

Л. В. Євсєєва¹, В. В. Іванов¹, В. Р. Карпіна², С. С. Коваленко², І. Е. Кузнецов²,
Т. Лангер³, Л. Маес⁴, С. М. Коваленко¹

¹ Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна
61022, м. Харків, пл. Свободи, 4, Україна. E-mail: kovalenko.sergiy.m@gmail.com

² Національний фармацевтичний університет, Україна

³ Віденський університет, Австрія

⁴ Антверпенський університет, Бельгія

Використання віртуального скринінгу з метою пошуку потенційних противірусних агентів для лікування коронавірусної хвороби COVID-19

Мета. Надати скорочений огляд літературних даних стосовно будови коронавірусу людини SARS-CoV-2, механізму його репродукції та ролі вірусних протеаз у цьому процесі. За допомогою інструментів комп'ютерного моделювання проаналізувати здатність відомих противірусних агентів та *de novo* синтезованих сполук зв'язувати та пригнічувати головну протеазу коронавірусу.

Результати та їх обговорення. Коронавірусна хвороба COVID-19 за останні місяці стала викликом для всього світу. З огляду на швидке поширення та важкий перебіг COVID-19 у значній частини населення існує нагальна потреба в ефективних лікарських засобах і відповідних протоколах лікування, які, на жаль, поки що відсутні. На теперішній час пошук молекул з прийнятним профілем токсичності, здатних пригнічувати та/або припиняти репродукцію коронавірусу SARS-CoV-2 в організмі людини, є вельми актуальним. У представленій роботі на основі даних про будову головної протеази M^{pro} SARS-CoV-2 було проведено віртуальний скринінг та молекулярний докінг як відомих противірусних агентів, так і нових синтезованих сполук. Виявлені в ході дослідження закономірності можуть бути корисними для пошуку та розробки нових противірусних лікарських засобів для боротьби з захворюванням COVID-19 та іншими коронавірусними інфекційними хворобами. Аналіз результатів розрахунків фізико-хімічних характеристик противірусних агентів та визначення сайтів їх зв'язування з головною вірусною протеазою M^{pro} дозволяє дати оптимістичну оцінку можливості створення нових лікарських засобів на основі відомих противірусних лікарських засобів або їх модифікованих аналогів.

Експериментальна частина. На основі аналізу новітніх досліджень кристалічної структури головної протеази вірусу M^{pro} у комплексі з різними інгібіторами (Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb>, код структури – 6LU7) проведено віртуальний скринінг та молекулярний докінг 100 відомих противірусних агентів та 50 нових синтезованих сполук. Наведено дані скринінгу *in vitro* антималярійної активності синтезованих сполук. Для всіх потенційних інгібіторів головної протеази вірусу було розраховано параметри зв'язування та фізико-хімічні параметри взаємодії «ліганд–білок»: показник спорідненості (BAS), енергію зв'язування, ліпофільність (clogP) та топологічний індекс площі поверхні полярних груп молекули ліганду (TPSA). Вивчення структури білка та ліганду проводили за допомогою графічних програмних пакетів Jmol, PyMol та Avogadro. Віртуальний скринінг та молекулярний докінг, а також аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програмного комплексу LigandScout 4.4. Дані щодо антималярійної активності 50 синтезованих сполук були отримані в Лабораторії мікробіології, паразитології та гігієни Антверпенського університету (Бельгія).

Висновки. За результатами віртуального скринінгу та молекулярного докінгу з білком 6LU7 було встановлено, що низка відомих противірусних лікарських засобів має певну перспективу використання як інгібіторів головної протеази коронавірусу SARS-CoV-2, а такі субстанції, як ремдесивір та ритонавір характеризуються більш високою активністю, ніж референтна сполука з комплексу 6LU7. Молекулярний докінг ряду нових, нещодавно синтезованих сполук з доведеною *in vitro* антималярійною активністю показав, що сполуки L1–L6 можуть стати перспективними кандидатами для подальшої модифікації та розробки нових противірусних лікарських засобів для боротьби з коронавірусною інфекцією.

Ключові слова: коронавірусна інфекція; SARS-CoV-2; протеаза M^{pro}; 6LU7; молекулярний докінг; віртуальний скринінг; протикоронавірусна активність; [1,2,4]триазоло[4,3-а]піридини; 1,2,4-оксадіазол; [1,2,4]триазоло[4,3-а]хіназолін-5-они

L. V. Evseeva¹, V. V. Ivanov¹, V. R. Karpina², S. S. Kovalenko², I. E. Kuznetsov²,
T. Langer³, L. Maes⁴, S. M. Kovalenko¹

¹ V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

² National University of Pharmacy, Ukraine

³ University of Vienna, Austria

⁴ University of Antwerp, Belgium

The virtual screening application for searching potential antiviral agents to treat COVID-19 disease

Aim. To provide a brief literature review regarding the structure of the human coronavirus SARS-CoV-2, the mechanism of its replication and the role of viral proteases in this process; to analyze the ability of the known antiviral agents and compounds synthesized *de novo* in order to bind and inhibit the coronavirus main protease using computer simulation tools.

Results and discussion. COVID-19 coronavirus has become a worldwide challenge in recent months. Taking into account the rapid spread and severity of COVID-19 among a significant part of the population there is an urgent need to develop effective medicines and appropriate treatment protocols, which, unfortunately, are not yet available. Currently, the search for molecules with an acceptable toxicity profile that are able to inhibit and/or stop coronavirus SARS-CoV-2 replication in the human body is very relevant. In this study, the virtual screening and molecular docking of both antiviral agents known and new compounds synthesized have been performed based on the structure of the main protease M^{pro} of SARS-CoV-2. The regularities identified during our study can be useful for searching and developing new antiviral drugs to control COVID-19 and other coronavirus infections. The analysis of the results of calculations of physicochemical characteristics of antiviral agents, as well as the determination of their binding sites with the main viral protease M^{pro} gives an optimistic assessment of the possibility to develop new drugs based on the structures of the known antiviral drugs or their modified analogs.

Experimental part. Based on recent studies of the crystal structure of the virus main protease M^{pro} in the complex with various inhibitors (Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb>, the structure code – 6LU7) the virtual screening and molecular docking of 100 known antiviral agents and 50 novel compounds synthesized were performed. The screening data for the *in vitro* antimalarial activity of the compounds synthesized were presented. The following binding and physicochemical parameters of the ligand–protein interaction for all virus main protease potential inhibitors were calculated: binding affinity score (BAS), binding energy, lipophilicity (*clogP*) and topological polar surface area (TPSA). The protein and ligand structures were studied using Jmol, PyMol, and Avogadro graphics software packages. The virtual screening and molecular docking, as well as the analysis of the results were performed using a LigandScout 4.4 software package. Data on the antimalarial activity of 50 compounds synthesized were obtained from the Laboratory of Microbiology, Parasitology and Hygiene of the University of Antwerp (Belgium).

Conclusions. According to the results of the virtual screening and molecular docking with protein 6LU7 it has been found that a number of the known antiviral drugs have a certain potential for their use as inhibitors of SARS-CoV-2 coronavirus main protease. Remdesivir and ritonavir substances have shown higher activity than the reference compound of the 6LU7 complex. The molecular docking of a series of compounds recently synthesized with the proven *in vitro* antimalarial activity has revealed that L1–L6 compounds are promising candidates for further modification and development of new antiviral drugs to control coronavirus infection.

Key words: coronavirus infection; SARS-CoV-2; M^{pro} protease; 6LU7; molecular docking; virtual screening; antiviral activity; [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyridine; 1,2,4-oxadiazole; [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinazolin-5-ones

Л. В. Евсеева¹, В. В. Иванов¹, В. Р. Карпина², С. С. Коваленко², И. Е. Кузнецов²,
Т. Лангер³, Л. Маес⁴, С. М. Коваленко¹

¹ Харьковський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

² Національний фармацевтичний університет, Україна

³ Венський університет, Австрія

⁴ Антверпенський університет, Бельгія

Использование виртуального скрининга с целью поиска потенциальных противовирусных агентов для лечения коронавирусной болезни COVID-19

Цель. Представить краткий обзор литературных данных о строении коронавируса человека SARS-CoV-2, механизме его репродукции и роли вирусных протеаз в этом процессе. С помощью инструментов компьютерного моделирования проанализировать способность известных противовирусных агентов и *de novo* синтезированных соединений связываться и подавлять главную протеазу коронавируса.

Результаты и их обсуждение. Коронавирусная болезнь COVID-19 за последние месяцы стала вызовом для всего мира. Учитывая быстрое распространение и тяжелое течение COVID-19 у значительной части населения, существует насущная необходимость в эффективных лекарственных средствах и соответствующих протоколах лечения, которых, к сожалению, пока нет. В настоящее время поиск молекул с приемлемым профилем токсичности, способных подавлять и/или прекращать репродукцию коронавируса SARS-CoV-2 в организме человека, является весьма актуальным. В представленной работе на основе данных о строении главной протеазы M^{pro} SARS-CoV-2 был проведен виртуальный скрининг и молекулярный докинг как известных противовирусных агентов, так и новых синтезированных соединений. Выявленные в ходе исследования закономерности могут быть полезными для поиска и разработки новых противовирусных лекарственных средств для борьбы с заболеванием COVID-19 и другими коронавирусными инфекционными болезнями. Анализ результатов расчетов физико-химических характеристик противовирусных агентов и определение сайтов их связывания с главной вирусной протеазой M^{pro} позволяет дать оптимистичную оценку возможности создания новых лекарственных средств на основе известных противовирусных лекарственных средств или их модифицированных аналогов.

Экспериментальная часть. На основе анализа новейших исследований кристаллической структуры главной протеазы вируса M^{pro} в комплексе с различными ингибиторами (Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb>, код структуры – 6LU7) проведен виртуальный скрининг и молекулярный докинг 100 известных противовирусных агентов и 50 новых синтезированных соединений. Приведены данные скрининга *in vitro* антималярийной активности синтезированных соединений. Для всех потенциальных ингибиторов главной протеазы вируса рассчитаны параметры связывания и физико-химические параметры взаимодействия «лиганд–белок»: показатель сродства (BAS), энергия связывания, липофильность (*clogP*) и топологический индекс площади поверхности полярных групп молекулы лиганда (TPSA). Изучение структуры белка и лиганда проводили с помощью графических программных пакетов Jmol, PyMol и Avogadro. Виртуальный скрининг и молекулярный докинг, а также анализ полученных результатов проводили с помощью программного комплекса LigandScout 4.4. Данные по антималярийной активности 50 синтезированных соединений были получены в Лаборатории микробиологии, паразитологии и гигиены Антверпенского университета (Бельгия).

Выводы. По результатам виртуального скрининга и молекулярного докинга с белком 6LU7 было установлено, что ряд известных противовирусных лекарственных средств имеет определенную перспективу использования в качестве ингибиторов главной протеазы коронавируса SARS-CoV-2, а такие субстанции как ремдесивир и ритонавир характеризуются более высокой активностью, чем референтное соединение из комплекса 6LU7. Молекулярный докинг ряда новых, недавно синтезированных соединений с доказанной *in vitro* антималарийной активностью показал, что соединения L1–L6 могут стать перспективными кандидатами для дальнейшей модификации и разработки новых противовирусных лекарственных средств для борьбы с коронавирусной инфекцией.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция; SARS-CoV-2; протеаза M^{pro}; 6LU7; молекулярный докинг; виртуальный скрининг; противокоронавирусная активность; [1,2,4]триазоло[4,3-а]пиридины; 1,2,4-оксадиазол; [1,2,4]триазоло[4,3-а]хиназолин-5-оны

Новий вид коронавірусу людини (HCoV) є збудником, що спричинив спалах вірусної пневмонії 2019–2020 рр., який розпочався в листопаді 2019 року в місті Ухань (КНР). Пацієнтам, які були госпіталізовані наприкінці грудня в місцеву лікарню, було поставлено діагноз «невідома пневмонія». Впродовж грудня 2019 року – січня 2020 року захворювання стрімко поширювалось. 7 січня 2020 року вірус-збудник атипової пневмонії був виділений з респіраторного епітелію пацієнтів. 11 лютого 2020 року новий коронавірус був офіційно перейменований на «SARS-CoV-2». Захворювання, викликане SARS-CoV-2, було названо «коронавірусною хворобою 2019» (COVID-19). 11 березня 2020 року ВОЗ оголосила пандемію COVID-19 [1, 2].

На середину квітня 2020 року коронавірусна хвороба поширилась на 210 країн і територій, де було підтверджено інфікування понад 2 млн людей та зафіксовано понад 150 тис. летальних випадків [2], що характеризує поширення захворювання як лавиноподібний процес. На теперішній час не існує етіотропної терапії COVID-19, а ефективність противірусних препаратів, які розроблялися раніше для боротьби з іншими типами РНК-вірусів, є обмеженою. Враховуючи потенційну загрозу пандемії, вчені всього світу намагаються дослідити природу SARS-CoV-2 та знайти ефективні засоби лікування, зосереджуючи свою увагу, головним чином, на існуючих лікарських засобах, ефективних проти інших РНК-вірусів.

Коронавіруси (CoVs) – це РНК-віруси, які відносяться до родини *Coronaviridae* та мають шипоподібні вирости на поверхні вірусної частинки, схожі на корону, що й зумовило їх назву. Віруси родини CoVs вражають дихальну, шлунково-кишкову, центральну нервову системи людини та тварин. Коронавіруси людини (HCoVs) були ідентифіковані як патогени після спалаху важкого гострого респіраторного синдрому (більш відомого, як SARS) у 2003 році. З 2002 року два високопатогенні штами β -CoVs – вірус важкого гострого респіраторного синдрому (SARS-CoV) та вірус близькосхідного респіраторного синдрому (MERS-CoV) – спричинили декілька значних спалахів епідемії у людей [4]. Новий вірус SARS-CoV-2 відноситься також до β -коронавірусів, який спочатку атакує

клітини назофарингеального епітелію, а потім – епітелій легенів, викликаючи вірусну пневмонію. Крім того, цей вірус може вражати інші органи і системи, призводячи до поліорганної недостатності. Поточна інформація вказує на те, що SARS-CoV-2 є більш здатним до розповсюдження, ніж SARS-CoV [3].

Геном CoVs містить одноланцюгову (+)РНК розміром 27–32 kb (kilobase pairs) та є другим за розміром з усіх геномів РНК-вірусів. Вважається, що розширений розмір геному CoVs пов'язаний з підвищеною точністю реплікації. Розширення геному додатково полегшує включення до вірусного геному послідовностей, що кодують допоміжні білки, які сприяють адаптуванню CoVs до конкретного господаря. В результаті зміни геному, викликані рекомбінацією, обмінами, вставками або делеціями генів, підродини CoVs швидко розширюється і постійно змінюється таксономія CoVs [4].

Як правило, дві третини геномної РНК кодує два реплікативних поліпротеїни ORF1a і ORF1b, які перетворюються на вірусну полімеразу (RdRp) та інші неструктурні білки, що беруть участь у синтезі РНК або модуляції відповіді господаря. Інша третина геному кодує чотири структурних білки: білок шипа (S), білок оболонки (E), мембранний білок (M) і нуклеокапсидний білок (N) та інші допоміжні білки. S- та N-білки надають стійкість вірусу. S-білок може зв'язуватися з клітинними рецепторами чутливих клітин господаря і опосередковує інфікування клітин-мішеней, після чого вірус починає реплікуватися [4].

Коронавірус SARS-CoV-2 належить до нової еволюційної гілки сімейства CoVs. Дослідження показали, що більшість білків нового вірусу SARS-CoV-2 є високоомологічними (95–100%) білками вірусу SARS-CoV, що вказує на еволюційну схожість між SARS-CoV і SARS-CoV-2. Встановлено, що як вірус SARS-CoV, так і новий SARS-CoV-2 використовують для проникнення клітинний рецептор – мембранну екзопептидазу – ангіотензин-перетворюючий фермент другого типу (ACE2) людини (рис. 1).

Віруси проникають у клітини господаря завдяки взаємодії поверхневого шипоподібного S-білка з протеазним доменом ACE2. Рецептор-зв'язуючий домен (RBM) S-білка може безпосередньо зв'язуватися з ACE2. Було встановлено, що ACE2 є ключовим

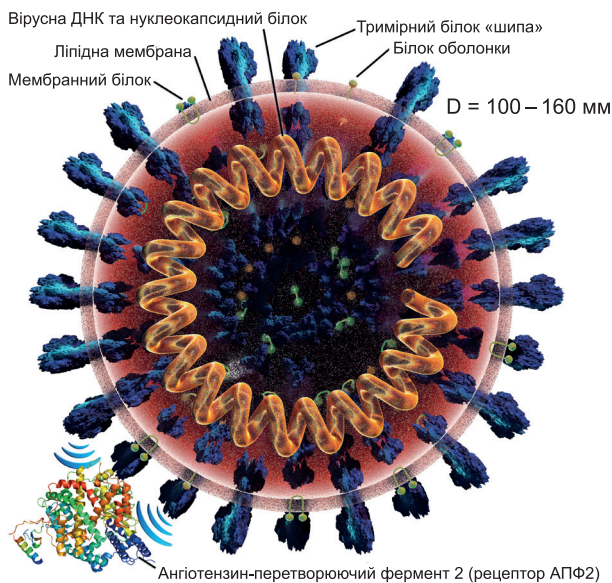


Рис. 1. Будова коронавірусу SARS-CoV-2 та його взаємодія з ACE2 – рецептором на поверхні клітини-мішені

човим рецептором для проникнення SARS-CoV та SARS-CoV-2 у клітини-мішені. Зв'язування S-білка з ACE2 і подальше злиття вірусної та клітинної мембран також призводить до інтерналізації ACE2, що спричиняє тяжке альвеолярне пошкодження. Зменшення пулу ACE2 на поверхні клітин призводить до надлишкової експресії ангіотензинперетворюючого ферменту і, відповідно, до підвищення продукції ангіотензину-II (Ang II), а стимуляція рецептора Ang II типу 1 (AGTR1A) збільшує проникність легеневих судин, що посилює ушкодження легеневої тканини [6]. Продемонстровано, що експресія ACE2 посилюється при деяких захворюваннях і пошкодженнях, а також під дією таких факторів як Ang II, інсулін і фактори росту [7]. SARS-CoV-2 використовує клітинний рецептор ACE2 більш ефективно, ніж SARS-CoV [1].

Дослідження вчених з Національного центру інфекційних захворювань і інституту глобального здоров'я Республіки Сінгапур [8] виявили у геномі коронавірусу SARS-CoV-2, виділеного у пацієнтів у Сінгапурі, зміну у транскрипційно-регуляторній послідовності ORF8 вірусної РНК. Автори припускають, що ця зміна суттєво покращила адаптацію вірусу до організму людини. Така модифікація вірусної РНК могла спричинити зниження імуногенності SARS-CoV-2 і забезпечити кращу адаптацію в організмі людини. Можливо, саме ця зміна у послідовності ORF8 забезпечила швидке поширення COVID-19 серед людей.

У лютому 2020 року в журналі *Viruses* була опублікована стаття під назвою «Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV», яка містила перший систематизований порівняльний опис нового і вже відомого збудників атипової пневмонії [1]. У пацієнтів з COVID-19 проявлялися подібні до

SARS симптоми. Лихоманка, втома і сухий кашель є основними загальними проявами у пацієнтів. В той час як закладеність носа, нежить та інші симптоми, характерні для ураження верхніх дихальних шляхів, зустрічаються при COVID-19 досить рідко. Згідно зі звітом Пекінського центру з контролю і профілактики захворювань типовий перебіг COVID-19 характеризується прогресуючим загостренням процесу. Загалом виділяють декілька форм COVID-19 відповідно до тяжкості хвороби і її наслідків: легка, нормальна (типова), важка і критична:

I. Легкі випадки – клінічні симптоми були легкими і при комп'ютерній томографії (КТ) грудної клітки не було виявлено пневмонії.

II. Нормальні випадки – лихоманка, респіраторні симптоми та виявлення проявів пневмонії в деяких випадках.

III. Важкі випадки – респіраторний дистрес-синдром.

IV. Критичні випадки – гостра дихальна недостатність і необхідність штучної вентиляції легень, шок або пов'язана з цим недостатність діяльності інших органів.

Латентний період COVID-19 в середньому складає від 3–7 до 14 днів (у порівнянні з 1–4 днями для SARS).

Наявні клінічні дані свідчать про те, що більшість смертей сталася у літніх пацієнтів. Проте важкі випадки були зареєстровані і у молодих людей з хронічними захворюваннями, такими як діабет або гепатит В, та тих, у кого фіксували тривале використання гормонів або імунодепресантів і зниження імунної функції.

Дослідження, проведене у 8 866 пацієнтів, у яких було підтверджено COVID-19, виявило, що майже половина пацієнтів була у віці 50 років і старше (47,7%). Співвідношення чоловіків і жінок складало близько 2,7:1, а середній інкубаційний період – 5,2 днів. Важкі і летальні випадки COVID-19 значно частіше зустрічалися у пацієнтів середнього віку та літніх людей з тривалою історією хронічних захворювань серцево-судинної та дихальної системи.

На даний момент не існує засобів етіотропної терапії COVID-19 та перевірених схем лікування, відсутні ефективні лікарські засоби для боротьби з вірусом SARS-CoV-2 та іншими патогенними для людини коронавірусами. Для профілактики та лікування COVID-19 головним чином використовується ізоляція і засоби симптоматичної терапії. Ефективні та належним чином підтверджені варіанти патогенетичного лікування поки є дуже обмеженими і стосуються результатів досліджень на лабораторних тваринах і окремих випадках терапії «відчаю» людей. Одним із найбільш обнадійливих досягнень у розробці засобів етіотропної терапії COVID-19 є результати застосування

інгібіторів вірусних протеаз, які проявили достатньо високу активність проти SARS-CoV-2.

Лопінавір і ритонавір (Калетра®) – комбінація інгібіторів протеаз, які використовуються для лікування ВІЛ-інфекції, де ритонавір застосовується як бустер – підсилювач інгібітора печінкового цитохрому P450-3A4, що метаболізує інгібітори протеаз. Застосування комбінації лопінавіру та ритонавіру для лікування COVID-19 виявилось ефективним для певної групи пацієнтів, але загальний клінічний ефект не було визначено. Мішенями лопінавіру і ритонавіру є дві головні протеази вірусів ВІЛ-1 та ВІЛ-2 (3CLpro і PLpro), відповідальні за розщеплення синтезованих клітиною великих нефункціональних вірусних білків на набір менших функціональних поліпептидів, що передує збірці та упаковці вірусу в цитозолі клітин господаря [3, 9].

Нелфінавір було розроблено як потенційний інгібітор головної протеази вірусу ВІЛ, що порушує утворення вірусного капсиду і пригнічує реплікацію вірусу з утворенням незрілих вірусних частинок, що не можуть інфікувати клітини організму. Запропоновано тестування при лікуванні COVID-19 [9].

У США проведено випробування препарату ремдесивіру, який було розроблено компанією Gilead Sciences, Inc. для боротьби з лихоманкою Ебола. Клінічні випробування ремдесивіру для лікування COVID-19 тільки що розпочалися і, відповідно, результати експериментів залишаються нез'ясованими [1, 9].

У Китаї почали рекомендувати медикам використовувати препарат фавіпіравір, розроблений японською компанією Fujifilm Toyama Chemical (торгова назва Avigan) проти РНК-вмісних вірусів [9]. Однак експерти з інфекційних захворювань Південної Кореї вважають, що не існує достатньо клінічних даних, щоб довести ефективність препарату [8].

Хлорохін, антималярійний лікарський засіб, довів свою ефективність у лікуванні коронавірусу в Китаї [3]. Хлорохін – лікарський препарат з групи похідних 4-амінохіноліну, що гальмує синтез нуклеїнових кислот у клітинах. Вважається, що протикоронавірусна дія препарату пов'язана з підвищенням рН в ендосомах, що перешкоджає глікозиляції ACE2 [9].

Неймовірні виклики, спричинені пандемією COVID-19, активізували пошук нових антивірусних лікарських засобів. ВООЗ збирає останні наукові результати та загальну інформацію про коронавірусну хворобу (COVID-19) для використання цих знань у нових дослідженнях. На теперішній час опубліковані дані стосовно кристалічної структури головної протеази (M^{pro}) коронавірусу SARS-CoV-2, яка визначена з високою роздільною

здатністю. Головна протеаза M^{pro} є одним з ключових ферментів у циклі відтворення вірусу, оскільки вона забезпечує відокремлення функціональних вірусних білків від вихідної амінокислотної послідовності, тобто M^{pro} виступає лімітуючою ланкою і контролює низку наступних процесів реплікації вірусу. З огляду на стратегічне положення M^{pro} в каскаді біохімічних процесів життєдіяльності SARS-CoV-2 цей фермент розглядається як перспективна мішень для розробки специфічних інгібіторів, які можуть стати новими лікарськими препаратами від коронавірусних інфекцій [10].

Експериментальна частина

Послідовність одноланцюгової молекули РНК вірусного геному SARS-CoV-2 містить приблизно 30 тис. нуклеотидів і на сьогодні вона повністю розшифрована [3]. Також достеменно вивчено кристалічну будову головної протеази M^{pro} цього вірусу. В роботі [11] представлено результати рентгеноструктурного аналізу ліганд-незалежного рецептора M^{pro} SARS-CoV-2 (PDB код – 2BX4) та відповідного комплексу з інгібітором α -кетонаміду. Автори виявили сполуку-лідера – піридинове похідне пептидоміметичного α -кетонаміду та встановили в експериментах *in vitro* її високу протикоронавірусну активність. Результати досліджень фармакокінетичних властивостей (ADME – всмоктування–розподіл–метаболізм–виведення) свідчать, що досліджуваний інгібітор характеризується вираженим тропізмом до легеневої тканини та може бути введений до організму людини інгаляційним шляхом. Авторами цього дослідження анонсовано, що в наступній публікації будуть наведені результати вивчення комплексу головної протеази SARS-CoV з лігандом на базі похідного дигідропіридину. Слід зазначити, що кристалічну структуру цього комплексу вже внесено до глобальної бази даних білків «Protein Data Bank» (PDB код 6Y7M) [12].

Результати цих досліджень стали підґрунтям для виконання низки пошукових досліджень зі створення потенційних інгібіторів даного ферменту. Так, у роботі [13] за допомогою докінгу речовин рослинного походження було проведено оцінку ряду активних сполук як потенційних інгібіторів протеази M^{pro} SARS-CoV-2. За результатами дослідження автори припускають, що нелфінавір та лопінавір можуть стати перспективними препаратами для лікування COVID-19. В іншому нещодавно завершеному дослідженні було запропоновано парітапревір та симепревір як потенційні інгібітори 3CL^{pro} (інша назва M^{pro}) SARS-CoV-2 [14].

Таким чином, наявність опису амінокислотної послідовності протеази M^{pro} та інформація стосовно тривимірної структури цього протеїну з бази даних «Protein Data Bank» [15] дають можливість

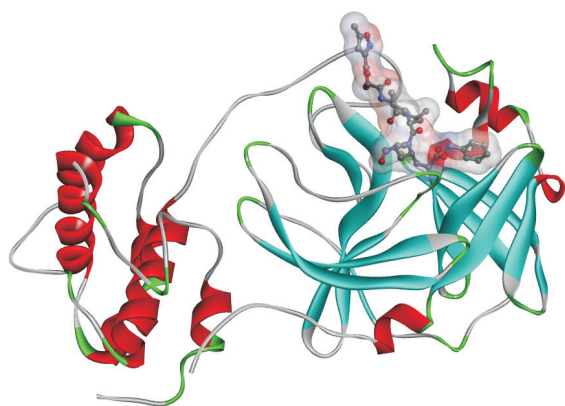


Рис. 2. Кристалічна структура головної протеази SARS-CoV-2 (PDB код – 6LU7) у комплексі з інгібітором **PRD_002214** [5]

пошуку активних сполук, їх молекулярного дизайну та посилення фармакологічних властивостей як потенційних інгібіторів протеази M^{pro} для боротьби з COVID-19 та іншими коронавірусними інфекціями.

Ґрунтуючись на даних літератури, з метою виявлення потенційних сполук-лідерів для розробки нових засобів лікування COVID-19 ми провели віртуальний скринінг та молекулярний докінг M^{pro} – головної протеази вірусу SARS-CoV-2 для низки відомих противірусних агентів та для групи нових, нещодавно синтезованих сполук.

У ході дослідження було використано 3D структуру комплексу протеїнази M^{pro} із лігандом **PRD_002214**. Рентгеноструктурні характеристики комплексу 6LU7 у форматі *.pdb було отримано з бази даних білків [5]. Кристалічна структура головної протеази містить 306 амінокислотних залишків, які відповідають ділянці Ser3241 – Gln3546; молекулярна маса – приблизно 31,4 кДа (рис. 2).

Графічний аналіз структур протеїну і лігандів проводили за допомогою програмних пакетів, які вільно розповсюджуються в мережі Інтернет: програми Jmol [16], PyMol [17], Avogadro [18]. Процедура віртуального скринінгу та молекулярного докінгу, а також аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програмного комплексу LigandScout 4.4 [19].

Оцінку біологічної активності досліджуваних сполук виконували на підставі розрахунків наступних параметрів: показника спорідненості (Binding Affinity Score, BAS) та енергії зв'язування (Binding Energy, BE, ккал/моль). Крім того, розраховували коефіцієнт ліпофільності ($clogP$) та топологічний індекс площі поверхні полярних груп для молекули конкретного ліганду (TPSA). Зазначені показники дозволяють кількісно описати ключові фізико-хімічні властивості досліджуваних сполук та спрогнозувати їх здатність проникати крізь ліпідні мембрани і, відповідно, потрапляти в цитозоль клітин. На підставі розрахунку $clogP$ та TPSA

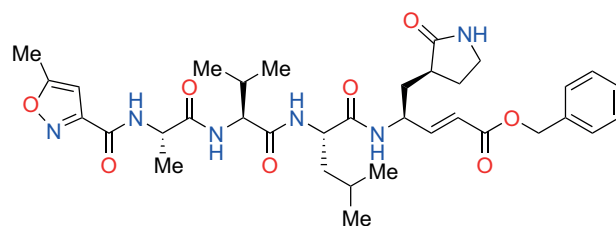


Рис. 3. Хімічна будова ліганду **PRD_002214**

визначають очікувану біодоступність досліджуваної діючої речовини [20, 21]. Відповідно до «правила п'яти» Ліпінського значення коефіцієнту ліпофільності для потенційних лікарських субстанцій має знаходитись у межах від 2 до 5 [22]. Щодо показника TPSA, то молекули з площею поверхні полярних груп понад 140 \AA^2 , як правило, характеризуються низькою проникністю крізь клітинну мембрану. Виключенням є макроциклічні сполуки, TPSA яких може значно перевищувати 140 \AA^2 [23].

Структурну формулу молекули інгібітора **PRD_002214**, який було використано як опорну систему для оцінки характеристик зв'язування фермент-інгібіторного комплексу 6LU7, наведено на рис. 3.

Всі сполуки для скринінгу та подальшого докінгу були попередньо оброблені та сформовані в бібліотеку тривимірних структур у форматі *.ldb за допомогою зазначених вище програм.

Спочатку за допомогою програми LigandScout було виділено ключові фармакофорні характеристики комплексу ліганд-рецептор (6LU7). Далі отриманий фармакофор було використано для проведення віртуального скринінгу бази сполук з понад 100 відомих фармакологічних агентів з встановленою противірусною активністю. Крім цього, до даної бази також було додано декілька антималарійних агентів, які за останніми даними проявили здатність пригнічувати репродукцію коронавірусу SARS-CoV-2 [24].

За результатами віртуального скринінгу було ідентифіковано 18 сполук з найвищим рівнем фармакофорної відповідності (pharmacophore fit score), тобто ті молекули, що за своїми структурними характеристиками найбільш точно відповідають просторовій будові фармакофорної моделі. До цих характеристик належать такі хімічні функціонали: акцептори водневих зв'язків (HBAs), донори водневих зв'язків (HBDs), гідрофобні ділянки (Hs), ароматичні кільця (ARs), позитивно/негативно іонізуючі групи (PIs/NI) та виключений простір (XVOL) – простір, не доступний ліганду за стеричними обмеженнями [25]. Після цього було проведено молекулярне стикування активного центру ферменту з референтним лігандом **PRD_002214** та 18-ма лігандами, що було відібрано серед відомих противірусних та антималарійних агентів. Результати

моделювання взаємодії «ліганд–рецептор» для 18 досліджених сполук та референтного ліганду наведено у таблиці 1. Енергія зв'язування (BE, Binding Energy, ккал/моль) є важливим параметром, що характеризує міцність зв'язування ліганду з відповідним білком. З енергетичної точки зору найнижче значення BE відповідає найефективнішому зв'язуванню ліганду з рецептором. Інтерпретація іншого параметра – показника спорідненості (BAS, Binding Affinity Score) є дещо складнішою у порівнянні з BE, оскільки також включає ентропійні фактори. В цілому обидва параметри (BE та BAS) характеризують різні аспекти зв'язування в системі «білок–ліганд» (таблиця 1).

Як видно з таблиці 1, цілий ряд відомих протівірусних лікарських засобів характеризується помітно високими величинами загальної енергії зв'язування ліганду з ферментом. Серед досліджених лігандів лише дві сполуки характеризувалися більш високою, ніж референтний ліганд **PRD_002214**, енергією зв'язування з ферментом M^{pro} , а саме, ремдесивір та ритонавір. З іншого боку, розрахунки ліпофільності та топологічного індексу площі поверхні полярних груп (TPSA) за допомогою програми LigandScout вказують на порушення «правила п'яти» Ліпінського для деяких сполук. Привертають увагу високі розрахункові значення коефіцієнту ліпофільності (clogP) для сполук **FGI-104**, **FGI-106**, ритонавіру та значення TPSA для сполуки **FGI-103**, занамавіру, ремдесивіру, ритонавіру та референтного ліганду **PRD_002214**. Ці дані могли б вказувати на їх низьку біодоступність, але треба враховувати, що зазначені лікарські засоби вже успішно використовуються як ефективні протівірусні агенти. Слід також зауважити, що теоретичні розрахунки показника ліпофільності надто чутливі до способу їх розрахунку. Добре відомо, що при використанні різних комп'ютерних програм для розрахунку clogP часом відмічаються дуже значні розходження в оцінках ліпофільності. Інший момент, який слід враховувати при розрахунках коефіцієнту ліпофільності, пов'язаний із можливою іонізацією системи в водному середовищі, що також потребує певної корекції – зменшення розрахованого значення clogP і відповідного збільшення водорозчинності досліджуваної речовини.

Порівнюючи характеристики потенційних інгібіторів головної протеази M^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2, слід окремо зупинитися на специфічних властивостях референтного ліганду комплексу 6LU7 (рис. 4). Зазначений ліганд **PRD_002214** є пептидною молекулою, що характеризується доволі протяжною будовою. Це пов'язано з тим, що відповідний сайт зв'язування вірусної протеази M^{pro} також характеризується значними розмірами. На відміну від **PRD_002214** відомі протівірусні та антималярійні

Таблиця 1

Основні характеристики молекулярного докінгу відомих сполук, що проявляють виражену протівірусну активність

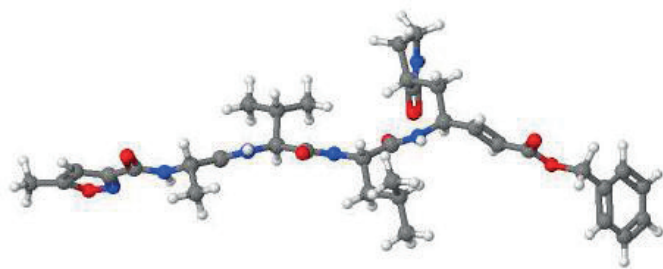
Ліганд	BAS	BE (ккал/моль)	cLogP	TPSA (Å ²)
PRD_002214 (ліганд 6LU7)	-13	-21,6	1,57	197,8
Фавіпіравір	-13	-8,1	-0,81	89,1
FGI-103	-16,6	-16,7	3,05	141,6
FGI-104	-23,2	-18,9	5,78	77,9
FGI-106	-6,9	-20,4	5,28	56,3
LJ-001	-21,1	-16,6	3,63	35,1
Озельтамівір	-17,6	-12,4	1,29	90,7
Занамівір	-13,3	-11,8	-3,79	200,7
Ремдесивір	-20,6	-24,8	2,03	203,6
Ритонавір	-23,8	-22,9	5,34	145,8
Лопінавір	-20,7	-20,0	4,33	120
Тафенуквін	-14,5	-18,5	4,37	81,5
Піронаридин	-13,1	-19,8	4,53	76,7
Дасабувір	-17,1	-19,8	5,0	110,3
Ципаргамін	-13,3	-17,0	3,88	56,9
Долутегравір	-14,1	-17,0	0,32	100,9
Абакавір	-16,8	-16,4	1,03	101,9
Хінін	-20,9	-16,0	2,89	45,5
Примахін	-17,4	-16,0	2,78	60,2

лікарські засоби, що було відібрано за результатами віртуального скринінгу, є порівняно невеликими молекулами. З огляду на суттєві розбіжності у розмірах невеликі ліганди мають певні геометричні ступені свободи, тобто вони можуть розташовуватись різними способами у різноманітних конформаціях у межах сайту зв'язування ферменту. На відміну від цих очікувань результати наших розрахунків вказують на те, що для сполук зі значним зв'язуванням «ліганд–білок» характерними є як певна конформація ліганду, так і його позиція в сайті зв'язування вірусної протеази M^{pro} (рис. 4). Як видно з рис. 4, сайт зв'язування **PRD_002214** з ферментом M^{pro} є подібним до сайтів зв'язування низки найбільш ефективних лігандів, що було обрано нами за результатами віртуального скринінгу.

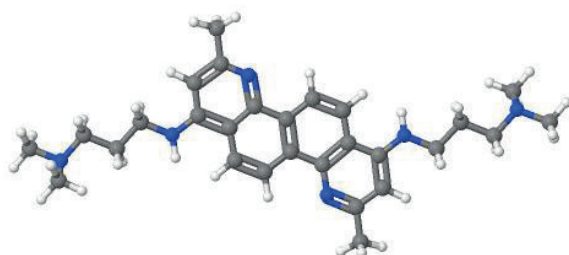
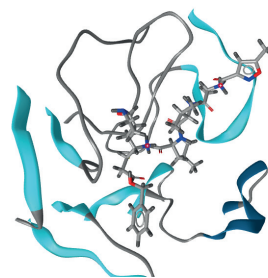
Таким чином, розраховані нами показники, що характеризують фізико-хімічні властивості відомих протівірусних агентів та визначення сайтів їх зв'язування з головною протеазою коронавірусу M^{pro} , дозволяють надати вельми оптимістичну оцінку можливості створення ефективних лікарських засобів на основі відомих протівірусних препаратів або їх модифікованих аналогів.

При проведенні дослідження ми також звернули увагу на нещодавно опубліковані дані щодо успішного використання деяких відомих анти-

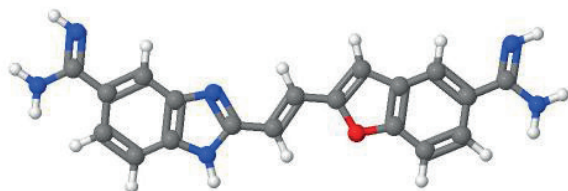
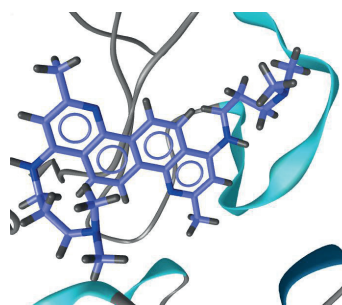
Референтна молекула PRD_002214



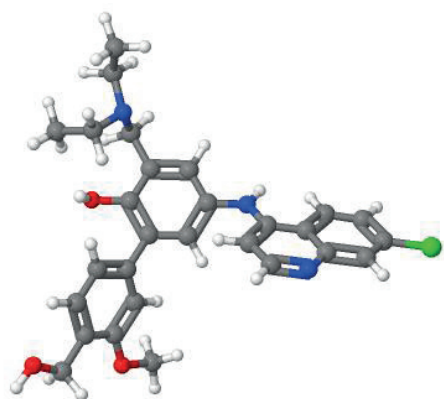
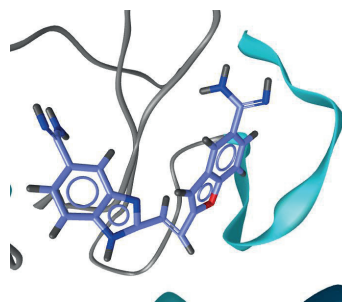
FGI-106



FGI-103



FGI-104



LJ-001

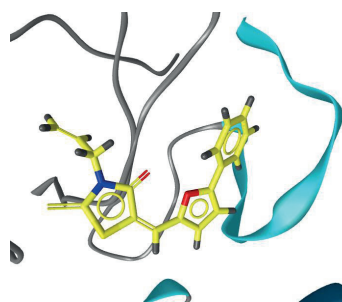
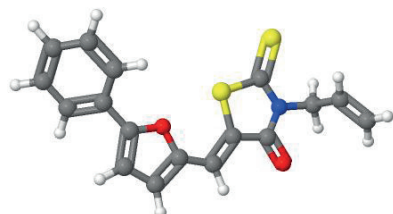
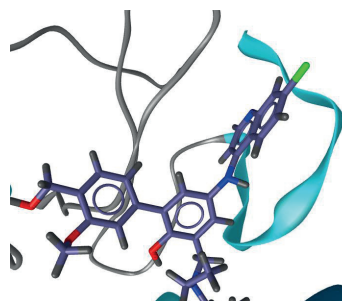


Рис. 4. Структура деяких відомих протівірусних агентів, які характеризуються високими рівнями загальної енергії зв'язування ліганду з ферментом та будовою їх комплексу «ліганд–білок» з M^{pro}

малярійних лікарських засобів, таких як хлорохін для лікування COVID-19 [24]. Враховуючи те, що у бібліотеці речовин, які були синтезовані нами раніше, присутні сполуки з суттєвою антималярійною активністю, визначеною в експериментах *in vitro*, було проведено віртуальний скринінг та

молекулярний докінг цих сполук для визначення можливості їх використання як протівірусних агентів для боротьби з COVID-19.

В основу наступної частини розрахунків було покладено наші попередні дослідження, які стосувалися пошуку нових потенційних антимікроб-

Таблиця 2

Референтні препарати панелей для скринінгу та їх інгібуюча активність

Скринінгова панель	Валідація референтними препаратами	
	Препарат порівняння	IC ₅₀ (мкМ)
MRC-5	Тамоксифен	10,29
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Бензнідазол	3,17
<i>Leishmania infantum</i>	Фунгізон	1,35
<i>Trypanosoma brucei</i>	Сурамін	0,05
<i>Plasmodium falciparum</i>	Хлорохін	0,02

них агентів серед віртуальних та реально синтезованих бібліотек нових гетероциклічних сполук [26–28]. Скринінг синтезованих нами речовин було виконано колегами з Антверпенського університету (Бельгія). Дослідницька група Лабораторії мікробіології, паразитології та гігієни провела *in vitro* дослідження антипротозойної активності бібліотеки з 50 попередньо відібраних сполук. *In vitro* дослідження полягали у визначенні інгібуючої концентрації IC₅₀ проти таких паразитів: внутрішньоклітинні форми штаму *P. falciparum* 2/К червоних кров'яних клітин людини (малярія), внутрішньоклітинні амастиготи *T. cruzi* Tulahuen CL2 штаму бета-галактозидази (хвороба Шагаса), внутрішньоклітинні амастиготи *L. infantum* МНОМ/МА(ВЕ)/67 (лейшманіоз), кров'яні форми штаму *T. brucei* Squib 427 (людський африканський трипаномоз) [29]. Однією з важливих частин скринінгу була оцінка всіх сполук на цитотоксичність за допомогою лінії диплоїдних клітин людини MRC-5, отриманих з ембріональних фібробластів легенів. Для всіх випробувань як контроль використовували відповідні референтні препарати з встановленими 50% інгібуючими концентраціями (IC₅₀), які наведено у таблиці 2. Визначений цитотоксичний потенціал сполук дозволив розрахувати індекс селективності (і.с.) – відношення 50% цитотоксичної концентрації (CC₅₀) до 50% інгібуючої антимікробної концентрації (IC₅₀), значення якого було ≥ 4 .

Для визначення показників IC₅₀ та CC₅₀ тестування досліджуваних сполук проводили у 5 концентраціях (64, 16, 4, 1 та 0,25 мг/мл). Концентрація ДМСО у тестовому середовищі не перевищувала 0,5%.

За результатами біологічного скринінгу 50 синтезованих сполук з 10 різних скафолдів було відібрано 14 активних молекул з вираженою здатністю інгібувати збудник малярії *P. falciparum* (таблиця 3). Три сполуки-лідери показали найбільшу активність з IC₅₀ = 0,25, 0,49 та 0,82 мкМ та індексом селективності 6, 5 та 5. Найактивніша з цих сполук – 4-бензил-1-{4-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-4-оксобутил}-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]хіназолін-5(4*H*)-он (IC₅₀ = 0,25; і.с. = 6) є представником ряду похідних [1,2,4]триазоло[4,3-*a*]хіназолін-5(4*H*)-онів, синтез та біологічну активність яких було описано нами раніше [30]. IC₅₀ 11 менш активних сполук знаходились у межах від 2,24 до 4,98 мкМ, їх і.с. складав 3–4.

Базуючись на отриманих результатах та даних про те, що антималярійні сполуки також проявляють активність проти вірусу SARS-CoV-2 [24], нами було проведено віртуальний скринінг та молекулярний докінг всіх відібраних для біологічного тестування сполук. Результати комп'ютерного моделювання виявили доволі високий проти-

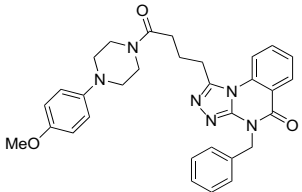
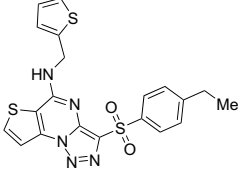
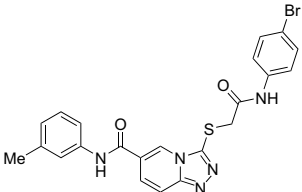
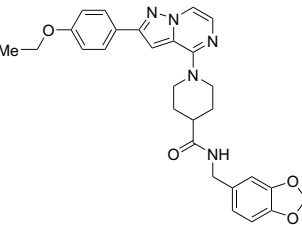
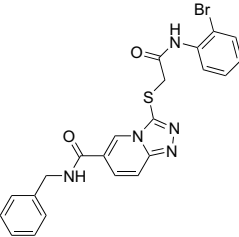
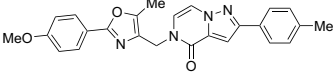
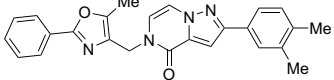
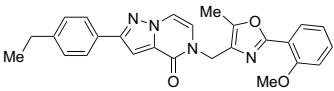
коронавірусний потенціал для 6 речовин. Характеристики зв'язування та фізико-хімічні параметри зазначених лігандів під номерами **L1–L6** наведено у таблиці 4. Серед них найбільш перспективною виявилась сполука 2-(4-(2-окспіролідін-1-іл)-бензил)-8-(3-феніл-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]піридин-3(2*H*)-он **L1** із ряду похідних [1,2,4]триазоло[4,3-*a*]піридину. Зазначена сполука є однією з трьох найактивніших антималярійних сполук-хітів з IC₅₀ = 0,49 мкМ (сполука під №13 у таблиці 3). За результатами молекулярного докінгу похідне **L1** характеризується найвищим показником спорідненості до ферменту –25,9 та доволі високою енергією зв'язування з M^{pro} –18,5 ккал/моль, а показники clog*P* та TPSA відповідають «правилу п'яти» Ліпінського. Необхідно відзначити, що показник енергії зв'язування з ферментом M^{pro} для сполук **L4** та **L6** помітно вищий ніж для референтного ліганду. В цілому всі 6 досліджених сполук (**L1–L6**) можна віднести до потенційних інгібіторів головної протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2 і вони є перспективними сполуками-кандидатами для подальших досліджень.

На рис. 5 наведено комплекси «ліганд–білок» потенційних інгібіторів M^{pro}. Двовимірні структурні формули лігандів зліва демонструють відповідність будови ліганду згенерованому фармакофору. Гідрофобні взаємодії позначено жовтими лініями, а донори та акцептори водневих зв'язків – зеленими та червоними пунктирними лініями відповідно. Тривимірний рисунок праворуч зображує позицію ліганду у так званій «кишені» зв'язування з фармакофором (головною протеазою M^{pro} вірусу SARS-CoV-2).

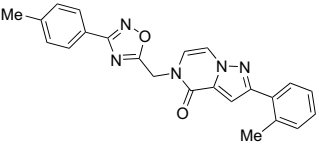
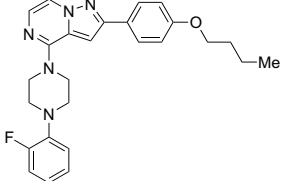
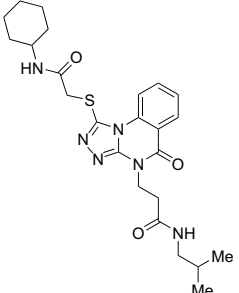
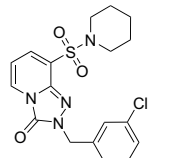
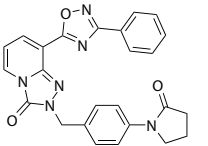
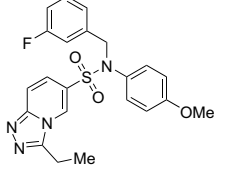
Позначення міжмолекулярних взаємодій певних функціональних груп ліганду та білкового рецептора (фармакофора) є джерелом важливої інформації стосовно функцій білків та ролі лігандів у молекулярній біології. Отримана інформація щодо загальної енергії зв'язування та місць зв'язування з окремими амінокислотами дає мож-

Таблиця 3

Результати досліджень антипаразитарної активності найбільш активних синтезованих сполук проти збудника малярії

№	Структура сполуки	MRC-5 IC _{50r} мкМ	<i>P. falciparum</i>	
			IC _{50r} мкМ	i.c.
1	2	3	4	5
1		> 64,00	0,25	6
2		> 64,00	2,95	4
3		> 64,00	3,28	4
4		> 64,00	2,49	4
5		> 64,00	2,67	4
6		> 64,00	2,90	4
7		> 64,00	2,54	4
8		39,32	2,95	4

Продовження табл. 3

9		> 64,00	3,12	4
10		27,76	0,82	5
11		> 64,00	4,88	3
12		> 64,00	2,24	4
13		> 64,00	0,49	5
14		18,19	4,98	3

Таблиця 4

Характеристики зв'язування та фізико-хімічні параметри лігандів L1–L6

Ліганд	BAS	BE (ккал/моль)	clogP	TPSA (Å ²)
L1	-25,9	-18,5	3,14	100,2
L2	-19,1	-21,0	5,33	93,7
L3	-22,8	-20,6	1,68	123,5
L4	-16,4	-22,2	2,75	110,4
L5	-11,8	-18,4	2,67	128,9
L6	-18,6	-23,43	4,12	88,1

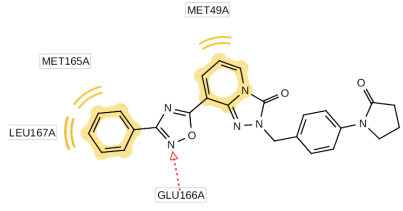
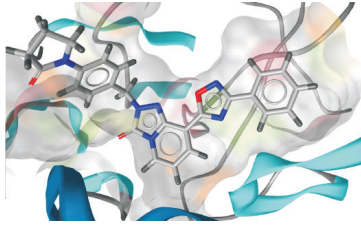
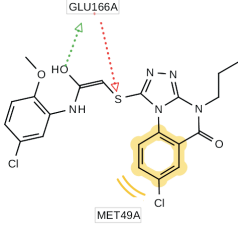
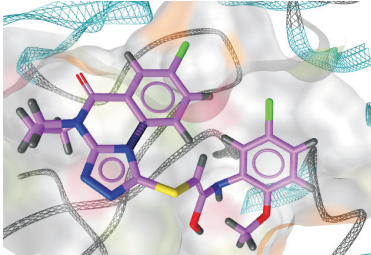
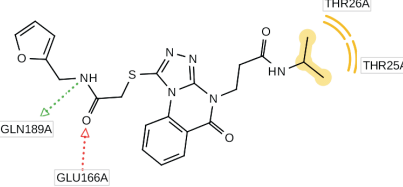
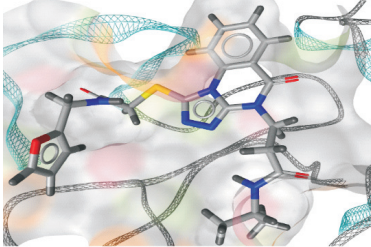
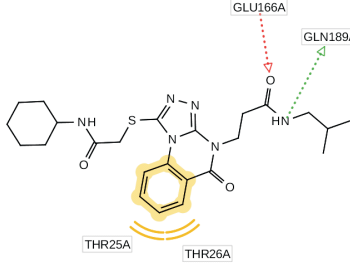
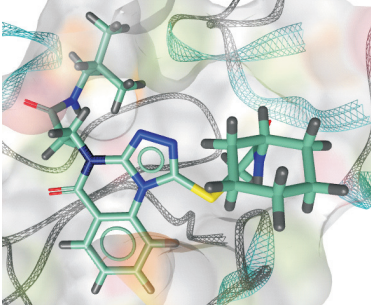
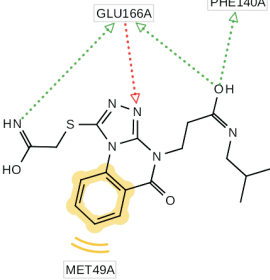
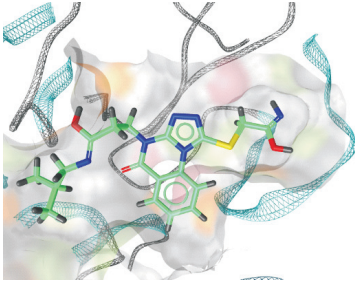
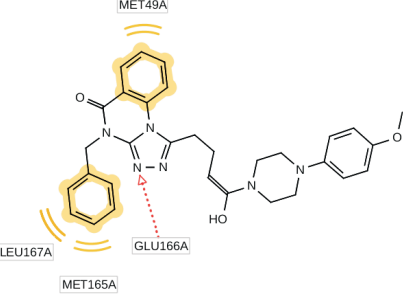
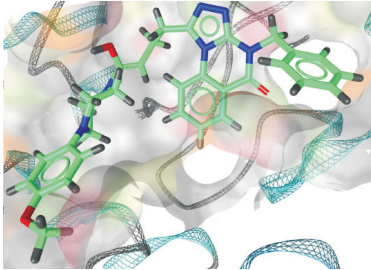
Ліганд	Структура	Розраховані конфігурації
L1		
L2		
L3		
L4		
L5		
L6		

Рис. 5. Нові синтезовані антималярійні агенти, що виявили значне зв'язування з білком 6LU7

ливість детального опису механізму дії відомих фармакологічно активних речовин та подальшого конструювання структур з прогнозованою біологічною активністю [31].

Висновки

Отримані результати віртуального скринінгу та молекулярного докінгу потенційних інгібіторів головної протеази коронавірусу SARS-CoV-2 в комплексі з уже існуючими даними про кристалічну будову цього ферменту, який відіграє одну з ключових ролей у репродукції коронавірусу, можуть служити базою для подальшого пошуку та розробки лікарських засобів для лікування COVID-19. На підставі розробленої моделі та виконаних нами розрахунків вдалося продемонструвати, що ряд вже відомих противірусних препа-

ратів може розглядатися як потенційні інгібітори головної коронавірусної протеази. При цьому розрахунки показників взаємодії у комплексі «ліганд–білок» для таких противірусних препаратів як ремдесивір та ритонавір свідчать про їх більш високу інгібіторну активність у порівнянні з референтною сполукою з комплексу 6LU7. Молекулярний докінг ряду нових, нещодавно синтезованих сполук з доведеною в експериментах *in vitro* антималярійною активністю також дозволив спрогнозувати для них *in silico* протикоронавірусну активність. Відібрані за результатами цієї роботи сполуки **L1–L6** слід розглядати як базові структури для подальшої модифікації та розробки перспективних сполук-кандидатів для створення противірусних лікарських засобів.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Перелік використаних джерел інформації

- Xu, J.; Zhao, S.; Teng, T.; Abdalla, A. E.; Zhu, W.; Xie, L.; Wang, Y.; Guo, X. Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses* **2020**, *12*, 244. <https://doi.org/10.3390/v12020244>.
- Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> (accessed 5 May 2020).
- Liu, C.; Zhou, Q.; Li, Y.; Garner, L. V.; Watkins, S. P.; Carter, L. J.; Smoot, J.; Gregg, A. C.; Daniels, A. D.; Jervey, S.; Albaiu, D. Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6* (3), 315–331. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00272>.
- Fan, Y.; Zhao, K.; Shi, Z.-L.; Zhou, P. Bat Coronaviruses in China. *Viruses* **2019**, *11*, 210. <https://doi.org/10.3390/v11030210>.
- Jin, Z.; Du, X.; Xu, Y.; Deng, Y.; Liu, M.; Zhao, Y.; Zhang, B.; Li, X.; Zhang, L.; Peng, C.; Duan, Y.; Yu, J.; Wang, L.; Yang, K.; Liu, F.; Jiang, R.; Yang, X.; You, T.; Liu, X.; Yang, X.; Bai, F.; Liu, H.; Liu, X.; Guddat, L. W.; Xu, W.; Xiao, G.; Qin, C.; Shi, Z.; Jiang, H.; Rao, Z.; Yang, H. Structure of M^{pro} from COVID-19 virus and discovery of its inhibitors. *Nature* **2020**, *582*, 289–293. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>.
- Агеева, Л. В. Рецепторы ангиотензина II в регуляции дифференцировки и секреторной активности мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека. Диссертация канд. биол. наук, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, 2019.
- Dinh, D. T.; Frauman, A. G.; Johnston, C. I.; Fabiani, M. E. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clinical Science* **2001**, *100* (5), 481–492. <https://doi.org/10.1042/cs1000481>.
- Su, Y. C.; Anderson, D. E.; Young, B. E.; Zhu, F.; Linster, M.; Kalimuddin, S.; Low, J. G.; Yan, Z.; Jayakumar, J.; Sun, L.; Yan, G. Z.; Mendenhall, I. H.; Leo, Y.-S.; Lye, D. C.; Wang, L.-F.; Smith, G. J. Discovery of a 382-nt deletion during the early evolution of SARS-CoV-2. *bioRxiv* **2020**, 2020.03.11.987222. <https://doi.org/10.1101/2020.03.11.987222>.
- COVID-19: Finding the Right Fit. https://drugbank.s3-us-west-2.amazonaws.com/assets/blog/COVID-19_Web.pdf (accessed 7 May 2020).
- Odynets, K. A.; Kornelyuk, A. I. Molecular aspects of organization and expression of SARS-CoV coronavirus genome. *Biopolym. Cell* **2003**, *19* (5), 414–431. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00066F>.
- Zhang, L.; Lin, D.; Sun, X.; Curth, U.; Drosten, C.; Sauerherring, L.; Becker, S.; Rox, K.; Hilgenfeld, R. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science* **2020**, *368* (6489), 409–412. <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>.
- Zhang, L.; Lin, D.; Hilgenfeld, R. Crystal structure of the complex resulting from the reaction between the SARS-CoV main protease and tert-butyl (1-((S)-3-cyclohexyl-1-(((S)-4-(cyclopropylamino)-3,4-dioxo-1-((S)-2-oxopyrrolidin-3-yl)butan-2-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)carbamate. *PDB ID 6Y7M* **2020**. <http://dx.doi.org/10.2210/pdb6Y7M/pdb>.
- Khaerunnisa, S.; Kurniawan, H.; Awaluddin, R.; Suhartati, S.; Soetjipto, S. Potential Inhibitor of COVID-19 Main Protease (M^{pro}) From Several Medicinal Plant Compounds by Molecular Docking Study. *Preprints* **2020**, 2020030226. <https://doi.org/10.20944/preprints202003.0226.v1>.
- Alamri, M. A.; Tahir ul Qamar, M.; Alqahtani, S. M. Pharmacoinformatics and Molecular Dynamic Simulation Studies Reveal Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease 3CL^{pro}. *Preprints* **2020**, 2020020308. <https://doi.org/10.20944/preprints202002.0308.v1>.
- Berman, H.; Henrick, K.; Nakamura, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Str. Biol.* **2003**, *10* (12), 980–980. <https://doi.org/10.1038/nsb1203-980>.
- Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D*; <http://www.jmol.org/>.
- DeLano, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography* **2002**, *40*, 82–92.
- Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool*, 1.XX; <http://avogadro.cc/>.
- Wolber, G.; Dornhofer, A. A.; Langer, T. Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2006**, *20* (12), 773–788. <https://doi.org/10.1007/s10822-006-9078-7>.
- Rutkowska, E.; Pajak, K.; Józwiak, K. Lipophilicity – methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Pol. Pharm.* **2013**, *70* (1), 3–18.
- Clark, D. E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of intestinal absorption. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88* (8), 807–814. <https://doi.org/10.1021/js9804011>.
- Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46* (1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).
- Giordanetto, F.; Kihlberg, J. Macrocyclic Drugs and Clinical Candidates: What Can Medicinal Chemists Learn from Their Properties? *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (2), 278–295. <https://doi.org/10.1021/jm400887j>.
- Chang, R.; Sun, W. Repositioning Chloroquine as Ideal Antiviral Prophylactic against COVID-19 – Time is Now. *Preprints* **2020**, 2020030279. <https://doi.org/10.20944/preprints202003.0279.v1>.
- Karpina, V. R.; Kovalenko, S. M.; Zaremba, O. V.; Silin, O. V.; Ivanov, V. V.; Kovalenko, S. S.; Langer, T. The search for potential inhibitors of protein kinase Pim-1 among new amides of 1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridine-3-metanamin with the 1,2,4-oxadiazole cycle in position 7 and 8. *J. Org. Pharm. Chem.* **2019**, *17* (3(67)), 5–14. <https://doi.org/10.24959/ophcj.19.174807>.

26. Nechayev, M. A.; Gorobets, N. Y.; Shishkina, S. V.; Shishkin, O. V.; Kovalenko, S. M. Microwave-assisted acid-catalyzed nucleophilic heteroaromatic substitution: the synthesis of 7-amino-6-azaindoles. *Tetrahedron* **2015**, *71* (8), 1311–1321. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.12.057>.
27. Zarembo, O. V.; Gorobets, N. Y.; Kovalenko, S. S.; Drushlyak, O. G.; Grevtsov, O. Y.; Kovalenko, S. M. Facile one-pot synthesis of the pyrazolo[1,5-*a*]-pyrazine scaffold. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2013**, *49* (6), 915–921. <https://doi.org/10.1007/s10593-013-1326-x>.
28. Nechayev, M. A.; Gorobets, N. Y.; Borisov, A. V.; Kovalenko, S. M.; Tolmachev, A. A. The synthesis of low molecular weight pyrrolo[2,3-*c*]pyridine-7-one scaffold. *Mol. Diversity* **2012**, *16* (4), 749–757. <https://doi.org/10.1007/s11030-012-9410-1>.
29. Nwaka, S.; Ramirez, B.; Brun, R.; Maes, L.; Douglas, F.; Ridley, R. Advancing Drug Innovation for Neglected Diseases – Criteria for Lead Progression. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2009**, *3* (8), e440. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000440>.
30. Danylchenko, S. Y.; Kovalenko, S. S.; Drushlyak, O. G.; Kovalenko, S. M.; Maes, L. [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinazolin-5-one derivatives as antimalarial agents. *Ukr. Biopharm. J.* **2016**, *1* (42), 78–83. <https://doi.org/10.24959/ubphj.16.16>.
31. Warren, G. L.; Andrews, C. W.; Capelli, A.-M.; Clarke, B.; LaLonde, J.; Lambert, M. H.; Lindvall, M.; Nevins, N.; Semus, S. F.; Senger, S.; Tedesco, G.; Wall, I. D.; Woolven, J. M.; Peishoff, C. E.; Head, M. S. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (20), 5912–5931. <https://doi.org/10.1021/jm050362n>.

Received: 02. 04. 2020

Revised: 23. 05. 2020

Accepted: 29. 05. 2020