, Li X, Kumar S, et al. Nucleotide Analogues as Inhibitors of SARS-CoV-2 Polymerase, a Key Drug Target for COVID-19. *J Proteome Res.* 2020, 19(11):4690–7.
 63. Hossain MU, Bhattacharjee A, Emon MdTH, Chowdhury ZM, Ahammad I, Mosaib MdG, et al. Novel mutations in NSP-1 and PLPro of SARS-CoV-2 NIB-1 genome mount for effective therapeutics. *J. Gen. Engineer. Biotech.* 2021, 19(1):52.
 64. Vincenzi M, Mercurio FA, Leone M. Looking for SARS-CoV-2 Therapeutics Through Computational Approaches. *CMC.* 2023, 30(28):3158–214.
 65. Muratov EN, Amaro R, Andrade CH, Brown N, Ekins S, Fourches D, et al. A critical overview of computational approaches employed for COVID-19 drug discovery. *Chem Soc Rev.* 2021, 50(16):9121–51.
 66. Middha SK, Usha T, Sukhralia S, Pareek C, Yadav R, Agnihotri R, et al. Prediction of drug–target interaction — a helping hand in drug repurposing. In: *Computational Approaches for Novel Therapeutic and Diagnostic Designing to*

- Mitigate SARS-CoV-2 Infection. *Comput. Appr. Novel Therapeutic Diagn. Designing to Mitigate SARS-CoV-2 Infection*. 2022, 519–36.
67. Nandi S, Nayak BS, Khede MK, Saxena AK. Repurposing of Chemotherapeutics to Combat COVID-19. *CTMC*. 2022, 22(32):2660–94.
 68. Yadav M, Dhagat S, Eswari JS. Emerging strategies on in silico drug development against COVID-19: challenges and opportunities. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020, 155:105522.
 69. Gao K, Wang R, Chen J, Cheng L, Frishcosy J, Huzumi Y, et al. Methodology-Centered Review of Molecular Modeling, Simulation, and Prediction of SARS-CoV-2. *Chem Rev*. 2022, 122(13):11287–368.
 70. Kumar S, Kovalenko S, Bhardwaj S, Sethi A, Gorobets NYu, Desenko SM, et al. Drug repurposing against SARS-CoV-2 using computational approaches. *Drug Discovery Today*. 2022, 27(7):2015–27.
 71. Sadybekov AV, Katritch V. Computational approaches streamlining drug discovery. *Nature*. 2023, 616(7958):673–85.
 72. Shah A, Jain M. Limitations and future challenges of computer-aided drug design methods. In: *Computer Aided Drug Design (CADD): From Ligand-Based Methods to Structure-Based Approaches*. 2022, p. 283–97.
 73. Chen L, Fan Z, Chang J, Yang R, Hou H, Guo H, et al. Sequence-based drug design as a concept in computational drug design. *Nat Commun*. 2023, 14(1):4217.
 74. Bon M, Bilsland A, Bower J, McAulay K. Fragment-based drug discovery—the importance of high-quality molecule libraries. *Molecular Oncology*. 2022, 16(21):3761–77.
 75. Green H, Koes DR, Durrant JD. DeepFrag: a deep convolutional neural network for fragment-based lead optimization. *Chem Sci*. 2021, 12(23):8036–47.
 76. Shi XX, Wang ZZ, Wang F, Hao GF, Yang GF. ACFIS 2.0: an improved web-server for fragment-based drug discovery via a dynamic screening strategy. *Nucleic Acids Research*. 2023, 51(W1):W25–32.

77. Gurung AB, Ali MA, Lee J, Farah MA, Al-Anazi KM. An Updated Review of Computer-Aided Drug Design and Its Application to COVID-19. Alatas B, editor. BioMed Research International. 2021, 2021(1):8853056.
78. Bajad NG, Rayala S, Gutti G, Sharma A, Singh M, Kumar A, et al. Systematic review on role of structure based drug design (SBDD) in the identification of anti-viral leads against SARS-Cov-2. Current Research in Pharmacology and Drug Discovery. 2021, 2:100026.
79. Varela-Rial A, Majewski M, De Fabritiis G. Structure based virtual screening: Fast and slow. WIREs Comput Mol Sci. 2022, 12(2):e1544.
80. Nasser M, Yusof UK, Salim N. Deep Learning Based Methods for Molecular Similarity Searching: A Systematic Review. Processes. 2023, 11(5):1340.
81. Ivanov V, Lohachova K, Kolesnik Y, Zakharov A, Yevsieieva L, Kyrychenko A, et al. Recent advances in computational drug discovery for therapy against coronavirus SARS-CoV-2. ScienceRise: Pharm. Sci. 2023, (6(46)):4-24.
82. Amin SkA, Banerjee S, Singh S, Qureshi IA, Gayen S, Jha T. First structure–activity relationship analysis of SARS-CoV-2 virus main protease (Mpro) inhibitors: an endeavor on COVID-19 drug discovery. Mol Divers. 2021, 25(3):1827–38.
83. Luo D, Tong JB, Zhang X, Xiao XC, Bian S. Computational strategies towards developing novel SARS-CoV-2 Mpro inhibitors against COVID-19. Journal of Molecular Structure. 2022, 1247:131378.
84. Golbraikh A, Shen M, Xiao Z, Xiao YD, Lee KH, Tropsha A. [No title found]. Journal of Computer-Aided Molecular Design. 2003, 17(2/4):241–53.
85. Tetko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A, Livingstone D, Ertl P, et al. Virtual Computational Chemistry Laboratory – Design and Description. J Comput Aided Mol Des. 2005, 19(6):453–63.
86. Yap CW. PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. J Comput Chem. 2011, 32(7):1466–74.
87. Todeschini R, Consonni V. Handbook of Molecular Descriptors. 1st ed. Wiley; 2000. 123 p.

88. Devillers J, Balaban AT, editors. Topological Indices and Related Descriptors in QSAR and QSPR. CRC Press. 2000, 234 p.
89. Solnon C, Jussien N, editors. Ant Colony Optimization and Constraint Programming. 1st ed. Wiley. 2013, 563 p.
90. Breiman L. Machine Learning. 2001, 45(1):5–32.
91. Tibshirani R. Regression Shrinkage and Selection Via the Lasso. Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology. 1996, 58(1):267–88.
92. Hesterberg T, Choi NH, Meier L, Fraley C. Least angle and ℓ_1 penalized regression: A review. Statist Surv. 2008, 2:08-SS035.full
93. Khaldan A, Bouamrane S, En-Nahli F, El-mernissi R, El Khatabi K, Hmamouchi R, et al. Prediction of potential inhibitors of SARS-CoV-2 using 3D-QSAR, molecular docking modeling and ADMET properties. Heliyon. 2021, 7(3):e06603.
94. Jayakumar J, Ebanesar A, Gautam S. Predictive analysis, diagnosis of COVID-19 through computational screening and validation with spectro photometrical approach. Toxicol Environ Health Sci. 2023, 15(2):109–17.
95. Alexander DLJ, Tropsha A, Winkler DA. Beware of R^2 : Simple, Unambiguous Assessment of the Prediction Accuracy of QSAR and QSPR Models. J Chem Inf Model. 2015, 55(7):1316–22.
96. Consonni V, Ballabio D, Todeschini R. Comments on the Definition of the Q^2 Parameter for QSAR Validation. J Chem Inf Model. 2009, 49(7):1669–78.
97. Liu H, Cocca M. Semi-random partitioning of data into training and test sets in granular computing context. Granul Comput. 2017, 2(4):357–86.
98. Joseph VR. Optimal ratio for data splitting. Statistical Analysis. 2022, 15(4):531–8.
99. Arlot S, Celisse A. A survey of cross-validation procedures for model selection. Statist Surv. 2010, 4:09-SS054.full
100. Giordano D, Biancaniello C, Argenio MA, Facchiano A. Drug Design by Pharmacophore and Virtual Screening Approach. Pharmaceuticals. 2022, 15(5):646.

101. Glaab E, Manoharan GB, Abankwa D. Pharmacophore Model for SARS-CoV-2 3CLpro Small-Molecule Inhibitors and *in Vitro* Experimental Validation of Computationally Screened Inhibitors. *J Chem Inf Model*. 2021, 61(8):4082–96.
102. Wermuth CG, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*. 1998, 70(5):1129–43.
103. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc*. 2016, 11(5):905–19.
104. Wolber G, Langer T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *J Chem Inf Model*. 2005, 45(1):160–9.
105. Warren GL, Andrews CW, Capelli AM, Clarke B, LaLonde J, Lambert MH, et al. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *J Med Chem*. 2006, 49(20):5912–31.
106. Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ. Automated docking of flexible ligands: Applications of autodock. *J Mol Recognit*. 1996, 9(1):1–5.
107. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010, 31(2):455–61.
108. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model*. 2021, 61(8):3891–8.
109. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol*. 1997, 267(3):727–48.
110. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*. 2011, 39(suppl):W270–7.
111. Kramer B, Rarey M, Lengauer T. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins*. 1999, 37(2):228–41.

112. Saeedi S, Rahmati A, Chavoshpour-Natanzi Z. Synthesis of pyrazolo[5',1':2,3]imidazo[1,5-c]quinazolin-6(5*H*)-ones and molecular docking study of their affinity against the COVID-19 main protease. *RSC Adv.* 2022, 12(30):19579–89.
113. Amendola G, Ettari R, Previti S, Di Chio C, Messere A, Di Maro S, et al. Lead Discovery of SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors through Covalent Docking-Based Virtual Screening. *J Chem Inf Model.* 2021, 61(4):2062–73.
114. Kulkarni SA, Nagarajan SK, Ramesh V, Palaniyandi V, Selvam SP, Madhavan T. Computational evaluation of major components from plant essential oils as potent inhibitors of SARS-CoV-2 spike protein. *J. Mol. Struct.* 2020, 1221:128823.
115. Ahmad M, Dwivedy A, Mariadasse R, Tiwari S, Kar D, Jeyakanthan J, et al. Prediction of Small Molecule Inhibitors Targeting the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 RNA-dependent RNA Polymerase. *ACS Omega.* 2020, 5(29):18356–66.
116. Lohachova KO, . Sviatenko AS, Kyrychenko A, Ivanov VV, Langer T, Kovalenko SM, et al. Computer-aided drug design of novel nirmatrelvir analogs inhibiting main protease of Coronavirus SARS-CoV-2. *J Appl Pharm Sci.* 2024, 14(5):232-39.
117. Tejera E, Munteanu CR, López-Cortés A, Cabrera-Andrade A, Pérez-Castillo Y. Drugs Repurposing Using QSAR, Docking and Molecular Dynamics for Possible Inhibitors of the SARS-CoV-2 Mpro Protease. *Molecules.* 2020, 25(21):5172.
118. Salo-Ahen OMH, Alanko I, Bhadane R, Bonvin AMJJ, Honorato RV, Hossain S, et al. Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development. *Processes.* 2020, 9(1):71.
119. Amin SkA, Banerjee S, Ghosh K, Gayen S, Jha T. Protease targeted COVID-19 drug discovery and its challenges: Insight into viral main protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2021, 29:115860.
120. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005, 26(16):1701–18.

121. Abraham M, Alekseenko A, Basov V, Bergh C, Briand E, Brown A, et al. GROMACS 2024.4 Manual. 2024.
122. Verkhivker GM, Agajanian S, Oztas DY, Gupta G. Atomistic Simulations and In Silico Mutational Profiling of Protein Stability and Binding in the SARS-CoV-2 Spike Protein Complexes with Nanobodies: Molecular Determinants of Mutational Escape Mechanisms. *ACS Omega*. 2021, 6(40):26354–71.
123. Domingo M, Faraudo J. Effect of surfactants on SARS-CoV-2: Molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* 2023, 158(11):114107.
124. Samanta PN, Majumdar D, Leszczynski J. Elucidating Atomistic Insight into the Dynamical Responses of the SARS-CoV-2 Main Protease for the Binding of Remdesivir Analogues: Leveraging Molecular Mechanics To Decode the Inhibition Mechanism. *J Chem Inf Model*. 2023, 63(11):3404–22.
125. Rashid HU, Ahmad N, Abdalla M, Khan K, Martines MAU, Shabana S. Molecular docking and dynamic simulations of Cefixime, Etoposide and Nebrodenside A against the pathogenic proteins of SARS-CoV-2. *J. Mol. Struct.* 2022, 1247:131296.
126. Muhseen ZT, Hameed AR, Al-Hasani HMH, Tahir Ul Qamar M, Li G. Promising terpenes as SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (RBD) attachment inhibitors to the human ACE2 receptor: Integrated computational approach. *J. Mol. Liq.* 2020, 320:114493.
127. Wakchaure PD, Ghosh S, Ganguly B. Revealing the Inhibition Mechanism of RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) of SARS-CoV-2 by Remdesivir and Nucleotide Analogues: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J Phys Chem B*. 2020, 124(47):10641–52.
128. Byléhn F, Menéndez CA, Perez-Lemus GR, Alvarado W, De Pablo JJ. Modeling the Binding Mechanism of Remdesivir, Favilavir, and Ribavirin to SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase. *ACS Cent Sci*. 2021, 7(1):164–74.
129. Ghorbani M, Brooks BR, Klauda JB. Critical Sequence Hotspots for Binding of Novel Coronavirus to Angiotensin Converter Enzyme as Evaluated by Molecular Simulations. *J Phys Chem B*. 2020, 124(45):10034–47.

130. Carli M, Sormani G, Rodriguez A, Laio A. Candidate Binding Sites for Allosteric Inhibition of the SARS-CoV-2 Main Protease from the Analysis of Large-Scale Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem Lett*. 2021, 12(1):65–72.
131. Sakkiyah S, Guo W, Pan B, Ji Z, Yavas G, Azevedo M, et al. Elucidating Interactions Between SARS-CoV-2 Trimeric Spike Protein and ACE2 Using Homology Modeling and Molecular Dynamics Simulations. *Front Chem*. 2021, 8:622632.
132. Christen M, Hünenberger PH, Bakowies D, Baron R, Bürgi R, Geerke DP, et al. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *J Comput Chem*. 2005, 26(16):1719–51.
133. Kalé L, Skeel R, Bhandarkar M, Brunner R, Gursoy A, Krawetz N, et al. NAMD2: Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics. *J. Comput. Phys*. 1999, 151(1):283–312.
134. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM : A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem*. 1983, 4(2):187–217.
135. Case DA, Cheatham TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, et al. The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem*. 2005, 26(16):1668–88.
136. Thompson AP, Aktulga HM, Berger R, Bolintineanu DS, Brown WM, Crozier PS, et al. LAMMPS - a flexible simulation tool for particle-based materials modeling at the atomic, meso, and continuum scales. *Computer Physics Communications*. 2022, 271:108171.
137. Smith W, Yong CW, Rodger PM. DL_POLY: Application to molecular simulation. *Molecular Simulation*. 2002, 28(5):385–471.
138. Sheik Amamuddy O, Verkhivker GM, Tastan Bishop Ö. Impact of Early Pandemic Stage Mutations on Molecular Dynamics of SARS-CoV-2 M^{pro}. *J Chem Inf Model*. 2020, 60(10):5080–102.
139. Rajagopal K, Varakumar P, Aparna B, Byran G, Jupudi S. Identification of some novel oxazine substituted 9-anilinoacridines as SARS-CoV-2 inhibitors for

- COVID-19 by molecular docking, free energy calculation and molecular dynamics studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2021, 39(15):5551–62.
140. Yoshino R, Yasuo N, Sekijima M. Identification of key interactions between SARS-CoV-2 main protease and inhibitor drug candidates. *Sci Rep*. 2020, 10(1):12493.
 141. Sang P, Tian SH, Meng ZH, Yang LQ. Anti-HIV drug repurposing against SARS-CoV-2. *RSC Adv*. 2020, 10(27):15775–83.
 142. Mukherjee S, Dasgupta S, Adhikary T, Adhikari U, Panja SS. Structural insight to hydroxychloroquine-3C-like proteinase complexation from SARS-CoV-2: inhibitor modelling study through molecular docking and MD-simulation study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2021, 39(18):7322–34.
 143. Grottesi A, Bešker N, Emerson A, Manelfi C, Beccari AR, Frigerio F, et al. Computational Studies of SARS-CoV-2 3CLpro: Insights from MD Simulations. *Int. J. Mol. Sci*. 2020, 21(15):5346.
 144. Kumar D, Kumari K, Jayaraj A, Kumar V, Kumar RV, Dass SK, et al. Understanding the binding affinity of nscapines with protease of SARS-CoV-2 for COVID-19 using MD simulations at different temperatures. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2021, 39(7):2659–72.
 145. Muhammad IA, Muangchoo K, Muhammad A, Ajingi YS, Muhammad IY, Umar ID, et al. A Computational Study to Identify Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) from Eucalyptus Active Compounds. *Computation*. 2020, 8(3):79.
 146. Maurya AK, Mishra N. *In silico* validation of coumarin derivatives as potential inhibitors against Main Protease, NSP10/NSP16-Methyltransferase, Phosphatase and Endoribonuclease of SARS CoV-2. *J. Biomol. Struct. Dynamics*. 2021, 39(18):7306–21.
 147. Alamri MA, Tahir Ul Qamar M, Mirza MU, Bhadane R, Alqahtani SM, Muneer I, et al. Pharmacoinformatics and molecular dynamics simulation studies reveal

- potential covalent and FDA-approved inhibitors of SARS-CoV-2 main protease 3CL^{pro}. J. Biomol.Struct. Dynamics. 2021, 39(13):4936–48.
148. Stoddard SV, Stoddard SD, Oelkers BK, Fitts K, Whalum K, Whalum K, et al. Optimization Rules for SARS-CoV-2 Mpro Antivirals: Ensemble Docking and Exploration of the Coronavirus Protease Active Site. Viruses. 2020, 12(9):942.
 149. Rout J, Swain BC, Tripathy U. *In silico* investigation of spice molecules as potent inhibitor of SARS-CoV-2. J. Biomol. Struct. Dynamics. 2022, 40(2):860–74.
 150. Umesh, Kundu D, Selvaraj C, Singh SK, Dubey VK. Identification of new anti-nCoV drug chemical compounds from Indian spices exploiting SARS-CoV-2 main protease as target. J. Biomol. Struct. Dynamics. 2020, 2:1–9.
 151. El Hassab MA, Shoun AA, Al-Rashood ST, Al-Warhi T, Eldehna WM. Identification of a New Potential SARS-COV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase Inhibitor via Combining Fragment-Based Drug Design, Docking, Molecular Dynamics, and MM-PBSA Calculations. Front Chem. 2020, 8:584894.
 152. Gangadevi S, Badavath VN, Thakur A, Yin N, De Jonghe S, Acevedo O, et al. Kobophenol A Inhibits Binding of Host ACE2 Receptor with Spike RBD Domain of SARS-CoV-2, a Lead Compound for Blocking COVID-19. J Phys Chem Lett. 2021, 12(7):1793–802.
 153. Liang J, Karagiannis C, Pitsillou E, Darmawan KK, Ng K, Hung A, et al. Site mapping and small molecule blind docking reveal a possible target site on the SARS-CoV-2 main protease dimer interface. Computational Biology and Chemistry. 2020, 89:107372.
 154. Kumar KA, Sharma M, Dalal V, Singh V, Tomar S, Kumar P. Multifunctional inhibitors of SARS-CoV-2 by MM/PBSA, essential dynamics, and molecular dynamic investigations. J. Mol. Graph. Model. 2021, 107:107969.
 155. Zhang CH, Stone EA, Deshmukh M, Ippolito JA, Ghahremanpour MM, Tirado-Rives J, et al. Potent Noncovalent Inhibitors of the Main Protease of SARS-CoV-2 from Molecular Sculpting of the Drug Perampanel Guided by Free Energy Perturbation Calculations. ACS Cent Sci. 2021, 7(3):467–75.

156. Deshmukh MG, Ippolito JA, Zhang CH, Stone EA, Reilly RA, Miller SJ, et al. Structure-guided design of a perampanel-derived pharmacophore targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Structure*. 2021, 29(8):823-833.e5.
157. Pelly S, Liotta D. Potent SARS-CoV-2 Direct-Acting Antivirals Provide an Important Complement to COVID-19 Vaccines. *ACS Cent Sci*. 2021, 7(3):396–9.
158. Turlington M, Chun A, Tomar S, Egglar A, Grum-Tokars V, Jacobs J, et al. Discovery of N-(benzo[1,2,3]triazol-1-yl)-N-(benzyl)acetamido)phenyl) carboxamides as severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) 3CLpro inhibitors: Identification of ML300 and noncovalent nanomolar inhibitors with an induced-fit binding. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2013, 23(22):6172–7.
159. Han SH, Goins CM, Arya T, Shin WJ, Maw J, Hooper A, et al. Structure-Based Optimization of ML300-Derived, Noncovalent Inhibitors Targeting the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3CL Protease (SARS-CoV-2 3CL^{pro}). *J Med Chem*. 2022, 65(4):2880–904.
160. Clyde A, Galanie S, Kneller DW, Ma H, Babuji Y, Blaiszik B, et al. High-Throughput Virtual Screening and Validation of a SARS-CoV-2 Main Protease Noncovalent Inhibitor. *J Chem Inf Model*. 2022, 62(1):116–28.
161. Unoh Y, Uehara S, Nakahara K, Nobori H, Yamatsu Y, Yamamoto S, et al. Discovery of S-217622, a Noncovalent Oral SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitor Clinical Candidate for Treating COVID-19. *J Med Chem*. 2022, 65(9):6499–512.
162. Eltayb WA, Abdalla M, Rabie AM. Novel Investigational Anti-SARS-CoV-2 Agent Ensitrelvir “S-217622”: A Very Promising Potential Universal Broad-Spectrum Antiviral at the Therapeutic Frontline of Coronavirus Species. *ACS Omega*. 2023, 8(6):5234–46.
163. Kawajiri T, Kijima A, Iimuro A, Ohashi E, Yamakawa K, Agura K, et al. Development of a Manufacturing Process toward the Convergent Synthesis of the COVID-19 Antiviral Ensitrelvir. *ACS Cent Sci*. 2023, 9(4):836–43.

164. Pathak N, Chen YT, Hsu YC, Hsu NY, Kuo CJ, Tsai HP, et al. Uncovering Flexible Active Site Conformations of SARS-CoV-2 3CL Proteases through Protease Pharmacophore Clusters and COVID-19 Drug Repurposing. *ACS Nano*. 2021, 15(1):857–72.
165. Vankadara S, Wong YX, Liu B, See YY, Tan LH, Tan QW, et al. A head-to-head comparison of the inhibitory activities of 15 peptidomimetic SARS-CoV-2 3CLpro inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2021, 48:128263.
166. Dai W, Zhang B, Jiang XM, Su H, Li J, Zhao Y, et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science*. 2020, 368(6497):1331–5.
167. Yang KS, Ma XR, Ma Y, Alugubelli YR, Scott DA, Vatansever EC, et al. A Quick Route to Multiple Highly Potent SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *ChemMedChem*. 2021, 16(6):942–8.
168. Brewitz L, Dumjahn L, Zhao Y, Owen CD, Laidlaw SM, Malla TR, et al. Alkyne Derivatives of SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors Including Nirmatrelvir Inhibit by Reacting Covalently with the Nucleophilic Cysteine. *J Med Chem*. 2023, 66(4):2663–80.
169. Lohachova K., Ivanov V., Anokhin D., Zakharov A, Yevseieva L., Kyrychenko A., et al. Rational design of novel inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. International Scientific Internet Conference: «Molecular Engineering and Computational Modelling for Nano- and Biotechnology: From Nanoelectronics to Biopolymers», September 27–28, 2023, Cherkasy, Ukraine. Book of Abstracts. Cherkasy: Chabanenko Yu. A., 2023. P. 35-6.
170. Dampalla CS, Miller MJ, Kim Y, Zabiegala A, Nguyen HN, Madden TK, et al. Structure-guided design of direct-acting antivirals that exploit the gem-dimethyl effect and potently inhibit 3CL proteases of severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). *Eur. J. Med. Chem*. 2023, 254:115376.

171. Pozzi C, Vanet A, Francesconi V, Tagliazucchi L, Tassone G, Venturelli A, et al. Antitarget, Anti-SARS-CoV-2 Leads, Drugs, and the Drug Discovery–Genetics Alliance Perspective. *J Med Chem.* 2023, 66(6):3664–702.
172. La Monica G, Bono A, Lauria A, Martorana A. Targeting SARS-CoV-2 Main Protease for Treatment of COVID-19: Covalent Inhibitors Structure–Activity Relationship Insights and Evolution Perspectives. *J Med Chem.* 2022, 65(19):12500–34.
173. Previti S, Ettari R, Calcaterra E, Di Maro S, Hammerschmidt SJ, Müller C, et al. Structure-based lead optimization of peptide-based vinyl methyl ketones as SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2023, 247:115021.
174. Wang H, Pei R, Li X, Deng W, Xing S, Zhang Y, et al. The structure-based design of peptidomimetic inhibitors against SARS-CoV-2 3C like protease as Potent anti-viral drug candidate. *Eur. J. Med. Chem.* 2022, 238:114458.
175. Hoffman RL, Kania RS, Brothers MA, Davies JF, Ferre RA, Gajiwala KS, et al. Discovery of Ketone-Based Covalent Inhibitors of Coronavirus 3CL Proteases for the Potential Therapeutic Treatment of COVID-19. *J Med Chem.* 2020, 63(21):12725–47.
176. Xia Z, Sacco M, Hu Y, Ma C, Meng X, Zhang F, et al. Rational Design of Hybrid SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors Guided by the Superimposed Cocrystal Structures with the Peptidomimetic Inhibitors GC-376, Telaprevir, and Boceprevir. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2021, 4(4):1408–21.
177. Hu Y, Ma C, Szeto T, Hurst B, Tarbet B, Wang J. Boceprevir, Calpain Inhibitors II and XII, and GC-376 Have Broad-Spectrum Antiviral Activity against Coronaviruses. *ACS Infect Dis.* 2021, 7(3):586–97.
178. Hu Q, Xiong Y, Zhu G, Zhang Y, Zhang Y, Huang P, et al. The SARS-CoV-2 main protease (M^{Pro}): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. *MedComm.* 2022, 3(3):e151.

179. Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Berritt S, et al. An oral SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*. 2021, 374(6575):1586–93.
180. Hayek-Orduz Y, Vásquez AF, Villegas-Torres MF, Caicedo PA, Achenie LEK, González Barrios AF. Novel covalent and non-covalent complex-based pharmacophore models of SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}) elucidated by microsecond MD simulations. *Sci Rep*. 2022, 12(1):14030.
181. Lamb YN. Nirmatrelvir Plus Ritonavir: First Approval. *Drugs*. 2022, 82(5):585–91.
182. Marzi M, Vakil MK, Bahmanyar M, Zarenezhad E. Paxlovid: Mechanism of Action, Synthesis, and *In Silico* Study. Wani TA, editor. *BioMed Research International*. 2022, 2022(1):7341493.
183. Petrakis V, Rafailidis P, Trypsianis G, Papazoglou D, Panagopoulos P. The Antiviral Effect of Nirmatrelvir/Ritonavir during COVID-19 Pandemic Real-World Data. *Viruses*. 2023, 15(4):976.
184. Blair HA. Nirmatrelvir plus ritonavir in COVID-19: a profile of its use. *Drugs Ther Perspect*. 2023, 39(2):41–7.
185. Ratia K, Pegan S, Takayama J, Sleeman K, Coughlin M, Baliji S, et al. A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, 105(42):16119–24.
186. Shin D, Mukherjee R, Grewe D, Bojkova D, Baek K, Bhattacharya A, et al. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. *Nature*. 2020, 587(7835):657–62.
187. Bafna K, White K, Harish B, Rosales R, Ramelot TA, Acton TB, et al. Hepatitis C virus drugs that inhibit SARS-CoV-2 papain-like protease synergize with remdesivir to suppress viral replication in cell culture. *Cell Reports*. 2021, 35(7):109133.
188. Swaim CD, Dwivedi V, Perng YC, Zhao X, Canadeo LA, Harastani HH, et al. 6-Thioguanine blocks SARS-CoV-2 replication by inhibition of PL^{pro}. *iScience*. 2021, 24(10):103213.

189. Mirza MU, Ahmad S, Abdullah I, Froeyen M. Identification of novel human USP2 inhibitor and its putative role in treatment of COVID-19 by inhibiting SARS-CoV-2 papain-like (PL^{pro}) protease. *Computational Biology and Chemistry*. 2020, 89:107376.
190. Yuan S, Gao X, Tang K, Cai JP, Hu M, Luo P, et al. Targeting papain-like protease for broad-spectrum coronavirus inhibition. *Protein Cell*. 2022, 13(12):940–53.
191. Elseginy SA, Anwar MM. *In silico* analysis of SARS-CoV-2 papain-like protease potential inhibitors. *RSC Adv*. 2021, 11(61):38616–31.
192. Elseginy SA, Fayed B, Hamdy R, Mahrous N, Mostafa A, Almehdi AM, et al. Promising anti-SARS-CoV-2 drugs by effective dual targeting against the viral and host proteases. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2021, 43:128099.
193. Li L, Ma L, Hu Y, Li X, Yu M, Shang H, et al. Natural biflavones are potent inhibitors against SARS-CoV-2 papain-like protease. *Phytochemistry*. 2022, 193:112984.
194. Štekláč M, Zajaček D, Bučinský L. 3CL^{pro} and PL^{pro} affinity, a docking study to fight COVID19 based on 900 compounds from PubChem and literature. Are there new drugs to be found? *J. Mol. Struct*. 2021, 1245:130968.
195. Mondal S, Chen Y, Lockbaum GJ, Sen S, Chaudhuri S, Reyes AC, et al. Dual Inhibitors of Main Protease (M^{Pro}) and Cathepsin L as Potent Antivirals against SARS-CoV2. *J Am Chem Soc*. 2022, 144(46):21035–45.
196. Shavira S, Handayani S, Fatmaria F. The in-silico potential of *Andrographis paniculata* phytocompounds as antiviral for the treatment of COVID-19: A systematic review. *J App Pharm Sci*. 2023, 13(08):101-12,
197. Omaye FB, Madabeni A, Tucci AR, Nogara PA, Bortoli M, Rosa ADS, et al. Diphenyl Diselenide and SARS-CoV-2: *in silico* Exploration of the Mechanisms of Inhibition of Main Protease (M^{Pro}) and Papain-like Protease (PL^{Pro}). *J Chem Inf Model*. 2023, 63(7):2226–39.

198. Narayanan A, Narwal M, Majowicz SA, Varricchio C, Toner SA, Ballatore C, et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors targeting Mpro and PLpro using in-cell-protease assay. *Commun Biol.* 2022, 5(1):169.
199. Rajpoot S, Alagumuthu M, Baig MS. Dual targeting of 3CLpro and PLpro of SARS-CoV-2: A novel structure-based design approach to treat COVID-19. *Current Research in Structural Biology.* 2021, 3:9–18.
200. Puhl AC, Godoy AS, Noske GD, Nakamura AM, Gawriljuk VO, Fernandes RS, et al. Discovery of PL^{pro} and M^{pro} Inhibitors for SARS-CoV-2. *ACS Omega.* 2023, 8(25):22603–12.
201. Logacheva E.O., Kyrycenko A.V. Molecular docking of some clinically approved drugs as dual-acting inhibitors for proteases of coronavirus SARS-CoV-2. In IX міжнародна науково-практична конференція “Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості”, Збірник матеріалів: 18-19 листопада 2021, Харків, 2021, р. 55-60.
202. Логачова К. О., Євсєєва Л. В., Колесник Я. В., Захаров А. Б., Кириченко О. В., Іванов В. В., et al. Молекулярний дизайн та скринінг нових інгібіторів подвійної дії папаїноподібної та головної протеази коронавірусу SARS-CoV-2. XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії. Збірка матеріалів. 10-12 жовтня 2023 року, м. Харків, Друкарник: Збірка праць, 2023, С. 25.
203. Santos LH, Kronenberger T, Almeida RG, Silva EB, Rocha REO, Oliveira JC, et al. Structure-based identification of naphthoquinones and derivatives as novel inhibitors of main protease Mpro and papain-like protease PLpro of SARS-CoV-2. *J Chem Inf. Model.* 2022, 62(24):6553-6573.
204. Mousavi H, Zeynizadeh B, Rimaz M. Green and efficient one-pot three-component synthesis of novel drug-like furo[2,3-d]pyrimidines as potential active site inhibitors and putative allosteric hotspots modulators of both SARS-CoV-2 MPro and PLPro. *Bioorganic Chemistry.* 2023; 135:106390.

205. Verma D, Mitra D, Paul M, Chaudhary P, Kamboj A, Thatoi H, et al. Potential inhibitors of SARS-CoV-2 (COVID 19) proteases PLpro and Mpro/ 3CLpro: molecular docking and simulation studies of three pertinent medicinal plant natural components. *Curr. Res. Pharm. Drug Discov.* 2021, 2:100038.
206. Qayed WS, Ferreira RS, Silva JRA. In Silico Study towards Repositioning of FDA-Approved Drug Candidates for Anticoronaviral Therapy: Molecular Docking, Molecular Dynamics and Binding Free Energy Calculations. *Molecules.* 2022, 27(18):5988.
207. Rabie AM, Abdalla M. Forodesine and Riboprine Exhibit Strong Anti-SARS-CoV-2 Repurposing Potential: *In Silico* and *In Vitro* Studies. *ACS Bio Med Chem Au.* 2022, 2(6):565–85.
208. Rabie AM, Abdalla M. Evaluation of a series of nucleoside analogs as effective anticoronaviral-2 drugs against the Omicron-B.1.1.529/BA.2 subvariant: A repurposing research study. *Med Chem Res.* 2023, 32(2):326–41.
209. Ameen F, Mamidala E, Davella R, Vallala S. Rilpivirine inhibits SARS-CoV-2 protein targets: A potential multi-target drug. *J. Inf. Pub. Health.* 2021, 14(10):1454–60.
210. Lyu J, Irwin JJ, Shoichet BK. Modeling the expansion of virtual screening libraries. *Nat Chem Biol.* 2023, 19(6):712–8.
211. Sander T, Freyss J, Von Korff M, Rufener C. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *J Chem Inf Model.* 2015, 55(2):460–73.
212. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J Mol Model.* 2007, 13(12):1173–213.
213. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J Mol Model.* 2013, 19(1):1–32.
214. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics.* 1993, 98(7):5648–52.

215. Ditchfield R, Hehre WJ, Pople JA. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *The Journal of Chemical Physics*. 1971, 54(2):724–8.
216. Tomasi J, Mennucci B, Cammi R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem Rev*. 2005, 105(8):2999–3094.
217. Frisch, M.J. & Trucks, Gary & Schlegel, H.B. & Scuseria, G.E. & Robb, M.A. & Cheeseman, James & Scalmani, Giovanni & Barone, Vincenzo & Mennucci, Benedetta & Petersson, G.A. & Nakatsuji, H. & Caricato, Marco & Li, X. & Hratchian, H.P. & Izmaylov, A.F. & Bloino, Julien & Zheng, Guishan & Sonnenberg, Jason & Hada, Masahiko & Fox, Douglas. (2009). Gaussian 09 Revision A.1. Gaussian Inc.
218. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of Chemical Physics*. 2007, 126(1):014101.
219. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 1993, 98(12):10089–92.
220. Hess B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput*. 2008, 4(1):116–22.
221. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem*. 1997, 18(12):1463–72.
222. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996, 14(1):33–8.
223. Lohachova K.O., Kyrychenko A.V., Kalugin O.N. Force field benchmarking of molecular dynamics simulations of main protease of coronavirus SARS-CoV-2. XVI Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів "Хімічні Каразінські читання - 2024", Тези доповідей: 30 квітня 2024 р. Харків: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2024. р. 19-20.
224. Kovalenko S. M., Yevsieieva L. V., Lohachova, K. O., Kolesnik Y. V., Zakharov A. B., Kyrychenko A. V., et al. Validation of pharmacophore models in virtual screening of biologically active molecules. Науково-практична Internet-конференція з міжнародною участю «Topical issues of clinical pharmacology

- and clinical pharmacy», Тези доповідей. 25-26 жовтня 2023 року, Харків: НФаУ, 2023. С.198-200.
225. Lohachova KO, . Sviatenko AS, Kyrychenko A, Ivanov VV, Langer T, Kovalenko SM, et al. Computer-aided drug design of novel nirmatrelvir analogs inhibiting main protease of Coronavirus SARS-CoV-2. *J Appl Pharm Sci.* 2024, 14(5):232-239.
 226. Lohachova KO, Kyrychenko A, Kalugin ON. Critical assessment of popular biomolecular force fields for molecular dynamics simulations of folding and enzymatic activity of main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *Biophys. Chem.* 2024, 311:107258.
 227. Allais C, Connor CG, Do NM, Kulkarni S, Lee JW, Lee T, et al. Development of the Commercial Manufacturing Process for Nirmatrelvir in 17 Months. *ACS Cent Sci.* 2023, 9(5):849–57.
 228. Halford B. The Path to Paxlovid. *ACS Cent Sci.* 2022, 8(4):405–7.
 229. Li J, Wang Y, Solanki K, Atre R, Lavrijsen M, Pan Q, et al. Nirmatrelvir exerts distinct antiviral potency against different human coronaviruses. *Antiviral Research.* 2023, 211:105555.
 230. Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J Med Chem.* 2000, 43(20):3714–7.
 231. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2001, 46(1–3):3–26.
 232. Ebrahim A, Riley BT, Kumaran D, Andi B, Fuchs MR, McSweeney S, et al. The temperature-dependent conformational ensemble of SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}). *IUCrJ.* 2021, 9(5): 682-694.

233. Lohachova K.O., Kyrychenko A. V., Ivanov V.V., Langer T., Kovalenko S.M., Kalugin O.N. Rational design of novel nirmatrelvir analogs inhibiting main protease of coronavirus SARS-CoV-2. Міжнародна Internet конференція "Modern chemistry of medicines". Тези доповідей. 18 травня 2023 р., Харків: НФаУ, 2023. С.48-49.
234. Kyrychenko A. V., Lohachova K.O., Ivanov V.V., Kovalenko S.M., Kalugin O.N. Generation and screening of evolutionary libraries as a promising strategy for drug discovery against coronavirus SARS-CoV-2. XXVI Українська конференція з органічної хімії та біоорганічної хімії. 16-20 вересня 2024 року, Ужгород. Ужгородський національний університет: Матеріали конференції, 2024, Д-30.
235. Lohachova K. O., Sviatenko A. S., Kyrychenko A. V., Kalugin O. N. Evolutionary structure optimization of ensitrelvir as non-covalent inhibitor of SARS-CoV-2 main protease Mpro. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Хімія». 2024. № 43(66), 26-37.
236. Yang Y, Cao L, Yan M, Zhou J, Yang S, Xu T, et al. Synthesis of deuterated S-217622 (Ensitrelvir) with antiviral activity against coronaviruses including SARS-CoV-2. Antiviral Research. 2023, 213:105586.
237. Noske GD, De Souza Silva E, De Godoy MO, Dolci I, Fernandes RS, Guido RVC, et al. Structural basis of nirmatrelvir and ensitrelvir activity against naturally occurring polymorphisms of the SARS-CoV-2 main protease. J. Biol. Chem. 2023, 299(3):103004.
238. Duan Y, Zhou H, Liu X, Iketani S, Lin M, Zhang X, et al. Molecular mechanisms of SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. Nature. 2023, 622(7982):376–82.
239. Kovalevsky A, Aniana A, Ghirlando R, Coates L, Drago VN, Wear L, et al. Effects of SARS-CoV-2 Main Protease Mutations at Positions L50, E166, and L167 Rendering Resistance to Covalent and Noncovalent Inhibitors. J Med Chem. 2024, 67(20):18478–90.
240. Lopez UM, Hasan MdM, Havranek B, Islam SM. SARS-CoV-2 Resistance to Small Molecule Inhibitors. Curr Clin Micro Rpt. 2024, 11(3):127–39.

241. Krismer L, Schöppe H, Rauch S, Bante D, Sprenger B, Naschberger A, et al. Study of key residues in MERS-CoV and SARS-CoV-2 main proteases for resistance against clinically applied inhibitors nirmatrelvir and ensitrelvir. *npj Viruses*. 2024, 2(1):23.
242. Lin C, Jiang H, Li W, Zeng P, Zhou X, Zhang J, et al. Structural basis for the inhibition of coronaviral main proteases by ensitrelvir. *Structure*. 2023, 31(9):1016-1024.e3.
243. Kiso M, Yamayoshi S, Iida S, Furusawa Y, Hirata Y, Uraki R, et al. In vitro and in vivo characterization of SARS-CoV-2 resistance to ensitrelvir. *Nat Commun*. 2023, 14(1):4231.
244. Yevsieieva L, Trostianko P, Kyrychenko A, Ivanov V, Kovalenko S, Kalugin O. Design of non-covalent dual-acting inhibitors for proteases MPRO and PLPRO of coronavirus SARS-CoV-2 through evolutionary library generation, pharmacophore profile matching, and molecular docking calculations. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024, 6(52):15–26.
245. Ruiz-Moreno AJ, Cedillo-González R, Cordova-Bahena L, An Z, Medina-Franco JL, Velasco-Velázquez MA. Consensus Pharmacophore Strategy For Identifying Novel SARS-Cov-2 M^{pro} Inhibitors from Large Chemical Libraries. *J. Chem. Inf. Model*. 2024, 64(6):1984–95.
246. Avti P, Chauhan A, Shekhar N, Prajapat M, Sarma P, Kaur H, et al. Computational basis of SARS-CoV 2 main protease inhibition: an insight from molecular dynamics simulation based findings. *J. Biomol. Struct. Dynamics*. 2022, 40(19):8894–904.
247. Purohit P, Panda M, Muya JT, Bandyopadhyay P, Meher BR. Theoretical insights into the binding interaction of Nirmatrelvir with SARS-CoV-2 Mpro mutants (C145A and C145S): MD simulations and binding free-energy calculation to understand drug resistance. *J. Biomol. Struct. Dynamics*. 2024, 42(17):8865–84.
248. Sharma G, Kumar N, Sharma CS, Alqahtani T, Tiruneh YK, Sultana S, et al. Identification of promising SARS-CoV-2 main protease inhibitor through

- molecular docking, dynamics simulation, and ADMET analysis. *Sci Rep.* 2025, 15(1):2830.
249. Al-Khafaji K, AL-Duhaidahawi D, Taskin Tok T. Using integrated computational approaches to identify safe and rapid treatment for SARS-CoV-2. *J. Biomol. Struct. Dynamics.* 2020, 15:1–9.
 250. Shao Q, Xiong M, Li J, Hu H, Su H, Xu Y. Unraveling the catalytic mechanism of SARS-CoV-2 papain-like protease with allosteric modulation of C270 mutation using multiscale computational approaches. *Chem Sci.* 2023, 14(18):4681–96.
 251. Albani S, Costanzi E, Hoang GL, Kuzikov M, Frings M, Ansari N, et al. Unexpected Single-Ligand Occupancy and Negative Cooperativity in the SARS-CoV-2 Main Protease. *J Chem Inf Model.* 2024, 64(3):892–904.
 252. El Ahdab D, Lagardère L, Inizan TJ, Célerse F, Liu C, Adjoua O, et al. Interfacial Water Many-Body Effects Drive Structural Dynamics and Allosteric Interactions in SARS-CoV-2 Main Protease Dimerization Interface. *J Phys Chem Lett.* 2021, 12(26):6218–26.
 253. Sadeghi M, Miroliaei M. Inhibitory effects of selected isoquinoline alkaloids against main protease (Mpro) of SARS-CoV-2, in silico study. In *Silico Pharmacol.* 2022, 10(1):5.
 254. Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, Wickstrom L, Hauser KE, Simmerling C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput.* 2015, 11(8):3696–713.
 255. Tan B, Joyce R, Tan H, Hu Y, Wang J. SARS-CoV-2 Main Protease Drug Design, Assay Development, and Drug Resistance Studies. *Acc Chem Res.* 2023, 56(2):157–68.
 256. Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020, 582(7811):289–93.
 257. Georgoulia PS, Glykos NM. Molecular simulation of peptides coming of age: Accurate prediction of folding, dynamics and structures. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2019, 664:76–88.

258. Rizzuti B. Molecular simulations of proteins: From simplified physical interactions to complex biological phenomena. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2022, 1870(3):140757.
259. Goyal B, Goyal D. Targeting the Dimerization of the Main Protease of Coronaviruses: A Potential Broad-Spectrum Therapeutic Strategy. *ACS Comb Sci*. 2020, 22(6):297–305.
260. Giri-Rachman EA, Effendy VV, Azmi MHS, Yamahoki N, Stephanie R, Agustiyanti DF, et al. The SARS-CoV-2 M^{pro} Dimer-Based Screening System: A Synthetic Biology Tool for Identifying Compounds with Dimerization Inhibitory Potential. *ACS Synth Biol*. 2024, 13(2):509–20.
261. Liu C, Zhou Q, Li Y, Garner LV, Watkins SP, Carter LJ, et al. Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *ACS Cent Sci*. 2020, 6(3):315–31.
262. Vivarelli S, Falzone L, Torino F, Scandurra G, Russo G, Bordonaro R, et al. Immune-checkpoint inhibitors from cancer to COVID-19: A promising avenue for the treatment of patients with COVID-19 (Review). *Int J Oncol*. 2020, 58(2):145–57.
263. Ullrich S, Nitsche C. SARS-CoV-2 Papain-Like Protease: Structure, Function and Inhibition. *ChemBioChem*. 2022, 23(19):e202200327.
264. Magwaza NN, Mushebenge AGA, Ugbaja SC, Mbatha NA, Khan RB, Kumalo HM. Mechanistic Insights into Targeting SARS-CoV-2 Papain-like Protease in the Evolution and Management of COVID-19. *BioChem*. 2024, 4(3):268–99.
265. Taylor AJ, Ampornnanai K, Rietz TA, Zhao B, Thiruvaipati A, Wei Q, et al. Fragment-Based Screen of SARS-CoV-2 Papain-like Protease (PL^{pro}). *ACS Med Chem Lett*. 2024, 15(8):1351–7.
266. Velma GR, Shen Z, Holberg C, Fu J, Soleymani F, Cooper L, et al. Non-Covalent Inhibitors of SARS-CoV-2 Papain-Like Protease (PL^{pro}): In Vitro and In Vivo Antiviral Activity. *J Med Chem*. 2024, 67(16):13681–702.
267. Kowalewski J, Ray A. Predicting novel drugs for SARS-CoV-2 using machine learning from a >10 million chemical space. *Heliyon*. 2020, 6(8):e04639.

268. Sagaama A, Brandan SA, Ben Issa T, Issaoui N. Searching potential antiviral candidates for the treatment of the 2019 novel coronavirus based on DFT calculations and molecular docking. *Heliyon*. 2020, 6(8):e04640.
269. Garland O, Ton AT, Moradi S, Smith JR, Kovacic S, Ng K, et al. Large-Scale Virtual Screening for the Discovery of SARS-CoV-2 Papain-like Protease (PLpro) Non-covalent Inhibitors. *J Chem Inf Model*. 2023, 63(7):2158–69.
270. Bhowmik D, Sharma RD, Prakash A, Kumar D. “Identification of Nafamostat and VR23 as COVID-19 drug candidates by targeting 3CLpro and PLpro”. *J. Mol. Struct*. 2021, 1233:130094.
271. Sencanski M, Perovic V, Milicevic J, Todorovic T, Prodanovic R, Veljkovic V, et al. Identification of SARS-CoV-2 Papain-like Protease (PLpro) Inhibitors Using Combined Computational Approach. *ChemistryOpen*. 2022, 11(2):e202100248.
272. Huynh T, Cornell W, Luan B. In silico Exploration of Inhibitors for SARS-CoV-2’s Papain-Like Protease. *Front Chem*. 2021, 8:624163.
273. Tassakka ACMAR, Iskandar IW, Alam JF, Permana AD, Massi MN, Sulfahri, et al. Docking Studies and Molecular Dynamics Simulations of Potential Inhibitors from the Brown Seaweed *Sargassum polycystum* (Phaeophyceae) against PLpro of SARS-CoV-2. *BioTech*. 2023, 12(2):46.
274. Saquib Q, Bakheit AH, Ahmed S, Ansari SM, Al-Salem AM, Al-Khedhairi AA. Identification of Phytochemicals from Arabian Peninsula Medicinal Plants as Strong Binders to SARS-CoV-2 Proteases (3CLPro and PLPro) by Molecular Docking and Dynamic Simulation Studies. *Molecules*. 2024, 29(5):998.
275. Bosken YK, Cholko T, Lou YC, Wu KP, Chang C en A. Insights Into Dynamics of Inhibitor and Ubiquitin-Like Protein Binding in SARS-CoV-2 Papain-Like Protease. *Front Mol Biosci*. 2020, 7:174.
276. Pang J, Gao S, Sun Z, Yang G. Discovery of small molecule PLpro inhibitor against COVID-19 using structure-based virtual screening, molecular dynamics simulation, and molecular mechanics/Generalized Born surface area (MM/GBSA) calculation. *Struct Chem*. 2021, 32(2):879–86.

277. Castillo-Campos L, Velázquez-Libera JL, Caballero J. Computational study of the binding orientation and affinity of noncovalent inhibitors of the papain-like protease (PLpro) from SARS-CoV-1 considering the protein flexibility by using molecular dynamics and cross-docking. *Front Mol Biosci.* 2023, 10:1215499.
278. Valdés-Albuernes JL, Díaz-Pico E, Alfaro S, Caballero J. Modeling of noncovalent inhibitors of the papain-like protease (PLpro) from SARS-CoV-2 considering the protein flexibility by using molecular dynamics and cross-docking. *Front Mol Biosci.* 2024, 11:1374364.
279. Jupudi S, Rajagopal K, Murugesan S, Kumar BK, Raman K, Byran G, et al. Identification of Papain-Like Protease inhibitors of SARS CoV-2 through HTVS, Molecular docking, MMGBSA and Molecular dynamics approach. *South African Journal of Botany.* 2022, 151:82–91.
280. Holmes J, Islam SM, Milligan KA. Exploring Cannabinoids as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Papain-like Protease: Insights from Computational Analysis and Molecular Dynamics Simulations. *Viruses.* 2024, 16(6):878.
281. Ferreira GM, Pillaiyar T, Hirata MH, Poso A, Kronenberger T. Inhibitor induced conformational changes in SARS-COV-2 papain-like protease. *Sci Rep.* 2022, 12(1):11585.
282. Patel R, Prajapati J, Rao P, Rawal RM, Saraf M, Goswami D. Repurposing the antibacterial drugs for inhibition of SARS-CoV2-PLpro using molecular docking, MD simulation and binding energy calculation. *Mol Divers.* 2022, 26(4):2189–209.
283. Sohraby F, Aryapour H. Unraveling the unbinding pathways of SARS-CoV-2 Papain-like proteinase known inhibitors by Supervised Molecular Dynamics simulation. Gallicchio E, editor. *PLoS ONE.* 2021, 16(5):e0251910.
284. Elekofehinti OO, Iwaloye O, Josiah SS, Lawal AO, Akinjiyan MO, Ariyo EO. Molecular docking studies, molecular dynamics and ADME/tox reveal therapeutic potentials of STOCK1N-69160 against papain-like protease of SARS-CoV-2. *Mol Divers.* 2021, 25(3):1761–73.

285. Singh E, Jha RK, Khan RJ, Kumar A, Jain M, Muthukumaran J, et al. A computational essential dynamics approach to investigate structural influences of ligand binding on Papain like protease from SARS-CoV-2. *Computational Biology and Chemistry*. 2022, 99:107721.
286. Jade D, Ayyamperumal S, Tallapaneni V, Joghee Nanjan CM, Barge S, Mohan S, et al. Virtual high throughput screening: Potential inhibitors for SARS-CoV-2 PLPRO and 3CLPRO proteases. *European Journal of Pharmacology*. 2021, 901:174082.
287. Samantray S, Yin F, Kav B, Strodel B. Different Force Fields Give Rise to Different Amyloid Aggregation Pathways in Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Inf Model*. 2020, 60(12):6462–75.
288. Sinha S, Tam B, Wang SM. Applications of Molecular Dynamics Simulation in Protein Study. *Membranes*. 2022, 12(9):844.
289. Khaled M, Strodel B, Sayyed-Ahmad A. Comparative molecular dynamics simulations of pathogenic and non-pathogenic huntingtin protein monomers and dimers. *Front Mol Biosci*. 2023, 10:1143353.
290. Petrović D, Wang X, Strodel B. How accurately do force fields represent protein side chain ensembles? *Proteins*. 2018, 86(9):935–44.
291. Anila S, Samsonov SA. Benchmarking Water Models in Molecular Dynamics of Protein–Glycosaminoglycan Complexes. *J Chem Inf Model*. 2024, 64(5):1691–703.
292. Kyrychenko A. NANOGOLD decorated by pHLIP peptide: comparative force field study. *Phys Chem Chem Phys*. 2015, 17(19):12648–60.
293. Marcisz M, Samsonov SA. Solvent Model Benchmark for Molecular Dynamics of Glycosaminoglycans. *J Chem Inf Model*. 2023, 63(7):2147–57.
294. Lemkul JA. Introductory Tutorials for Simulating Protein Dynamics with GROMACS. *J Phys Chem B*. 2024, 128(39):9418–35.
295. Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 1983, 22(12):2577–637.

296. Calleja DJ, Kuchel N, Lu BGC, Birkinshaw RW, Klemm T, Doerflinger M, et al. Insights Into Drug Repurposing, as Well as Specificity and Compound Properties of Piperidine-Based SARS-CoV-2 PLpro Inhibitors. *Front Chem.* 2022, 10:861209.
297. Shen Z, Ratia K, Cooper L, Kong D, Lee H, Kwon Y, et al. Design of SARS-CoV-2 PLpro Inhibitors for COVID-19 Antiviral Therapy Leveraging Binding Cooperativity. *J Med Chem.* 2022, 65(4):2940–55.
298. Tumskiy RS, Tumskaia AV, Klochkova IN, Richardson RJ. SARS-CoV-2 proteases Mpro and PLpro: Design of inhibitors with predicted high potency and low mammalian toxicity using artificial neural networks, ligand-protein docking, molecular dynamics simulations, and ADMET calculations. *Computers in Biology and Medicine.* 2023, 153:106449.
299. Yuan S, Gao X, Tang K, Cai JP, Hu M, Luo P, et al. Targeting papain-like protease for broad-spectrum coronavirus inhibition. *Protein Cell.* 2022, 13(12):940–53.

Додаток А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації, у періодичних наукових виданнях держав, що входять до міжнародних наукометричних баз Scopus або Web of Science:

1. Yevsieieva L. V., **Lohachova K. O.**, Kyrychenko A., Kovalenko S. M., Ivanov V. V., Kalugin O. N. (2024) Main and papain-like proteases as prospective targets for pharmacological treatment of coronavirus SARS-CoV-2. *RSC Advances*, 13(50) 35500–35524. <https://doi.org/10.1039/d3ra06479d>. (Web of Science, Scopus Q1).

Особистий внесок здобувача: аналіз наукової літератури, вибір об'єктів дослідження. формулювання основних положень та висновків роботи, написання статті.

2. Ivanov V., **Lohachova K.**, Kolesnik Y., Zakharov A., Yevsieieva L., Kyrychenko A., Langer T., Kovalenko S. M., Kalugin O. M. (2023) Recent advances in computational drug discovery for therapy against coronavirus SARS-COV-2. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 6(46) 4-24. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.290318>. (Scopus Q3).

Особистий внесок здобувача: аналіз наукової літератури, формулювання основних положень та висновків роботи, написання статті.

3. **Lohachova K. O.**, Sviatenko A. S., Kyrychenko A., Ivanov V. V., Langer T., Kovalenko S. M., Kalugin O. N. (2024) Computer-aided drug design of novel nirmatrelvir analogs inhibiting main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(5) 232-239. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2024.158114>. (Scopus Q2).

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, проведення розрахунків з молекулярного докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання статті.

4. **Lohachova K. O.**, Kyrychenko A., Kalugin O. N. (2024) Critical assessment of popular biomolecular force fields for molecular dynamics simulations of folding and enzymatic activity of main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *Biophysical Chemistry*, 311, Art. num. 107258. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2024.107258>. (Web of Science, Scopus Q2).

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, проведення молекулярно-динамічних розрахунків, обробка даних та аналіз результатів, написання статті.

Публікація у науковому виданні, включеному на дату опублікування до переліку наукових фахових видань України:

5. **Lohachova K. O.**, Sviatenko A. S., Kyrychenko A. V., Kalugin O. N. (2024) Evolutionary structure optimization of ensitrelvir as non-covalent inhibitor of SARS-CoV-2 main protease M^{pro}. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Хімія»*, 43(66), 26-37. <https://doi.org/10.26565/2220-637X-2024-43-02>. (стаття категорії «Б»).

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, генерація еволюційної бібліотеки, проведення молекулярного докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання статті; особистий внесок Святенко А.С.: літературний огляд; особистий внесок Кириченка О.В.: постановка завдання; особистий внесок Калугіна О.М.: загальне керівництво роботою.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. **Logacheva E.O.**, Kyrychenko A.V. (2021) Molecular docking of some clinically approved drugs as dual-acting inhibitors for proteases of coronavirus SARS-CoV-2. *IX міжнародна науково-практична конференція "Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості"*, Збірник матеріалів: 18-19 листопада 2021, Харків, 55-60.

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, проведення молекулярного докінгу дуальних інгібіторів, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

7. **Lohachova K.O.**, Kyrychenko A.V., Kalugin O.N. (2022) Inhibitory effect of sharp-edged gold nanoparticles against main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *Ukrainian Conference with International Participation "Chemistry, Physics and Technology of Surface"*. Book of Abstracts. 19-20 October 2022, Kyiv, Ukraine. 112.

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, проведення молекулярно-динамічного моделювання, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

8. **Lohachova K. O.**, Kyrychenko A. V., Ivanov V. V., Langer T., Kovalenko S. M., Kalugin O. N. (2023) Rational design of novel nirmatrelvir analogs inhibiting main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *Міжнародна Internet конференція "Modern chemistry of medicines"*. Тези доповідей. 18 травня 2023 р., Харків: НФаУ, 48-49.

Особистий внесок здобувача: планування експерименту, проведення молекулярного докінгу нових похідних нірматрелвіру, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

9. Kovalenko S.M., Yevsieieva L.V., **Lohachova K.O.**, Kolesnik Y.V., Zakharov A.B., Kyrychenko A.V., Ivanov V.V., Kalugin O. N. (2023) Validation of pharmacophore models in virtual screening of biologically active molecules. *Науково-практична Internet-конференція з міжнародною участю «Topical issues of clinical pharmacology and clinical pharmacy»*, Тези доповідей. 25-26 жовтня 2023 року, Харків: НФаУ, 198-200.

Особистий внесок здобувача: розробка фармакофорної моделі, проведення докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

10. **Логачова К.О.**, Євсєєва Л.В., Колесник Я.В., Захаров А.Б., Кириченко О.В., Іванов В.В., Коваленко С.М., Калугін О.М. (2023) Молекулярний дизайн та скринінг нових інгібіторів подвійної дії папаїноподібної та головної

протеази коронавірусу SARS-CoV-2. *XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії*. Збірка матеріалів. 10-12 жовтня 2023 року, м. Харків, Друкарник: Збірка праць, 25.

Особистий внесок здобувача: планування розрахунків, проведення докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

11. **Lohachova K.**, Ivanov V., Anokhin D., Zakharov A., Yevsieieva L., Kyrychenko A., Langer T., Kovalenko S., Kalugin O. (2023) Rational design of novel inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *International Scientific Internet Conference: «Molecular Engineering and Computational Modelling for Nano- and Biotechnology: From Nanoelectronics to Biopolymers»*, September 27–28, 2023, Cherkasy, Ukraine. Book of Abstracts. Cherkasy: Chabanenko Yu. A., 35-36.

Особистий внесок здобувача: планування розрахунків, проведення докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

12. Kyrychenko A. V., **Lohachova K. O.**, Ivanov V. V., Kovalenko S. M., Kalugin O. N. (2024) Generation and screening of evolutionary libraries as a promising strategy for drug discovery against coronavirus SARS-CoV-2. *XXVI Українська конференція з органічної хімії та біоорганічної хімії*. 16-20 вересня 2024 року, Ужгород. Ужгородський національний університет: Матеріали конференції, Д-30.

Особистий внесок здобувача: планування розрахунків, проведення докінгу, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

13. **Lohachova K.O.**, Kyrychenko A.V., Kalugin O.N. (2024) Force field benchmarking of molecular dynamics simulations of main protease of coronavirus SARS-CoV-2. *XVI Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів "Хімічні Каразінські читання - 2024"*, Тези доповідей: 30 квітня 2024 р. Харків: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 19-20.

Особистий внесок здобувача: планування розрахунків, проведення МД розрахунків, обробка даних та аналіз результатів, написання тез.

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 16:03:37 13.05.2025

Назва файлу з підписом: Lohachova_diss.pdf.xml
Розмір файлу з підписом: 17.0 КБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: Lohachova_diss.pdf
Розмір файлу без підпису: 5.9 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Логачова Катерина Олегівна
П.І.Б.: Логачова Катерина Олегівна
Країна: Україна
РНОКПП: 3593102507
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 17:03:36 13.05.2025
Сертифікат виданий: КНЕДП ТОВ "Вчасно Сервіс"
Серійний номер: 2DBD5940D955E12A0400000031C40300CF711300
Алгоритм підпису: ДСТУ 4145
Тип підпису: Удосконалений
Тип контейнера: Підпис та дані в окремих файлах (XAdES detached)
Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)
Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2025.02.05 13:00