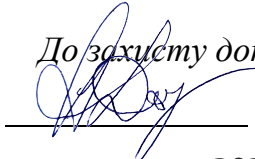


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. Каразіна

Кафедра органічної хімії

УДК 54.057:547.83:547.792

До захисту допускаю

Завідувач кафедри
«__» _____ 2024 р. д.х.н., проф. А. О. Дорошенко

**КОМП'ЮТЕРНИЙ ДИЗАЙН НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ГОЛОВНОЇ ПРОТЕАЗИ
КОРОНАВІРУСУ SARS-COV-2 НА ОСНОВІ АЛГОРИТМІВ ЕВОЛЮЦІЙНОЇ
ОПТИМІЗАЦІЇ ПРОТИВІРУСНОГО ПРЕПАРАТУ ЕНСІТРЕЛВІРУ**

Кваліфікаційна робота
магістра 2 курсу
хімічного факультету
СВЯТЕНКО Анастасії Сергіївни

Науковий керівник:
д.х.н., с.н.с.



О.В. Кириченко

ХАРКІВ 2024

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота складається з 57 сторінок, 17 рисунків, 3 таблиць, 139 літературних посилань.

Об'єкти дослідження – віртуальна еволюційна бібліотека з 6334 нових молекул, згенерованих на основі клінічно-затвердженого противірусного препарату енсїтрелвіру, та її сполуки-лідери, що мають високу інгібуючу активність по відношенню до головної протеази коронавірусу SARS-CoV-2.

Мета дослідження – вивчення нековалентної взаємодії ліганд-білок для віртуальної еволюційної бібліотеки, згенерованої на основі препарату енсїтрелвіру, та сполуки-лідери з кращою спорідненістю до головної протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2.

Методи дослідження – комп'ютерна квантова хімія та молекулярний докінг.

Проведено дослідження нековалентного зв'язування лігандів з віртуальної еволюційної бібліотеки, згенерованої на основі препарату енсїтрелвіру, та її сполук-лідерів за допомогою методу молекулярного докінгу з метою вивчення їх активності щодо інгібування головної протеази коронавірусу SARS-CoV-2. Програмний пакет LigandScout застосовано для проведення молекулярного докінгу для 41 лігандів-лідерів. Результати докінгу показали, що 10 з 41 сполук-лідерів мають спорідненість до M^{pro}, кращу за оригінальний інгібітор енсїтрелвір.

Результати дослідження відкривають нові перспективи для розробки активних інгібіторів головної протеази M^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2.

Ключові слова: дизайн ліків, цистеїнова протеаза, M^{pro}, коронавірус, COVID-19, інгібітор, молекулярний докінг.

ABSTRACT

The MSc diploma thesis consists of 57 pages, 17 figures, 3 tables, 139 references.

The objects of the study – a virtual evolutionary library of 6,334 new molecules, generated on the basis of the clinically approved antiviral drug ensitrelvir, and its leader compounds, which have high inhibitory activity against the main protease of the SARS-CoV-2 coronavirus.

The aim of the research – to study the non-covalent ligand-protein interaction for a virtual evolutionary library, generated on the basis of the drug ensitrelvir, and the leader compounds with better affinity to the main M^{pro} protease of the SARS-CoV-2 virus.

Research methods – computational quantum chemistry and molecular docking.

A study of non-covalent binding of ligands from a virtual evolutionary library generated on the basis of the drug ensitrelvir and its leader compounds was carried out using the molecular docking method in order to study their activity in inhibiting the main protease of the SARS-CoV-2 coronavirus. The LigandScout software package was used to perform molecular docking for 41 lead ligands. Docking results show that 10 out of 41 leader compounds have an affinity for M^{pro} that is better than the original inhibitor ensitrelvir.

The results of the study have new prospects for the development of active inhibitors of the main M^{pro} protease of the SARS-CoV-2 coronavirus.

Keywords: drug design, cysteine protease, M^{pro}, coronavirus, COVID-19, inhibitor, molecular docking.

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1 Проблематика коронавірусної хвороби COVID-19	8
1.2 Інгібітори головної протеази SARS-CoV-2	10
1.3 Енсітрелвір	22
1.4 Комп'ютерні методи пошуку нових препаратів	26
2. РОЗРАХУНКОВА ЧАСТИНА	23
2.1 Генерація віртуальної еволюційної бібліотеки енсітрелвіру	31
2.2 3D Фармакофорний скринінг	34
2.3 Пошук сполук-лідерів серед еволюційної бібліотеки	35
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

M ^{pro}	main protease, головна хімотрипсин-подібна протеаза вірусу SARS-CoV-2;
<i>in vitro</i>	дослідження у пробірці;
<i>in vivo</i>	дослідження у природних умовах, у клітині;
ADT	AutoDock Tools;
COVID-19	англ. Coronavirus Disease 2019; коронавірусна хвороба 2019, КОВІД-19
SARS-CoV-2	англ. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2; коронавірус 2, пов'язаний з тяжким гострим респіраторним синдромом
FDA	англ. U.S. Food and Drug Administration; Управління з контролю за продуктами і ліками США

ВСТУП

Конструювання та розробка нових ліків за допомогою комп'ютера – це новітня потужна техніка. У наші дні технологія автоматизованого проектування лікарських препаратів використовується в фармацевтичній хімії, нанотехнології, молекулярній біології, та біохімії. Економічна ефективність є основною перевагою комп'ютерної розробки ліків.

Традиційний підхід до розробки лікарських засобів має два серйозні недоліки: довгий процес розробки і висока вартість випробувань в лабораторії. Більше 20 років можна витратити на розробку одного лікарського засобу. Доклінічні випробування в лабораторії займають велику частину часу. Скоротити час розробки в разі допомагає комп'ютерна розробка ліків за рахунок зменшення кількості випробувань в лабораторії і заміні їх на більш швидкі методи з використанням комп'ютера. Заміна експерименту на комп'ютерні обчислення значно зменшує вартість розробки нових лікарських засобів. Віртуальний скринінг є одним з основних методів комп'ютерного конструювання ліків.

Віртуальний скринінг (VS, *in silico* screening) – це обчислювальна техніка, яка використовується при розробці ліків для пошуку в бібліотеках малих молекул з метою виявлення тих структур, які з найбільшою ймовірністю зв'язуються з білком-мішенню, зазвичай з ферментами або білковими рецепторами. Для хіміків завжди є проблема визначення, які нові сполуки синтезувати. На кожному кроці процесу проектування, від відкриття вихідної базової сполуки до вибору кандидата на розробку, хімік повинен зробити вибір з тисяч можливих молекул. Набагато ширший діапазон можливостей пропонують нові технології, такі як високопродуктивний скринінг. При такому підході експериментальний синтез мільйонів нових речовин стає необґрунтованим і список перспективних сполук звужується до декількох десятків.

У даній роботі було використано віртуальний скринінг, заснований на знаннях про відомі фармацевтичні препарати. На основі структури ліганду, який зв'язується з головною протеазою коронавірусу SARS-CoV-2, була побудована фармакофорна модель. Порівняння ліганд-кандидата з фармакофорною моделлю дозволяє визначити його сумісність з рецептором і, отже, чи здатний він до зв'язування. Таким чином,

використаний нами популярний підхід до віртуального скринінгу на основі лігандів ґрунтується на пошуку молекул, форма яких аналогічна формі відомих активних сполук, оскільки такі молекули будуть, ймовірно, зв'язуватися з мішенню завдяки відповідності їх структури сайту зв'язування мішені.

1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Проблематика коронавірусної хвороби COVID-19

Важкий гострий респіраторний синдром (SARS), що спалахнув наприкінці 2019 року, призвів до глобальної епідемії, яка була визнана Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) пандемією 11 березня 2020 року [1]. Пандемія коронавірусної хвороби 2019 (COVID-19) залишила незворотний слід у світі (понад 18 мільйонів смертей) і дестабілізувала світову економіку, що впливає на нас і сьогодні [2]. Швидке впровадження вакцинації ефективно знижує ризик тяжкого перебігу захворювання [3,4]. COVID-19, спричинений дуже заразним і мінливим важким гострим респіраторним синдромом коронавірус 2 (SARSCoV-2), отримав свій Omicron варіант витіснивши варіант Дельта, згодом мутуючи в різні нові штами. Ця еволюція створює значні проблеми для систем охорони здоров'я та інфраструктури громадського здоров'я [5–7]. Загальна статистика показує, що вакцинація не створює стійкого імунітету проти вірусу SARS-CoV-2. Незважаючи на перехід спалаху COVID-19 до більш нормалізованої фази, поточні дослідження інгібіторів залишаються вирішальними для превентивної профілактики майбутніх пандемій коронавірусу [8, 9].

ВООЗ розробляє довгострокові постійні рекомендації для країн щодо того, як боротися з COVID-19 на постійній основі [9, 10]). Враховуючи безперервну еволюцію вірусу, наразі під егідою ВООЗ у світі проводиться регулярне спостереження, яке полягає у виявленні та моніторингу нових варіантів SARS-CoV-2. Поява варіантів, які створюють підвищений ризик для глобальної системи охорони здоров'я, спонукала ВООЗ визначити конкретні варіанти вірусу як ті, що представляють інтерес і варіанти, що викликають занепокоєння, щоб встановити пріоритети для прийняття рішень про те, чи слід оновлювати, підтримувати або посилювати вакцинування у відповідь на збільшення присутності певного варіанту вірусу SARS-CoV-2 [9, 11]. Основною проблемою вакцин є безперервна мутація SARS-CoV-2. Більшість РНК-вірусів розвиваються швидко. Продовжують швидко з'являтися варіанти SARS-CoV-2 з різними фенотипічними характеристиками, включаючи здатність до передачі, тяжкість та ухилення від імунітету. Варіант Omicron, виявлений наприкінці листопада 2021 року, ознаменував початок нової фази пандемії [12, 13]. Він менш вірулентний, але більш передається, ніж попередні

варіанти SARS-CoV-2 [14]. На відміну від оригінального вірусу SARS-CoV-2, який інфікував бронхіальні і легеневі клітини, Omicron віддає перевагу реплікації в носоглотці [6]. SARS-CoV-2, як і інші РНК-віруси, демонструє значний ступінь антигенної еволюції, що відкриває достатню ймовірність повторних інфекцій. Omicron, наприклад, має набагато більшу здатність викликати повторне зараження, ніж будь-який із попередніх варіантів. Вивчаючи поточні тенденції щодо варіантів Omicron, передбачаються нові хвилі зараження кожні додаткові приблизно чотири місяці циркуляції вірусу, і в майбутньому SARS-CoV-2 матиме більш регулярну схему захворюваності, як сезонний грип [6]. З появою нових варіантів SARSCoV-2, які ухиляються від імунної відповіді, вакцини, розроблені проти вірусу, можуть стати менш активними [13]. Це означає, що питання необхідності розробки ліків проти COVID-19 продовжує залишатися актуальним. Важливість появи нових терапевтичних препаратів проти коронавірусної хвороби очевидна [15].

COVID-19, респіраторне захворювання, поширюється SARSCoV-2, позитивним одноланцюговим РНК-вірусом [16]. Цей вірус складається зі структурних білків, включаючи білок нуклеокапсиду (N), спайковий білок (S), білок оболонки (E) і мембранний глікопротеїн (M), а також геном РНК. Він разом із SARS-CoV, HCoV-OC43, HCoVHKU1 і MERS-CoV є частиною роду β -коронавірусу [17]. Геном SARS-CoV-2 кодує два поліпротеїни, pp1a та pp1ab, а також чотири структурні білки. Цикл реплікації SARS-CoV-2 включає кілька етапів, починаючи з потрапляння вірусу в клітини-господарі, за яким слідує реплікація геному, синтез білка, збирання нових вірусних частинок і, нарешті, вивільнення з клітини-господаря для інфікування інших клітин. Спочатку S-білок вірусу зв'язується з рецептором ангіотензинперетворюючого ферменту 2 (ACE2) на клітинах господаря або проникає безпосередньо через цитоз, вивільняючи вірусну РНК. Згодом трансмембранна серин-протеаза 2 господаря (TMPRSS2) зливається з вірусним білком S, полегшуючи входження та вивільнення РНК у клітину-хазяїна. Реплікація та збірка вірусу відбувається за допомогою неструктурних протеаз, таких як папаїноподібна протеаза PLpro (nsp3), головна протеаза Mpro (nsp5) і РНК-залежна РНК-полімераза RdRp (nsp12) [12-14]. Поліпротеїни pp1a та pp1ab піддаються розщепленню важливою основною протеазою SARS-CoV-2 (протеазою Mpro або 3CL) в 11 специфічних сайтах, що призводить до більш коротких неструктурних

білків (nsps), вирішальних для реплікації вірусу, головним чином організовуючи синтез субгеномної РНК, вирішальної для виробництва клітиною-хазяїном вірусних структурних білків, таких як оболонка, мембрана, спайк і нуклеокапсид. Крім того, nsps мають вирішальне значення для пригнічення протівірусної відповіді, активованої вродженим імунітетом або інтерферонами [21]. Вірус може використовувати механізм хазяїна для реплікації вірусного геному. Експресія вірусних білків за допомогою трансляції – процесу синтезу білка на інформаційній матриці РНК, здійснюється рибосомами клітини-хазяїна. Значна частина геномної РНК вірусу кодує два поліпротеїни – pp1a і pp1ab. Інші структурні білки, такі як мембранний білок (M), S-білок, білок оболонки (E), білок нуклеокапсиду (N) кодує решта генома. Нарешті, новоутворені віруси вивільняються з клітини, щоб заразити інших, увічнюючи життєвий цикл вірусу [22, 23]. Вищезазначене свідчить про те, що як вірусні (структурні та неструктурні) білки, так і білки хазяїна (ACE2 і TMPRSS2) є ключовими в циклі реплікації вірусу. Націлювання на ці білки забезпечує стратегічний підхід до пригнічення реплікації вірусу [24, 25].

При розробці протівірусних препаратів використовуються дві різні стратегії: вплив на клітини організму хазяїна (непрямі методи) або вплив безпосередньо на вірус (прямі методи). Непрямі методи спрямовані на білки клітини-господаря, які беруть участь у життєвому циклі вірусу. Цей підхід має нижчу ймовірність розвитку резистентності, але значно вищу токсичність [26]. Так, запобігання взаємодії зв'язування між SARS-CoV-2 і рецепторами людського ангіотензинперетворюючого ферменту II (ACE2) є основою для розробки нових вакцин проти COVID-19 [27-28]. Прямі методи впливають саме на окремі компоненти вірусу та його життєвий цикл. Ці підходи характеризуються значною специфічністю та меншою кількістю побічних ефектів для організму. Вірусні білки, такі як основна протеаза Mpro і папаїноподібна протеаза PLpro, а також інші компоненти вірусу на різних стадіях його життєвого циклу можуть бути потенційними мішенями протівірусної стратегії прямого підходу. При конструюванні молекул для фармацевтичного впливу на вірус необхідно брати найбільш консервативні мішені: компоненти вірусу, які мають менше мутацій і є високоспецифічними для вірусу.

Структурні білки, зокрема S-білки, відіграють важливу роль у патогенезі вірусу через розпізнавання рецепторів і злиття мембран. E-білки, незважаючи на те, що

вони є найменшими структурними білками, відіграють вирішальну роль у збиранні вірусів, брунькуванні, формуванні оболонки та патогенності. М-білки є ключовими у збірці вірусу, тоді як N-білки виконують численні функції, включаючи упаковку геному вірусної РНК. У білках хазяїна ACE2 діє як первинні ворота для проникнення вірусу в клітини, що робить його центром для блокування проникнення вірусу. TMPRSS2, поширений у шлунково-кишковому, сечостатевого та респіраторного епітелії людини, необхідний для активації білків S коронавірусу, таким чином сприяючи зараженню SARS-CoV-2. Ці висновки показують, що кожен білок відіграє значну роль у проліферації вірусу. Однак виникають проблеми через схильність вірусу до мутацій (наприклад, S-білки) і різноманітну експресію рецепторних білків (наприклад, ACE2) у різних тканинах, що ускладнює розробку ефективних інгібіторів. Цікаво, що неструктурні білки SARS-CoV-2, такі як Mpro та RdRp, є висококонсервативними для штамів вірусу, що робить їх привабливими мішенями для розробки ліків, які мінімізують втручання у фізіологічні процеси клітини-господаря [29-31]. Примітно, що унікальна субстратна специфічність Mpro – розщеплення пептидів лише після залишків глутаміну, – зменшує потенціал токсичності клітин-господарів від інгібіторів Mpro-націлювання.

Основні функції та унікальна структура Mpro роблять його привабливою мішенню для розробки конкретних противірусних препаратів. Інгібуючи активність Mpro, можна порушити реплікацію вірусу, сприяти імунній відповіді та потенційно зупинити прогресування інфекції. Одна з головних переваг націлювання на Mpro полягає в його збереженні серед коронавірусів. Незважаючи на генетичне різноманіття, яке спостерігається в сімействі коронавірусів, Mpro демонструє високу послідовність і структурну подібність між різними штамми. Це збереження сприяє розробці противірусних препаратів широкого спектру дії, ефективних проти різних коронавірусів, включаючи SARS-CoV-2, коронавірус Близькосхідного респіраторного синдрому (MERS-CoV) і потенційно майбутніх нових коронавірусів. Враховуючи відсутність людського гомолога для Mpro та його чітку субстратну специфічність, яка не відповідає жодній відомій людській протеазі, є можливість розробити ефективні та точні інгібітори Mpro з мінімальними інгібіторними ефектами на людські протеази. Це призведе до зменшення побічних ефектів, які зазвичай пов'язані з багатьма противірусними засобами.

1.2. Інгібітори головної протеази SARS-CoV-2

Основна протеаза (M_{pro}) SARS-CoV-2 є важливим ферментом, який відіграє важливу роль у життєвому циклі вірусу, що робить його важливою мішенню для розробки противірусних препаратів. Інгібування SARS-CoV-2 M_{pro} стало багатообіцяючим підходом до розробки терапевтичних засобів для лікування COVID-19. Структурно SARS-CoV-2 M_{pro} є гомодимером, що складається з двох протомерів, позначених А і В (рис. 1.1). M_{pro} характеризується як тридоменна цистеїнова протеаза з каталітичною діадою, що складається з Cys145–His41, розташованої в щілині між доменами I і II [32-34].

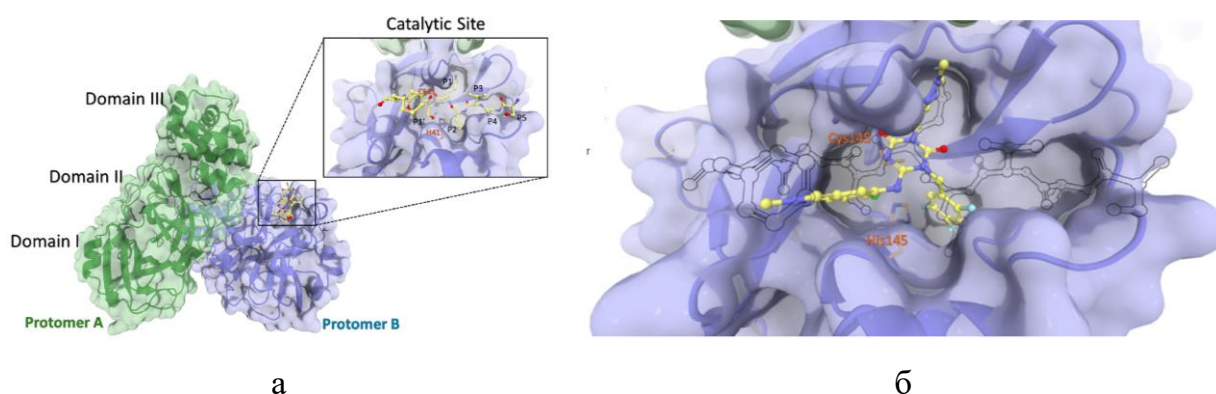


Рисунок 1.1 - (а) Гомодимер M_{pro}; (б) каталітичний сайт SARS-CoV-2 M_{pro} зі зв'язаним інгібітором енсїтрелвір (зображено жовтим кольором) порівняно з вірусним N-кінцевим субстратом автопроцесингу nsp4/5 (чорний контур) [34].

M_{pro} розпізнає та розщеплює амінокислотну послідовність субстрату зі специфічністю, здебільшого за послідовностями Leu-Gln(Ser, Ala або Gly), тоді як жодна відома людська протеаза не має подібної специфічності. Ділянка S1, обмежена бічними ланцюгами His163, Phe140, Glu166, His164 і His172, демонструє високу специфічність щодо залишків глутаміну. Область S2 містить гідрофобні амінокислоти, включаючи Tyr54, Met49, Pro168, Met165 і Val186, тоді як області S3/S4, які особливо піддаються впливу розчинника, охоплюють такі залишки, як Ala191, Gln189, Gly251 і Gln192 (рис. 1.2) [35]. Існує варіабельність амінокислотної послідовності в цих сайтах розщеплення, при цьому Gln знаходиться в P1, а Leu в P2. В положення P3 можуть бути вставлені гідрофільні і гідрофобні залишки.

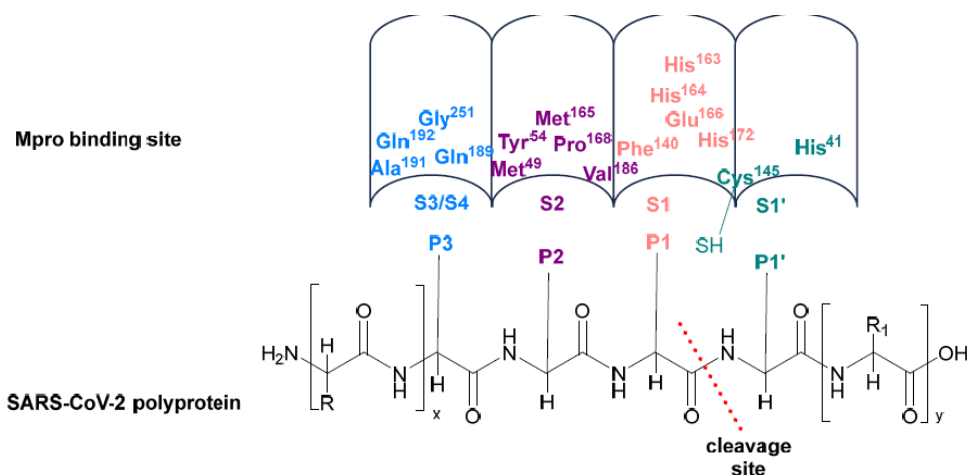


Рисунок 1.2 - Сайт зв'язування SARS-CoV-2 Mpro з вірусними поліпротеїнами [35].

Каталітичний механізм Mpro, як і інших цистеїнових протеаз, заснований на нуклеофільному залишку, який може брати участь у механізмі реакції (рис. 1.3). Спочатку група -SH Cys145 з каталітичної діади зазнає депротонування, що сприяє сусідньому His41 (етап I). Було припущено, що цвіттеріонний стан діади Cys145–His41, а не її нейтральна форма, ініціює реакцію на етапі I. Згодом утворена аніонна сірка атакує карбонільний вуглець розщеплюваного амідного зв'язку (етап II). Ця дія вивільняє пептидний продукт з аміним закінченням, тоді як His41 повертається до свого депротонованого стану (етап III). Нарешті, утворений тіоефір піддається гідролізу, вивільняючи карбонову кислоту (етап IV), таким чином відновлюючи каталітичну діаду до початкового стану, готового для подальшого протеолітичного циклу (етап V) [35-38].

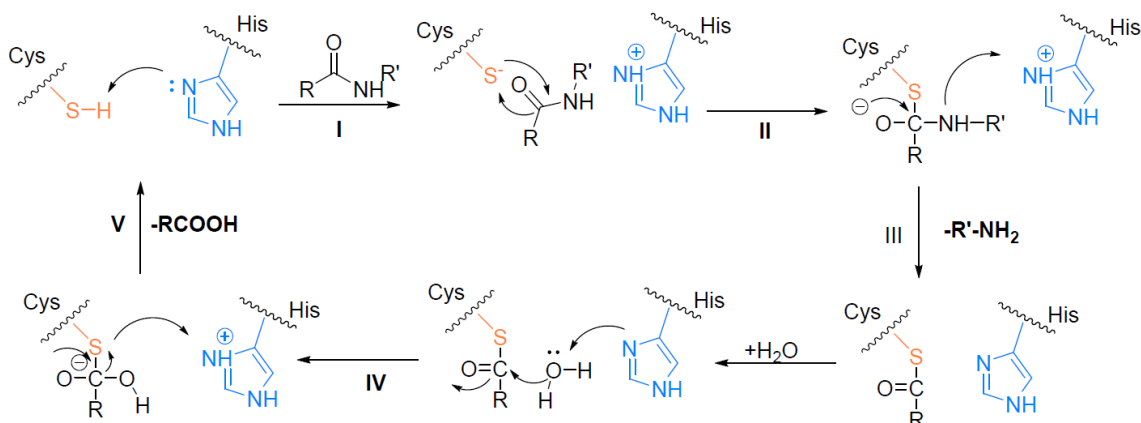


Рисунок 1.3 - Каталітичний механізм гідролізу Mpro [35].

Інгібітори Мрго можна класифікувати на основі їх кінетики зв'язування, походження та хімічної структури [35, 39].

Класифікація інгібіторів на основі їх кінетики зв'язування

Інгібітори демонструють зв'язування з протеазою Мрго за допомогою нековалентного (А) і ковалентного необоротного (В) або оборотного (С) механізмів (рис. 1.4).

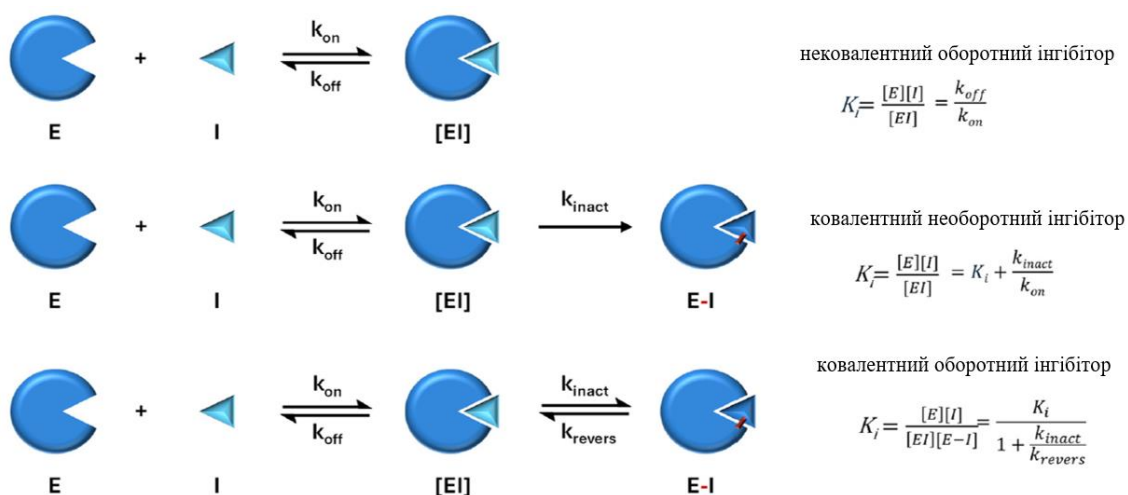


Рисунок 1.4 - Порівняння нековалентних і ковалентних взаємодій між ферментом і інгібітором [35].

Нековалентні інгібітори оборотно зв'язуються з ферментом, утворюючи комплекс фермент-інгібітор. Нековалентність означає, що інгібітор може зв'язуватися з ферментом і дисоціювати від нього кілька разів. Тоді константа рівноваги визначається як відношення констант швидкості роз'єднання та зв'язування. Нековалентні інгібітори конкурентно зв'язуються з каталітичним центром за допомогою важливих водневих зв'язків і неполярних взаємодій. Це зв'язування може спричинити спотворення в суб-кишенях і витіснити важливі молекули води, зрештою блокуючи доступ до каталітичного сайту. Прикладами нековалентних інгібіторів Мрго є енсїтрелвір лопінавір, ритонавір, нелфінавір, ремдесивір, рейн, кверцетин (рис. 1.5) [40].

Ковалентні інгібітори взаємодіють з Мрго з утворенням ковалентного зв'язку між тіоловою групою фермента і атомом вуглецю інгібітора. Інгібування може бути оборотним або необоротним, залежно від міцності цього новоутвореного ковалентного зв'язку [41, 42]. Необоротні ковалентні інгібітори утворюють ковалентний зв'язок із цільовим ферментом, що призводить до постійного

пригнічення активності ферменту. Ряд інгібіторів, таких як N3, GRL-1720, цинансерин, Jun9-62-2R, SIMR-2418 і ебселен продемонстрували потужне інгібування Mpro через необоротне ковалентне зв'язування з каталітичним залишком цистеїну (рис. 1.6) [37, 43, 44].

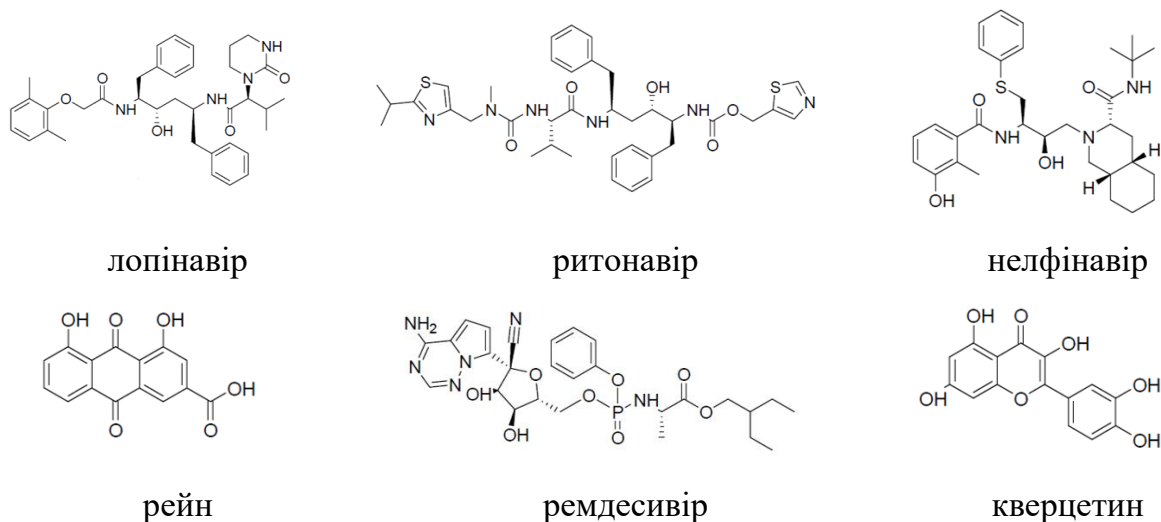


Рисунок 1.5 - Приклади нековалентних інгібіторів Mpro.

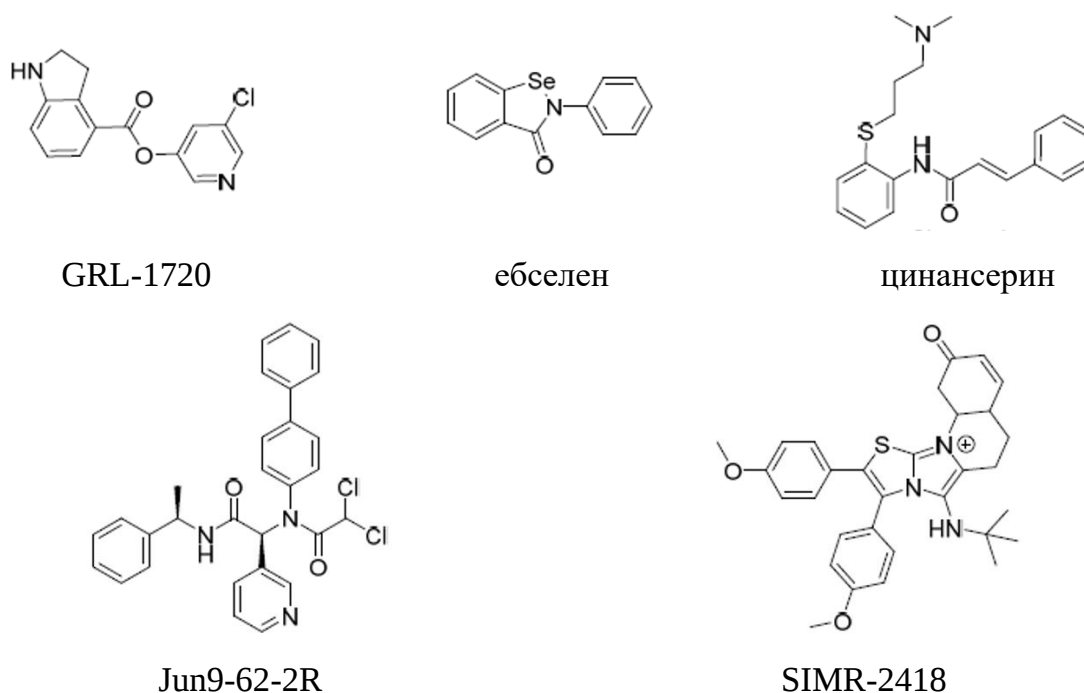


Рисунок 1.6 - Приклади необоротних ковалентних інгібіторів Mpro.

Оборотні ковалентні інгібітори утворюють ковалентний зв'язок із цільовим ферментом, але цей зв'язок може бути розірваний за певних умов, дозволяючи ферменту відновити свою активність. Приклади ковалентних інгібіторів Mpro з

оборотними ефектами включають GC-373, GC-813, NK01-63 (коронастат), боцепревір, PF-07304814 (луфотрелвір) і PF-07321332 (нірматрелвір) (рис. 1.7) [45-47].

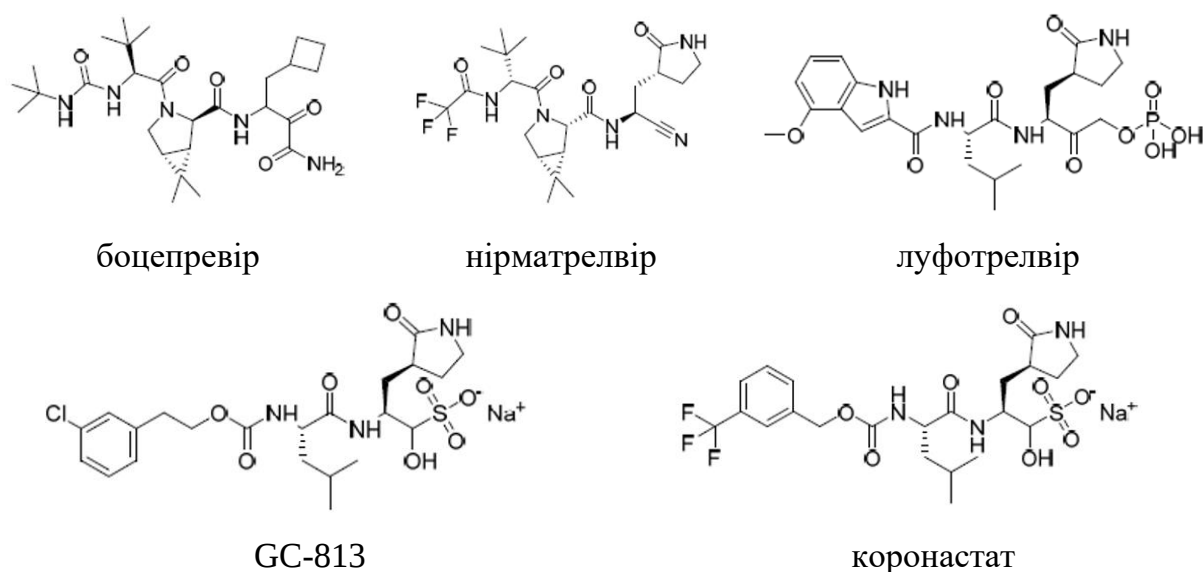


Рисунок 1.7 - Приклади оборотних ковалентних інгібіторів SARS-CoV-2 M^{pro}.

Класифікація інгібіторів M^{pro} за походженням

За походженням інгібітори M^{pro} поділяють на натуральні продукти, перепрофільовані ліки, синтетичні сполуки.

Натуральні продукти – інгібітори, які отримують із природних джерел, таких як рослини, морські організми або мікроорганізми. Робінетин, розмаринова кислота, сальвіанолова кислота, мірицетин, оридонін, skutellareїн та L-епігалокатехінгалат були ідентифіковані як ліганди для M^{pro} [48]. Надзвичайна противірусна ефективність (EC₅₀ 1,3 nM) спостерігалася з робінетином.

Для виявлення потенційних препаратів-кандидатів проти SARS-CoV-2 M^{pro} у натуральних продуктах широко використовуються комп'ютерні методи. Ці методи, включаючи машинне навчання, молекулярний докінг та інші методи віртуального скринінгу, дозволяють ідентифікувати потенційні інгібітори. Похідні флавону, такі як байкалейн або лабдан дитерпеноїд андрографолід, були ідентифіковані за допомогою протоколів молекулярного докінгу та молекулярної динаміки як інгібітори M^{pro} з активністю проти SARS-CoV-2 [49]. Завдяки скринінгу фармакофорів на основі структури та QSAR-аналізу баз даних природних продуктів було виявлено нові хімічні каркаси для інгібіторів M^{pro}. Серед них псевдотин А,

лактупікрин і альпінетин демонстрували значення IC_{50} у мікромольному діапазоні [50].

Віртуальний скринінг на основі машинного навчання був проведений для бібліотеки з 4000 фітохімічних речовин, що призвело до ідентифікації 26 потенційних інгібіторів $Mpro$ [51].

Використовуючи методи віртуального скринінгу, такі як молекулярний докінг і моделювання молекулярної динаміки, дослідники успішно ідентифікували 3 перспективні фітохімічні речовини (ціанідин 3-О-галактозид, β -каротин і епікатехін) з журавлини як потенційні інгібітори SARS-CoV-2 $Mpro$. Серед них ціанідин 3-О-галактозид продемонстрував найпотужніший інгібуючий потенціал із значенням IC_{50} 9,98 мкМ [52].

Перепрофільовані ліки – інгібітори, які виявляють при використанні існуючих ліків для нових терапевтичних цілей. Перевага використання сполук із бібліотек для повторного використання ліків полягає в тому, що ці молекули вже мають підтверджену біоактивність клітинної проникності. Комп'ютерні методи відіграли вирішальну роль на початкових етапах оцінки репозиційованих сполук. Виявлено, що противірусні сполуки цефадроксил, цефоперазон і бетриксабан демонструють помірну активність проти SARS-CoV-2 зі значеннями IC_{50} 2,4 мкМ 4,9 мкМ і 0,9 мкМ відповідно [53]. Існуючі противірусні препарати з групи інгібіторів протеази ВІЛ лопінавір, ритонавір і нелфінавір були віднесені до нековалентних інгібіторів $Mpro$. TL-3 і подібні молекули мають сильний інгібуючий вплив на $Mpro$, досягаючи діапазону наномольних концентрацій [54].

Синтетичні сполуки – інгібітори, які хімічно синтезовані в лабораторії та оптимізовані для специфічних взаємодій з $Mpro$ на основі досліджень зв'язків між структурою та активністю та підходів медичної хімії. Останні розробки ліків зосереджені на ковалентних інгібіторах SARS-CoV-2 $Mpro$, оскільки це було продуктивним напрямком досліджень під час спалаху. Виявлення ефективних нековалентних інгібіторів $Mpro$ з'явилося пізніше, але вважається більш складним. Дослідники використовували різноманітні стратегії, щоб відкрити нові інгібітори $Mpro$, такі як високопродуктивний скринінг, раціональний дизайн ліків на основі мішені та скринінг і оптимізація на основі фрагментів [43, 55-69].

Класифікація інгібіторів Mpro за хімічною будовою

Два відомі класи інгібіторів Mpro, пептидоміметики та малі молекули, мають певні переваги та проблеми (Таблиця 1.1). За визначенням, пептидоміметики – це синтетичні сполуки, призначені для імітації здатності природного субстрату зв'язуватися з його сайтом-мішенню без проходження реакції, що каталізується ферментами [70]. Ці молекули пропонують вищу метаболічну стабільність, покращену біодоступність і підвищену спорідненість і селективність рецепторів, ніж пептиди [71, 72]. Однак їх активність *in vivo* часто є недостатньою через низьку біодоступність через погане пероральне всмоктування та високу метаболічну чутливість. Новіші покоління пептидоміметиків розроблені таким чином, щоб бути менш схожими на пептиди, що включають неприродні амінокислоти або структурні елементи, які уникають пептидних зв'язків. Ці модифікації можуть посилити активність *in vivo*, але можуть збільшити витрати на синтез.

Хоча пептидоміметики пропонують високу специфічність і стабільність, їх складний синтез і обмежена біодоступність створюють проблеми. Перехід від пептидоміметиків до малих молекул є складним процесом, який вимагає глибокого розуміння як хімії пептидів, так і дизайну низькомолекулярних ліків. По-перше, аналіз зв'язку структура–активність (SAR) визначає функціональні групи в пептидоміметику, які є вирішальними для зв'язування з мішенню та біологічної активності. Оптимізація структури зосереджена на основному каркасі, відповідальному за активність, видаляючи несуттєві частини молекули, щоб зменшити молекулярну масу та складність відповідно до правила п'яти Ліпінського.

Розробка ефективних низькомолекулярних інгібіторів Mpro передбачає використання різних стратегій для підвищення афінності та селективності зв'язування при збереженні сприятливих фармакокінетичних властивостей. Одним із підходів є використання ковалентно зв'язаних будівельних блоків для отримання багатьох сполук, що виявилось успішним при розробці інгібіторів SARS-CoV-2 Mpro. Переважаючи ковалентні інгібітори на основі пептидів мають пептидний каркас із високоактивними електрофільними частинами, які можуть «захопити» тіолову групу Cys145 через незворотний або оборотний ковалентний зв'язок, таким чином інактивуючи фермент.

Таблиця 1.1 - Переваги та недоліки пептидоміметиків і малих молекул у відкритті ліків

Пептидоміметики	Малі молекули
Переваги	
Імітують складні взаємодії природних пептидів з їхніми рецепторами або іншими мішенями.	Може взаємодіяти з широким спектром біологічних мішеней. Універсальні інструменти для відкриття ліків
Як і природні пептиди, показали високу специфічність і селективність до цілей, менше нецільових ефектів і знижену токсичність.	Краща проникність мембран, легко перетинає клітинні мембрани, досягаючи внутрішньоклітинних цілей.
Покращена метаболічна стабільність порівняно з природними пептидами	Хороша пероральна біодоступність, більш зручна для пацієнтів.
Недоліки	
Багато пептидоміметиків все ще страждають від поганої пероральної біодоступності та можуть вимагати парентерального введення.	Малі молекули можуть швидко метаболізуватися та виводитися з організму, що іноді вимагає частого дозування або призводить до короткого періоду напіввиведення.
Порівняно з малими молекулами, недостатня проникність мембрани. Високий потенціал нецільових ефектів і токсичності.	Складні та дорогі процеси синтезу є перешкодою для великомасштабного виробництва.
Обмежена здатність імітувати складні та специфічні взаємодії більших біомолекул, таких як пептиди.	Іноді вони можуть викликати імунну відповідь. Більш схильний до розвитку лікарської стійкості

Відправною точкою для розробки інгібіторів Mpro було імітування пептидних субстратів. Аналіз способів зв'язування пептидоміметичних інгібіторів Mpro виявив спільні характеристики між ними [73, 74]. Типову структуру інгібітора можна поділити на чотири сегменти (P1', P1, P2, P3). P1-P3 складають пептидний каркас,

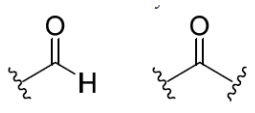
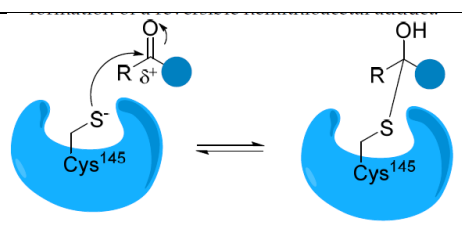
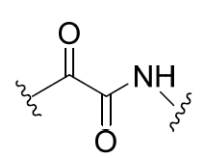
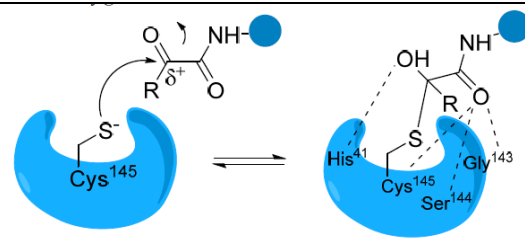
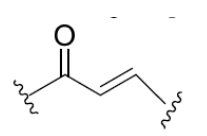
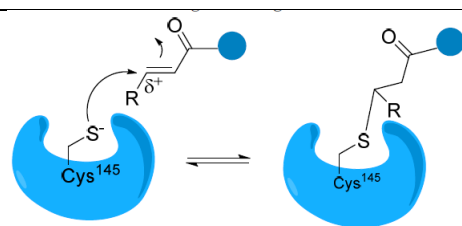
який може включати модифіковані амінокислоти для посилення пептидоміметичних властивостей і забезпечення специфічного мотиву розпізнавання для SARS-CoV-2 Mpro. Крім того, використовуючи знання про специфічність субстрату Mpro, у P1 є залишок Gln, тоді як у P2 зазвичай віддають перевагу великим гідрофобним залишкам (наприклад, ароматичним кільцям, здатним брати участь у π - π стекінгових взаємодіях). І навпаки, субсайт P1' зазвичай містить невеликі гідрофобні залишки. Таким чином, для пептидоміметичних інгібіторів Mpro електрофільний фрагмент на С-кінці (бойова частина) займає сайт P1', необхідний для ковалентної інактивації протеази. Ці С-кінцеві електрофільні фрагменти класифікуються на основі різних функціональних груп, присутніх в P1', таких як пептидилхлорметилкетони, азапептидні епоксиди, пептиди з акцептором Міхаеля, альдегід, фталгідразидогрупа, нітрильна група, альдегідбісульфітний аддукт, та α -кетамід [75-81].

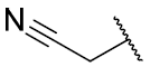
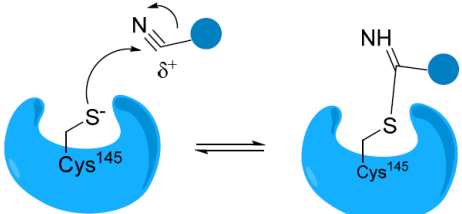
Маломолекулярні ковалентні інгібітори Mpro демонструють різні режими зв'язування та здатність генерувати оборотні або необоротні аддукти. Однак, подібно до пептидильних інгібіторів, маломолекулярні інгібітори Mpro за природою електрофільних фрагментів поділяються на такі ж групи: альдегіди, кетони, α -кетаміди, акцептори Міхаеля, α -галогенацетаміди, нітрили, складні ефіри та молекули, які містять електрофільний атом селену/сірки. Серед них однією зі значущих груп є хлорпіридинілові ефіри індолу, представлені сполукою GRL-1720.

Класифікація інгібіторів Mpro за електрофільними фрагментами

У контексті інгібіторів, націлених на SARS-CoV-2 Mpro, електрофільні фрагменти – це хімічні групи, призначені для реакції з певним амінокислотним залишком (як правило, цистеїном) в активному центрі ферменту. Ця реакція утворює ковалентний зв'язок, ефективно пригнічуючи активність ферменту (Таблиця 1.2). Важливо відзначити, що хоча ковалентні інгібітори можуть запропонувати такі переваги, як підвищена ефективність і подовжена тривалість дії, вони також створюють проблеми, такі як нецільові ефекти та потенційна токсичність. Для досягнення селективності та безпеки необхідні ретельний дизайн та оптимізація цих інгібіторів. Крім того, розуміння зв'язку між структурою та активністю (SAR) електрофільних фрагментів та їх взаємодії з активним центром ферменту має вирішальне значення для раціоналізації ефективних інгібіторів Mpro.

Таблиця 1.2 - Класифікація інгібіторів Mpro на основі їх електрофільних фрагментів

Електрофільний фрагмент	Механізм дії	Приклад
Карбоніл 	 Нуклеофільне приєднання цистеїну -SH призводить до утворення оборотного гемітіоацетального аддукту.	коронастат, GC373, GC376 [82] PF-00835231, PF-07304814 [83]
α-Кетонамід 	 Залишок α-кетонаміду утворює додаткові нековалентні Н-зв'язки з амінокислотами активного центру через карбонільний кисень і -ОН гемітіоацеталу	боцепревір [84] телапревір [85] UAWJ246, UAWJ248 [33]
Акцепторна група Міхаеля (α,β-ненасичена карбонільна група) 	 Акцепторні групи Міхаеля інгібують ферменти через сполучене приєднання нуклеофільного цистеїнілу -SH до електрофільного C_β ненасиченої системи, утворюючи майже необоротний і довготривалий аддукт	цинансерин [43] SIMR-2418 [44] сполука N3 [86, 87] ML188 [88]

Нітрил 	 Через різницю в електронегативності з атомом азоту нітрильний вуглець вразливий до нуклеофільного приєднання каталітичним цистеїном протеази, що призводить до утворення оборотного тіоімідатного ковалентного аддукту	атилотрелвір [46] нірматрелвір [47] PF-07817883 [89]
---	---	---

1.3. Енсїтрелвір

Фармацевтична компанія Shionogi у співпраці з Університетом Хоккайдо розробила непептидний пероральний препарат енсїтрелвір (експериментальна назва S-217622, систематична назва 1-(2,4,5-трифторбензил)-3-[(1-метил-1H-1,2,4-тріазол-3-їл)метил]-(6E)-6-[(6-хлор-2-метил-2H-індазол-5-їл)іміно]-1,3,5-триазинан-2,4-діон, рис. 1.8а), який був схвалений до продажу у Японії 22 листопада 2022 року [90]. Молекулу було виявлено за допомогою віртуального скринінгу з подальшим біологічним аналізом та оптимізацією хіт-сполуки за допомогою підходу до дизайну ліків на основі структури. Рентгенівська кристалічна структура комплексу енсїтрелвіру з Mpro показує, що в місці S1 ланка 1-метил-1H-1,2,4-тріазолу утворює водневий зв'язок з NH бічного ланцюга His163 (рис. 1.8б) [90-94]. 2,4,5-Трифторметильна частина енсїтрелвіру домінує в гідрофобній кишені S2, розташовуючись паралельно до бічного ланцюга His41 для кращого контакту. Фрагмент 6-хлор-2-метил-2H-індазолу, розташований в кишені S1', утворює водневий зв'язок з NH основного ланцюга Thr26 і гідрофобно контактує з Met49.

У ряді робіт здійснено комп'ютерне моделювання комплексу енсїтрелвіру з Mpro [95-110]. Показано, що амінокислотні залишки Thr25, Thr24, Leu27, Thr26, Met49, His41, Leu141, Phe140, Gly143, Asn142, Cys145, Ser144, Met165, His163, Gln189, Glu166 і п'ять місткових молекул води важливі для зв'язування енсїтрелвіру (рис.1.9). Внески взаємодій були не лише електростатичними взаємодіями та

водневими зв'язками, але й π -орбітальними взаємодіями (π - π , CH/π , NH/π , OH/π та неподіленою парою/ π), зв'язками з галогенами.

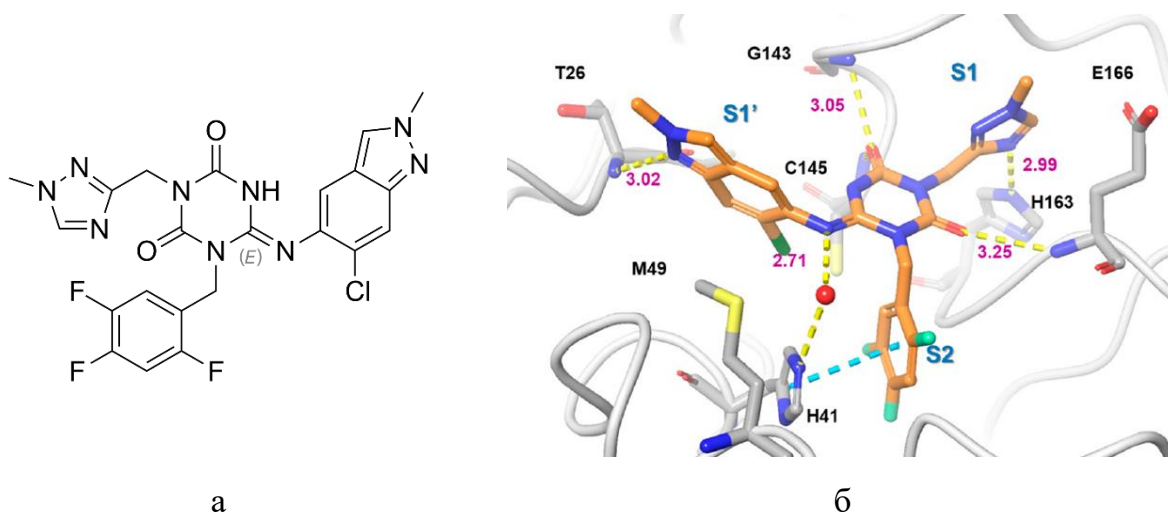


Рисунок 1.8 - (а) Хімічна структура енсїтрелвіру; (б) фрагмент рентгенівської кристалічної структури комплексу енсїтрелвіру з Mpro [90].

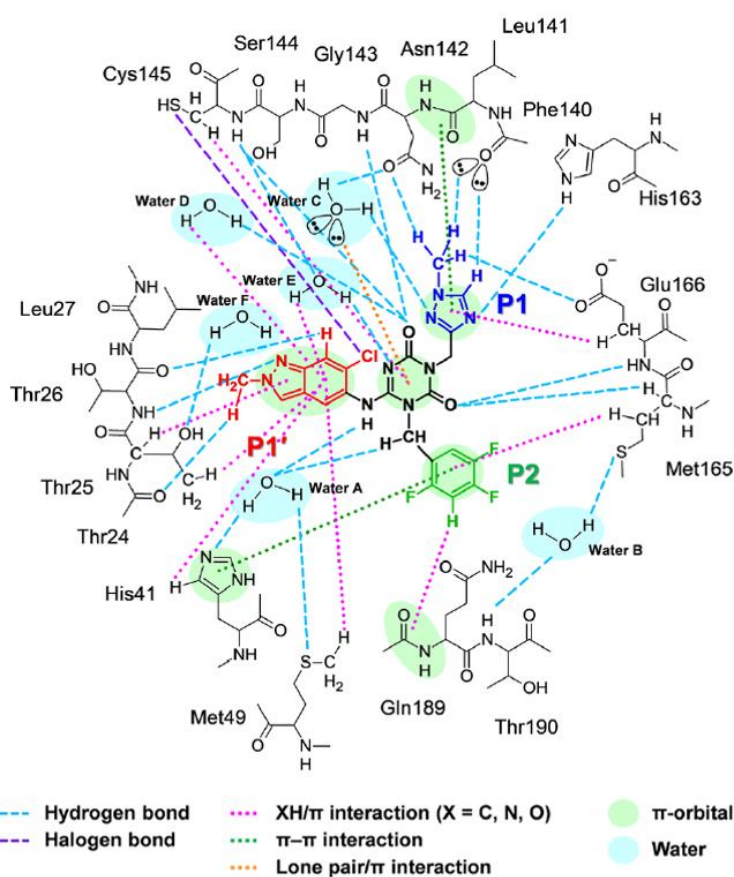


Рисунок 1.9 - Схематична діаграма мережі міжмолекулярної взаємодії між енсїтрелвіром, амінокислотними залишками Mpro та містковими молекулами води [300].

Енсирелвір виявив значну інгібіторну активність проти SARS-CoV-2 Mpro як нековалентний непептидний інгібітор, зі значенням IC_{50} 0,013 мкМ та ефективну противірусну активність зі значенням EC_{50} 0,37 мкМ. Він продемонструвала противірусну активність проти ряду варіантів SARS-CoV-2 і коронавірусів *in vitro*, а також сприятливий метаболізм ліків і фармакокінетичні профілі для перорального дозування. Це включало високу метаболічну стабільність (96% і 88% у мікросомах печінки людини та щура відповідно), високу пероральну абсорбцію (97%) та низький кліренс (1,70 мл/хв/кг) у щурів [90]. Напівмаксимальні інгібуючі концентрації (EC_{50}) енсітрелвіру в клітинах нирок мавп (Vero E6), що експресують трансмембранну серинову протеазу людини (TMPRSS2) проти дикого типу (WT), гамма-, бета-, альфа- та омікрон-варіантів SARS-CoV-2 були 0,37, 0,33, 0,40, 0,50 і 0,29 мкмоль/л відповідно [90]. Найважливіше те, що енсітрелвір має високу біодоступність при пероральному прийомі та має подовжений період напіввиведення *in vivo*.

Враховуючи обнадійливі доклінічні результати, енсітрелвір було включено до клінічних випробувань. Було проведено багатоцентрове, рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване дослідження фази 1 (jRCT2031210202) для оцінки безпеки та фармакокінетики таблеток енсітрелвіру, які застосовували один раз на день здоровим добровольцям, як японським, так і білим жінкам і чоловікам. Фармакокінетика енсітрелвіру була подібною в усіх досліджуваних популяціях [111]. У фазі 2/3 клінічних випробувань понад 300 учасників перорально застосовували інгібітор Mpro енсітрелвір (jRCT2031210350). Результати дослідження показали, що вірусне навантаження зменшилося, але симптоми інфекції значно не покращилися як у японських, так і білих жінок і чоловіків. Інгібітор Mpro добре переносився, і серйозних проблем з безпекою виявлено не було [111]. Крім того, енсітрелвір був пов'язаний зі зниженням майже на 40% втрати нюху та смаку після інфекції SAR-CoV-2 [112]. Найбільш поширеними побічними ефектами є тимчасове зниження рівня ліпопротеїнів високої щільності та підвищення рівня тригліцеридів у крові.

У фазі 2/3 клінічних випробувань енсітрелвір продемонстрував швидке очищення від інфекційного вірусу SARS-CoV-2, при цьому відсоток пацієнтів із позитивними титрами вірусу на 4-й день лікування (після третьої дози) зменшився

приблизно на 90% порівняно з плацебо; порівняно з плацебо енсїтрелвір зменшив тривалість виділення SARS-CoV-2 на 1–2 дні. Що ще важливіше, п'ять ключових симптомів COVID-19 омїкрон-варіантної інфекції SARS-CoV-2 (закладеність носа або біль у горлі, нежить, кашель, низька енергія або втома, лихоманка або температура тіла) полегшилися після того, як пацієнт вперше прийняв енсїтрелвір [112, 113].

Виходячи з результатів, енсїтрелвір отримав перше в Японії надзвичайне та повне схвалення. Кілька поточних клінічних випробувань фази 2 або 3 (NCT05897541, NCT06161688, NCT05605093, NCT05305547) досліджують енсїтрелвір. Ці дослідження призначені для оцінки безпеки та ефективності енсїтрелвіру в кількох контекстах: профілактика симптоматичної інфекції SARS-CoV-2 серед домашніх контактів людей, інфікованих COVID-19, лікування дорослих із тривалою інфекцією COVID-19 або покращення результатів у госпіталізованих пацієнтів із COVID-19 та ефективність у дорослих амбулаторних пацієнтів із легкими та помірними симптомами COVID-19, які почали лікування протягом трьох днів після появи симптомів.

Хоча ковалентні інгібітори можуть бути дуже ефективними, вони також можуть бути пов'язані з більшим ризиком побічних ефектів і токсичності. Навпаки, нековалентні інгібітори зазвичай мають більшу селективність і часто викликають менше побічних ефектів [114]. У разі результатів клінічних випробувань обох типів інгібіторів час до зникнення симптомів COVID-19 та ступінь реплікації вірусу були зменшені. Перевага клінічних випробувань із застосуванням енсїтрелвіру, нековалентного інгібітора Mpro, полягає в тому, що вони залучають пацієнтів незалежно від їхнього профілю ризику важкого захворювання, на відміну від досліджень, зосереджених на нїрматрелвірі ковалентному інгібітору Mpro. Крім того, на відміну від інших досліджень, у яких переважно брали участь невакциновані пацієнти, які отримували пероральні протівірусні препарати, це дослідження включало як вакцинованих, так і невакцинованих інфікованих осіб [115]. Нековалентним інгібіторам зазвичай надають перевагу в протівірусній терапії через їх сприятливий профіль безпеки, більш передбачувані фармакокінетичні властивості та меншу кількість побічних ефектів. Однак розробка ефективних протівірусних сполук, які діють за допомогою цього механізму, є складною [114], що призводить

до меншої кількості нековалентних інгібіторів, які зараз проходять клінічні випробування інгібіторів Mpro. Тож пошук нових потенційних нековалентних інгібіторів Mpro є актуальною задачею.

1.4. Комп'ютерні методи пошуку нових препаратів

Комп'ютерні методи відіграють значну роль у пошуку нових інгібіторів Mpro. Нещодавній огляд підсумовує прогрес та досягнення в обчислювальних підходах, які зараз використовуються для оптимізації процесу відкриття та розробки ліків у контексті COVID-19 [116]. Використання комп'ютерних методів часто призводить до ідентифікації влучних структур, які потім служать відправною точкою для оптимізації та розробки більш ефективних молекул. Комп'ютеризоване відкриття ліків (CADD) – це серія обчислювальних підходів для керівництва та оптимізації процесу відкриття та розробки ліків для мінімізації витрат виробництва та часу. Дві основні стратегії CADD: розробка ліків на основі лігандів і структурована.

Ліганд-орієнтований дизайн ліків базується на кількісних співвідношеннях структура-активність (QSAR), моделюванні фармакофорів, штучному інтелекті (AI) і методах машинного навчання. Структурно-орієнтований дизайн ліків починається зі з'ясування 3D-структури рецептора, використовує віртуальний скринінг, докінг та молекулярно-динамічне (MD) моделювання (рис. 1.10).

Виділяють дві групи інструментів скринінгу *in silico*: QSAR і молекулярне моделювання. Основні етапи QSAR дослідження [116]:

(i) збір експериментальних даних: параметри біологічної активності IC_{50} , EC_{50} , RBA (відносна спорідненість зв'язування) або двійкова інформація – активний/неактивний тощо, ідентифікація сукупність систем з відомою біологічною активністю;

(ii) поділ молекулярних систем з відомою активністю на дві групи: навчальні та тестові набори;

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

(iv) формулювання можливої математичної (статистичної) моделі біологічної активності: мультилінійна та нелінійна регресійні моделі, правила класифікації (функція дискримінації, логістична регресія), штучна нейронна мережа;

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

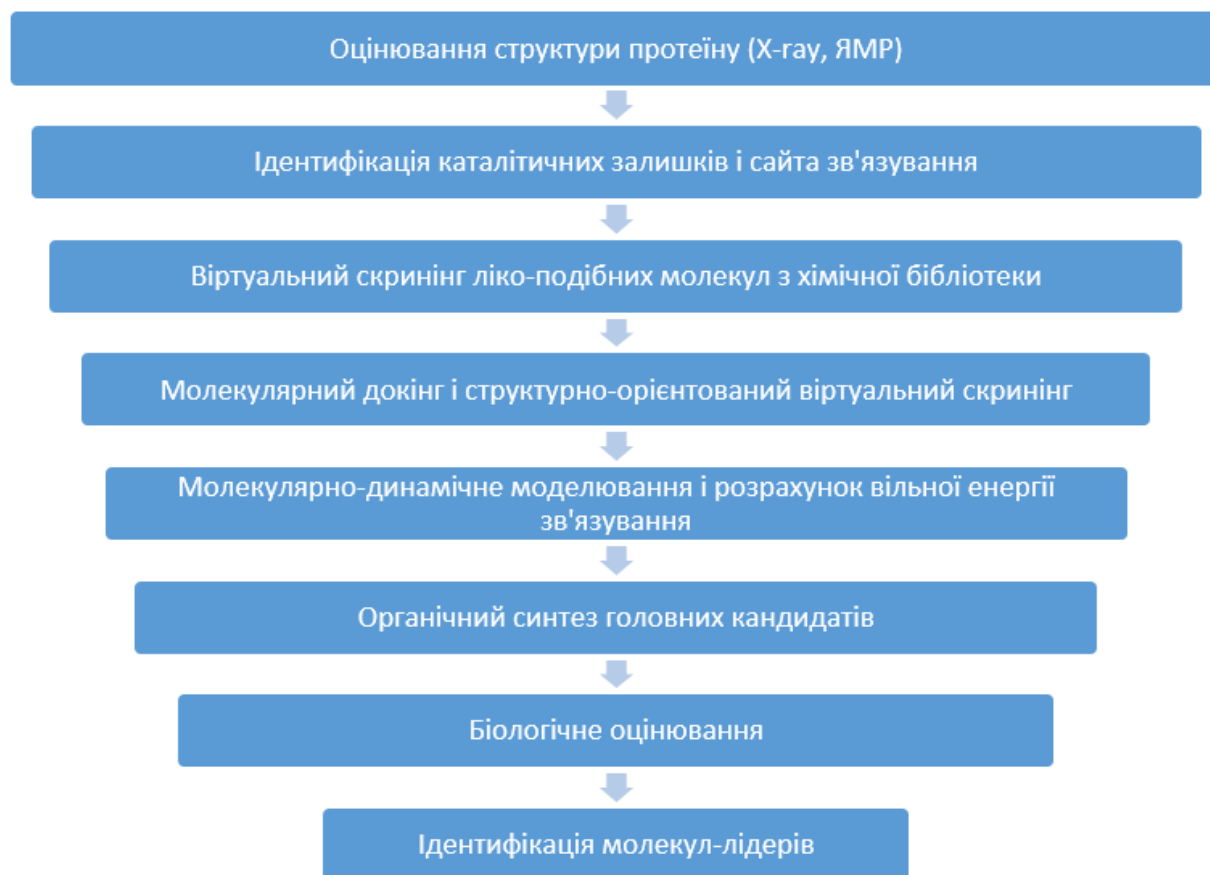


Рисунок 1.10 - Типовий робочий процес структурного дизайну ліків [116].

Методи QSAR активно застосовують для пошуку нових інгібіторів Mpro [66, 96, 117]. Так, скринінг бази даних InterBioScreen, яка містить понад 550000 сполук, за допомогою моделі QSAR, дозволив відібрати структури 71 потенційного інгібітора [67]. Для QSAR-опису широкого діапазону молекулярних властивостей використовують штучний інтелект (AI) [118] і методи машинного навчання [119, 120]. Ці потужні інструменти, які дозволяють генерувати за вимогою молекули з бажаними фізичними, хімічними чи біологічними властивостями, успішно застосовані для перепрофілювання та відкриття нових ліків проти COVID-19 [121].

Підходи молекулярного моделювання (ММ) зосереджені на прямому моделюванні ліганд-білок і скринінгу для ідентифікації перспективних молекулярних структур. Типова процедура ММ [116]:

(i) ідентифікація мішені (білки, сайти зв'язування), збір експериментальних даних скринінгу, збір даних про дію ліків, створення бази даних або вибір бази даних;

(ii) віртуальний скринінг (VS);

(iii) структурне моделювання, стикування (докінг);

(iv) ідентифікація попадання;

(v) створення потенційних сполук-лідерів (оптимізація);

(vi) валідація *in vitro*, *in vero*, *in vivo*.

Віртуальний скринінг здійснюють на основі подібності або на основі фармакофора. Відповідно до принципу подібності структурно споріднені молекули повинні проявляти однакову біологічну активність. Хімічні структури можна охарактеризувати, наприклад, за допомогою двійкових даних, зібраних у відповідних векторах (відбитки пальців), які описують наявність (або відсутність) певних елементів хімічної структури. Відбитки можна отримати за допомогою різних програм для обчислення дескрипторів, наприклад, DRAGON [122], PaDEL-Descriptor [123]. Чим більша кількість однакових відбитків – тим більша спорідненість молекул, і тим більша ймовірність прояву подібної біологічної активності. Віртуальний скринінг на основі подібності застосовано для пошуку інгібіторів SARS-CoV-2 Mpro [124].

Фармакофори зазвичай визначають як важливі хімічні властивості, що відповідають ефективним білок-лігандним взаємодіям. Фармакофор можна розуміти як області в тривимірному просторі, де певні функціональні групи можуть призводити до ефективних міжмолекулярних взаємодій. Це області донорів водневих зв'язків, акцепторів водневого зв'язку, гідрофобної взаємодії, позитивно і негативно заряджені групи. Існує кілька програм, які дають можливість проаналізувати сайт зв'язування та сформулювати фармакофорну гіпотезу, наприклад, LigandScout [125].

Обчислення докінгу можна розглядати як модель процесу молекулярного розпізнавання, який відіграє вирішальну роль у взаємодіях білок-ліганд. Комп'ютерне стикування ліганд-білок має на меті передбачити кращий спосіб зв'язування ліганду з білком відомої тривимірної структури. Під час пошуку в багатовимірних просторах методи стикування використовують оціночну функцію,

яка оцінює варіанти розташування у просторі комплексу ліганд-рецептор, дає оцінку спорідненості ліганду до білка. Найважливіших скорингові функції [116]:

- оцінка силового поля (описує енергію взаємодії як суму кулонівської (електростатичної), ван-дер-ваальсової (потенціал Леннарда-Джонса), розтягу, вигину та кутового кручення компонентів зв'язку за допомогою точно вибраного молекулярно-механічного силового поля (AMBER, TRIPOS, тощо);
- оцінювання знань (використовує інформацію з бази даних ліганд-білкових комплексів для відтворення експериментальних структур, а не зв'язуючих енергій);
- емпірична оцінка (заснований на підрахунку та оцінці певних типів взаємодій (електростатичні, гідрофобно-гідрофільні та гідрофобно-гідрофобні взаємодії), що відповідають функціональним групам, які контактують, для відтворення експериментальних даних, таких як енергії зв'язку та енергії конформації;
- скоринг машинного навчання (оцінення відбувається на основі попередньо отриманих даних для різних супрамолекулярних комплексів);
- консенсусний докінг (поєднуються кілька функцій скорингу).

Метод MD моделювання розраховує та аналізує траєкторії руху атомів і молекул протягом фіксованого періоду часу шляхом чисельного розв'язування рівнянь руху Ньютона для системи взаємодіючих частинок. Міжатомні потенціали або молекулярні механічні силові поля застосовують для обчислення сил між частинками та їх потенційних енергій [126]. Проведено численні дослідження MD моделювання структури та динаміки протеази Mpro та її комплексів з нековалентними інгібіторами [127-132]. За допомогою MD моделювання проводять також розрахунок вільної енергії зв'язку білково-лігандних комплексів SARS-CoV-2, що є мірою спорідненості взаємодії між лігандом і цільовим білком [133].

Так, потенційний інгібітор для Mpro мішені SARS-CoV-2 ідентифікований за допомогою віртуального скринінгу на основі машинного навчання, аналізу ADMET (абсорбції, розподілу, метаболізму, виведення та токсичності), молекулярного докінгу та MD моделювання [97]. Спочатку техніка машинного навчання використана для фільтрації великої бази даних (приблизно 10 мільйонів сполук) для потенційних інгібіторів. Після скринінгу 3 сполуки були обрані для подальшого аналізу. Аналіз ADMET порівнював ці кандидати з відомими інгібіторами нірматрелвіром та азвудином. Молекулярний докінг із подальшим 200 нс MD

моделюванням показав, що лише 1 кандидат залишався стабільним. Розрахована вільна енергія зв'язування на основі молекулярної механіки площі поверхні Пуассона-Больцмана (MM-PBSA) вказує на сильну взаємодію зв'язування. У іншому дослідженні віртуальний скринінг, докінг і MD об'єднали для просіювання 81 сполуки з 85% схожістю з енситрелвір з бази даних PubChem і обчислення їх потенційної взаємодії з Mpro [110].

Протоколи, засновані на молекулярному докінгу найкращих білково-лігандних структур у поєднанні з MD-моделюванням їх стабільності у явних водних розчинах, потенційно обіцяють розробку нових сильнодіючих ліків. Однак деякі важливі аспекти утворення та розриву ковалентного зв'язку в каталітичних кишнях вимагають врахування квантово-хімічного формалізму (тобто електронних і ядерних взаємодій) [116]. Гібридний підхід MM/QM використано у дослідженні для вибору потенційних інгібіторів протеази Mpro зі схвалених FDA препаратів [134]. Молекулярний докінг 1615 схвалених FDA препаратів завершився попередньо відібраними 62 кандидатами. На наступному етапі MD моделювання комплексів білок-ліганд ще більше зменшило пул кандидатів до 26 молекул. На завершальній стадії відібрані 26 молекул обробляли псевдоквантово-механічним (ANI) силовим полем, яке було навчено моделями нейронної мережі на точках розрахунку даних DFT, так що аналіз MD вільної енергії зменшивостаточний вибір лише до 9 препаратів [134].

Сучасні методології обчислювального моделювання для виявлення нових агентів проти COVID-19 використовують складні робочі процеси, що поєднують кілька інструментів, таких як віртуальний скринінг великих хімічних просторів на основі фармакофора, молекулярний докінг попередньо відібраних кандидатів і атомістичне MD моделювання комплексів білок-ліганд для відібраних лігандів з подальшим обчисленням вільної енергії зв'язування. А також ефективно поєднують методи молекулярного моделювання з методами машинного навчання та моделями нейронних мереж. Обчислювальна хімія та структурний дизайн вважаються рушійною силою у відкритті маломолекулярних ліків для невідкладної терапії проти коронавірусу SARS-CoV-2.

2. РОЗРАХУНКОВА ЧАСТИНА

2.1. Генерація віртуальної еволюційної бібліотеки енсїтрелвіру

З метою створення бібліотеки нових молекул, які є структурно-подібними до вихідної структури енсїтрелвіру існує декілька підходів. Перспективним є метод генерації віртуальної бібліотеки аналогів енсїтрелвіру за допомогою програмного забезпечення DataWarrior [135]. Для побудови бібліотеки використовувався еволюційний алгоритм, який відтворює природну еволюцію лікоподібних речовин. Процедура створення нових молекул була наступною: Алгоритм брав за основу молекулу енсїтрелвіру (1) (рис. 1.5), яка називалася першим поколінням. Потім було створено серію подібних похідних шляхом застосування незначної випадкової структурної модифікації батьківської структури. Кожна нова структурна модифікація потім оцінювалася щодо того, наскільки вона відповідає дев'яти вибраним критеріям придатності, таким як M_w , cLogP, площа полярної поверхні (PSA) [136], молекулярна форма, гнучкість тощо (Таблиця 2.1).

Таблиця 2.1 - Вибрані критерії придатності та їх параметри використовуються для створення віртуальної еволюційної бібліотеки аналогів енсїтрелвіру

Критерії придатності	Налаштування
Кількість генерацій	25
Кількість похідних у одній генерації	2048
Кількість похідних, що відбираються з однієї генерації	256
Структурна подібність	алгоритм OrgFunctions
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 зв'язків, що обертаються	4-8

Структурні мутації, які найкраще відповідають цим критеріям, мають більшу ймовірність. Нові аналоги в поточному поколінні розташовувалися відповідно до цих критеріїв, так що молекули з найвищим рангом цього покоління вибиралися для виживання та формування батьківських молекул для наступного покоління. Дотримуючись цього еволюційного алгоритму, було створено двадцять п'ять поколінь із загальною кількістю 6334 віртуальних аналогів енсїтрелвіру.

На рис. 2.1 представлений графічний інтерфейс програми DataWarrior, що вміщує перші 30 нових віртуальних похідних енсїтрелвіру.

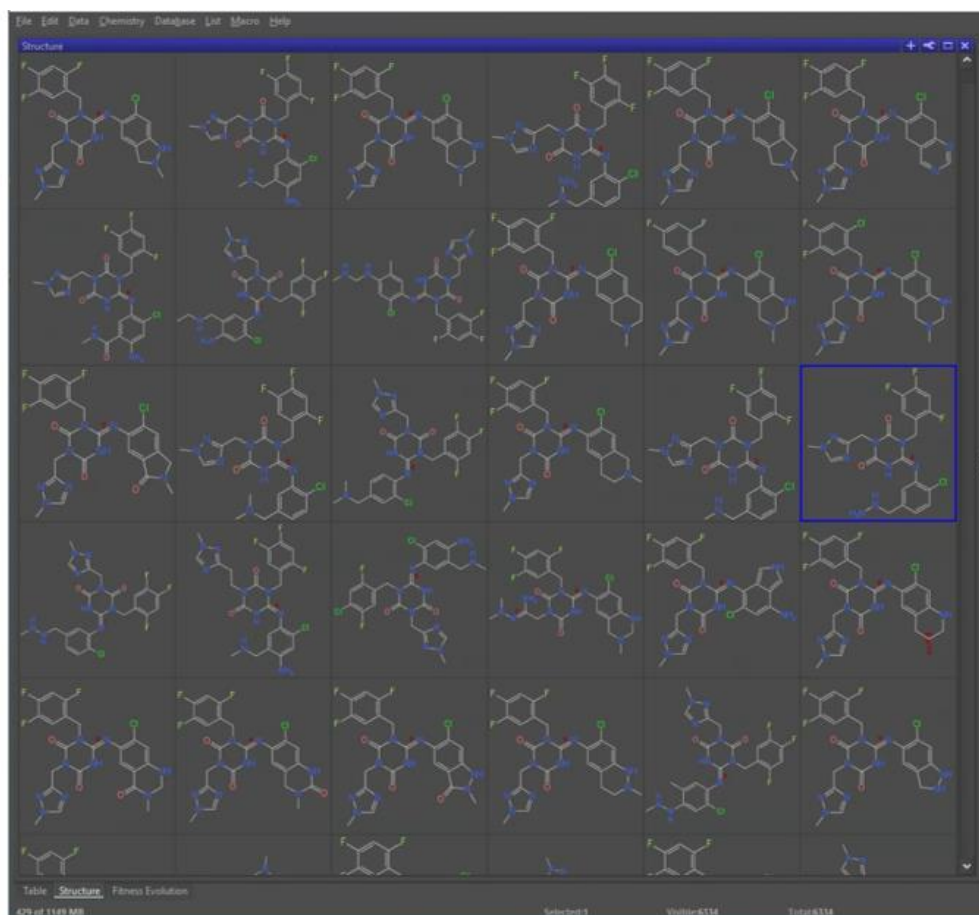
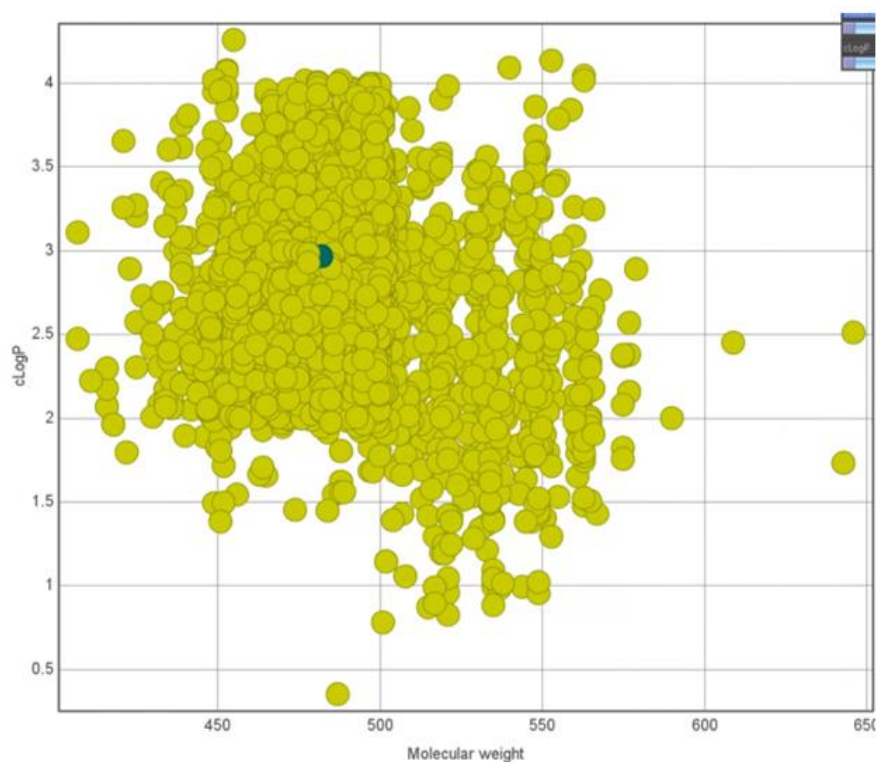
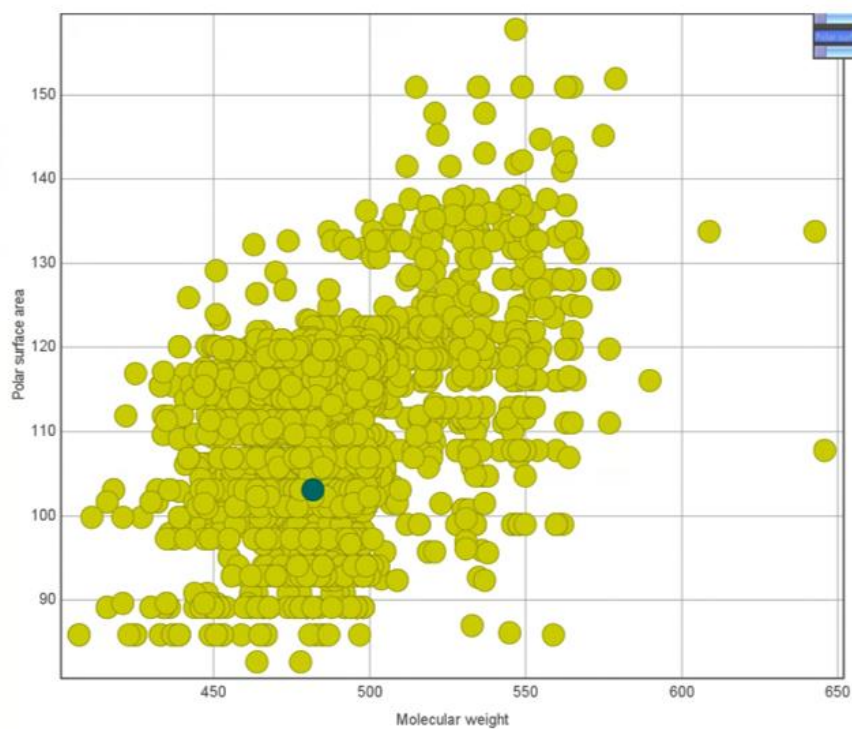


Рисунок 2.1 - Приклад графічного інтерфейсу програми DataWarrior зі згенерованою еволюційною бібліотекою на основі енсїтрелвіру.

Генерація еволюційної бібліотеки похідних енсїтрелвіру відбувалася не тільки за структурно-варіативним принципом, а також з використанням критеріїв придатності (таблиця 2.1), таких як $400 \text{ г/моль} < M_w < 500 \text{ г/моль}$, $80 \text{ \AA}^2 < PSA < 120 \text{ \AA}^2$, $2 < cLogP < 4$. На рисунку 2.2 показано двовимірний розподіл цих двох параметрів у згенерованій бібліотеці, який відповідає симетричному розподілу.



а



б

Рисунок 2.2 - Двовимірний графік розподілу молекулярної маси в порівнянні з параметрами cLogP (а) і PSA (б) для створеної еволюційної бібліотеки.

2.2. 3D Фармакофорний скринінг

Створена еволюційна бібліотека є досить великою для перевірки її напряму методом молекулярного докінгу. Тому напочатку бібліотека була додатково проаналізована та відфільтрована *in silico* за критерієм відповідності кожної нової молекули відносно 3D моделі фармакофора енсїтрелвіру. Фармакофорна модель була створена за допомогою програмного пакету LigandScout [137] (рис. 2.3) на основі першої доступної кристалічної структури енсїтрелвіру у комплексі з M^{pro} (PDB: 8HEF) [92]. Процедура скринінгу відносно фармакофорної моделі енсїтрелвіру дозволила зменшити хімічний простір бібліотеки з 6334 віртуальних молекул до 41 активних похідних енсїтрелвіру, які мають фармакофорну структурну подібність до початкової структури.

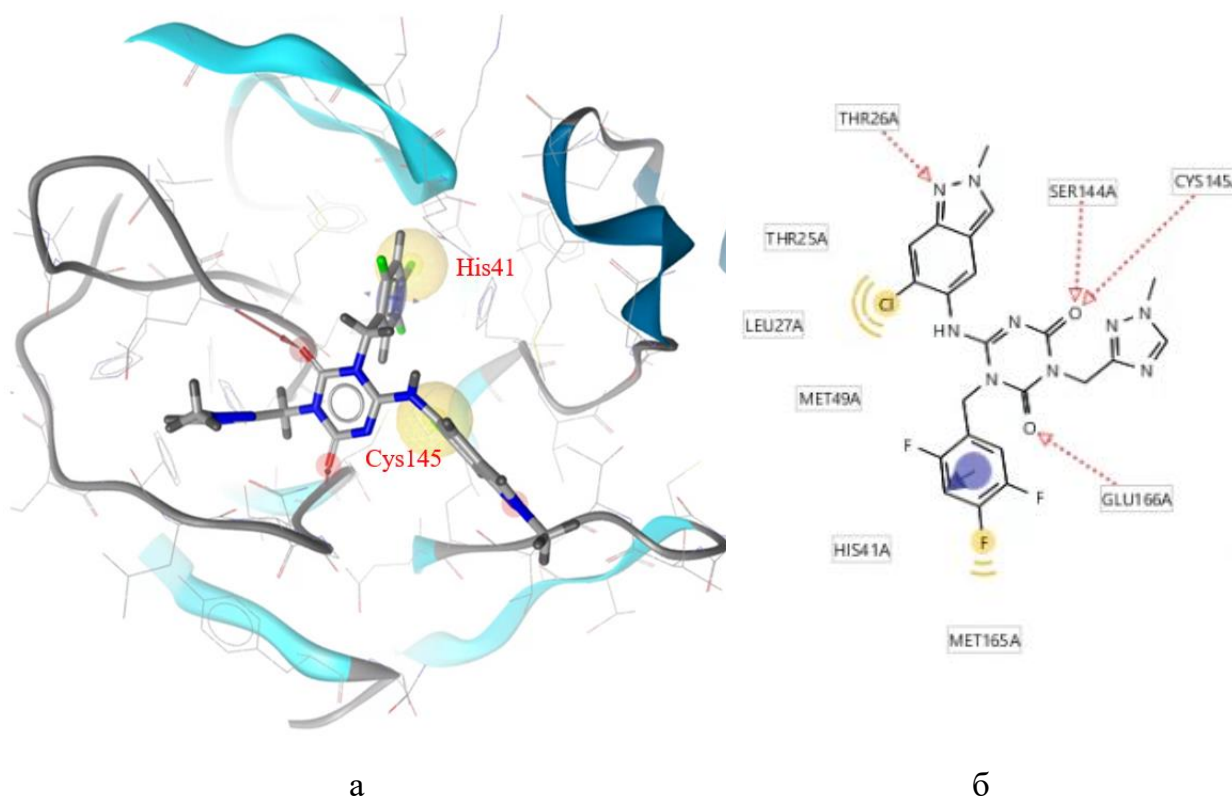


Рисунок 2.3 - (а) 3D модель фармакофора енсїтрелвіру, побудована на основі його кристалічної структури у комплексі з M^{pro} (PDB: 8HEF). Позначені залишки His41 і Cys145 є активним центром M^{pro} . (б) Схема міжмолекулярних взаємодій енсїтрелвіру з ключовими оточуючими залишками M^{pro} .

2.3. Пошук сполук-лідерів серед еволюційної бібліотеки

З метою пошуку сполук-лідерів серед еволюційної бібліотеки оцінювали спорідненості зв'язування відібраних 32 активних кандидатів на стиковку з M^{pro}, розрахунком молекулярного докінгу за допомогою програмного забезпечення LigandScout [137]. Програмний пакет LigandScout використовує вбудовану версію популярного методу молекулярного докінгу AutoDock Vina. Для калібрування та валідації алгоритму стикування ліганд-протеаза було виконано докінг енсїтрелвіру та проведено порівняння його геометрії з відповідними рентгеноструктурними даними.

Для відібраних інгібіторів основної протеази M^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2 був проведений молекулярний докінг. З бази даних Brookhaven Protein Data Bank взято просторову структуру головної протеази M^{pro} (PDB ID: 8HEF) [92]. Ліганд та молекули води, які не використовувалися у докінгу, було видалено зі структури протеази. Програму AutoDock Tools (ADT) версії 1.5.7 використано для приготування рецептора та лігандів [138]. У даній програмі здійснено розрахунок зарядів Гастейгера лігандів та рецептора, додавання полярних атомів водню на кристалографічну структуру. Програмне забезпечення AutoDock Vina 1.1.2 [139], вбудоване до програмного пакету LigandScout [137], застосовано для розрахунку молекулярного докінгу, який проводився методом напівгнучкого стикування. Даний підхід залишав рецептор жорстким, тоді як молекули ліганду вважалися конформаційно гнучкими. Генетичний алгоритм Ламарка використовувався у Autodock Vina як параметр дослідження. Параметри кубічної комірки в області взаємодії рецептору M^{pro} (область активного центру біля His41 і Cys145), становили 24×26×26 Å. Декартові координати центру сітки становили x=38,213, y=-16,645 і z=21,111. За центр сітки вважали середину простору між залишками His41 і Cys145 активного центру; інтервал між точками сітки становив 1 Å (рис. 2.4). Вичерпність була встановлена на 64, а кількість режимів зв'язування – на 9 для всіх дослідів. Три незалежних тести було проведено для кожного ліганду з використанням генератора випадкових чисел. Найбільшу спорідненість зв'язування ліганду визначено за найкращим режимом стикування. Програму VMD 1.9.3 використали для молекулярної графіки та візуалізації [57].

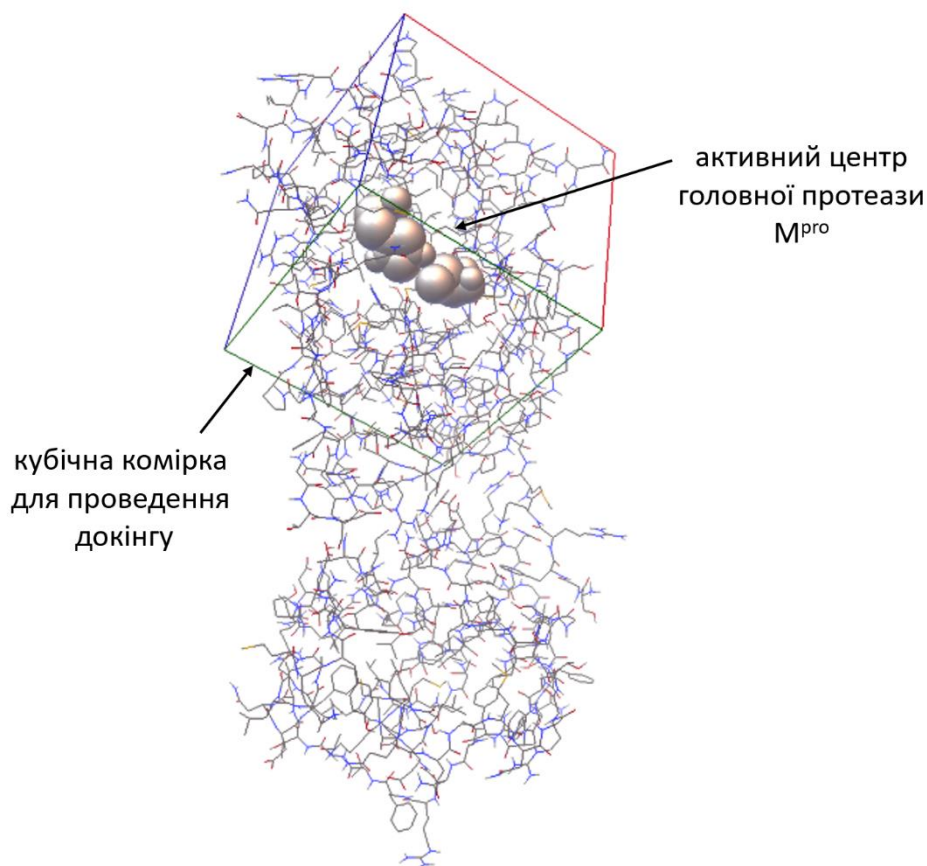


Рисунок 2.4 - Кубічна комірка для проведення докінгу головної протеази M^{pro} SARS-CoV-2.

Енсітрелвір зарекомендував себе як ефективний інгібітор протеази M^{pro} при лікуванні COVID-19. Тому структура енсітрелвіру є перспективною основою для дизайну та створення нових більш ефективних противірусних препаратів. Враховуючи складний багатостадійний синтез цього препарату, дизайн таких препаратів повинен починатися з комп'ютерного аналізу та прогнозування взаємозв'язку між будовою похідних енсітрелвіру та їхньої спорідненості до активного центру M^{pro} . Результати молекулярного докінгу енсітрелвіру та експериментальні кристалографічні дані його комплексу з M^{pro} (PDB: 8HEF) добре узгоджуються (рис. 2.5), що дозволяє використовувати цей метод для кількісного аналізу спорідненості до M^{pro} нових похідних енсітрелвіру.

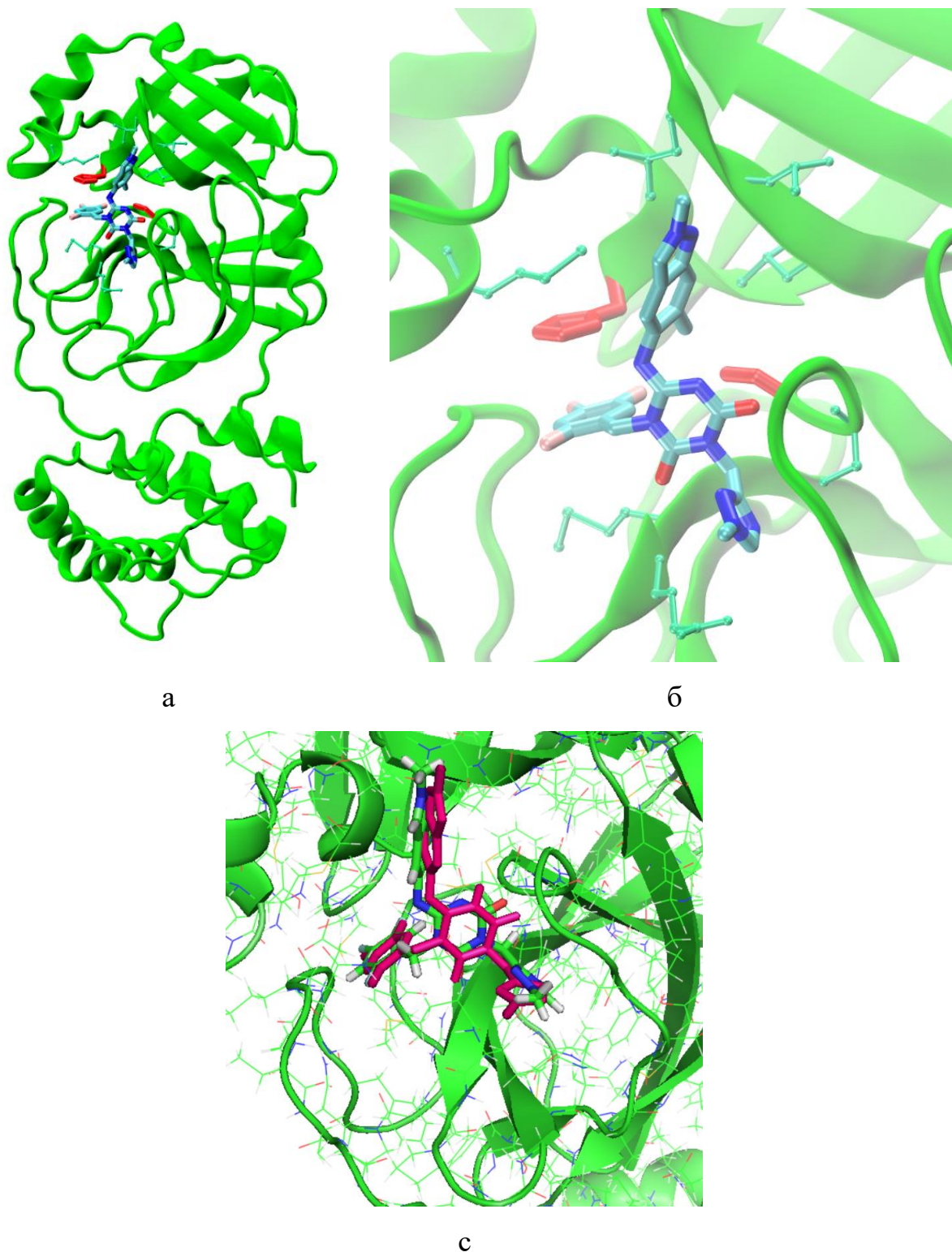
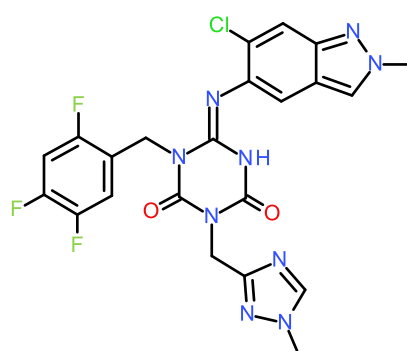


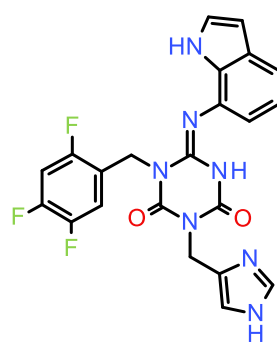
Рисунок 2.5 - (а, б) Конфігурація включення енсітрелвіру в активний центр протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2 (PDB: 8NEF). Каталітичні амінокислотні залишки His41 і Cys145 активного центру протеази показані *червоним*. (в) Порівняння результатів молекулярного докінгу енсітрелвіру з його кристалографічною структурою у комплексі з M^{pro}. Конфігурація ліганду за результатами молекулярного докінгу показано рожевим кольором.

Результати молекулярного докінгу для відібраних 41 активних похідних показали, що серед них 10 аналогів виявили вищу спорідненість зв'язування з M^{pro} , ніж вихідний енсітрелвір. На рис. 2.6-2.7 наведено структуру 5 найкращих лігандів-лідерів з їх енергетичними характеристиками взаємодії протеаза-ліганд. У якості енергетичних критеріїв зв'язування були обрані наступні параметри: (1) спорідненість зв'язування згідно алгоритму докінгу AutoDock Vina. (2) Інтегральний показник спорідненості зв'язування (Binding Affinity Score), розрахований програмним пакетом LigandScout. Цей показник враховує, як ентальпію зв'язування білок-ліганд, так і враховує вплив розчинника. Цей параметр вважається найбільш репрезентативним і тому був вибраний нами для відбору лігандів-лідерів.



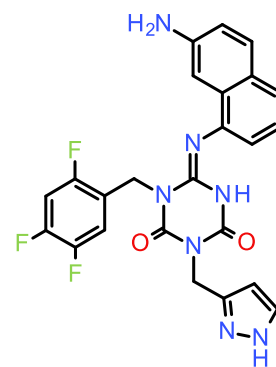
енсітрелвір (1)

LigandScout Score: -22.3



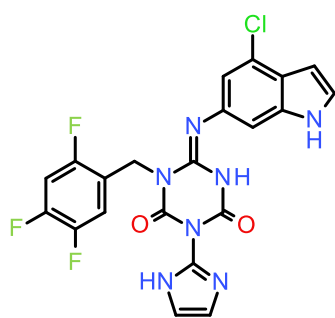
2

LigandScout Score: -28.9



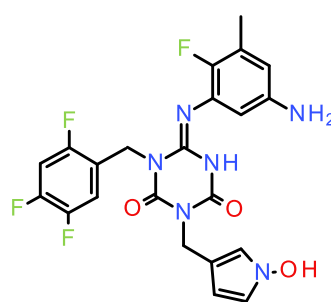
3

LigandScout Score: -24.9



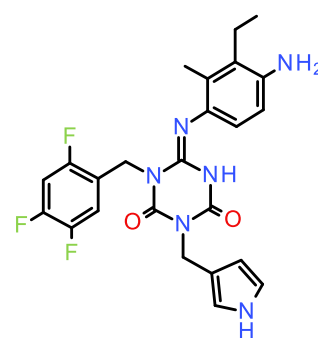
4

LigandScout Score: -33.0



5

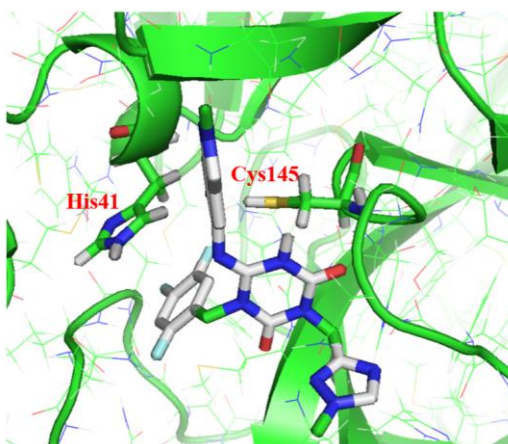
LigandScout Score: -31.1



6

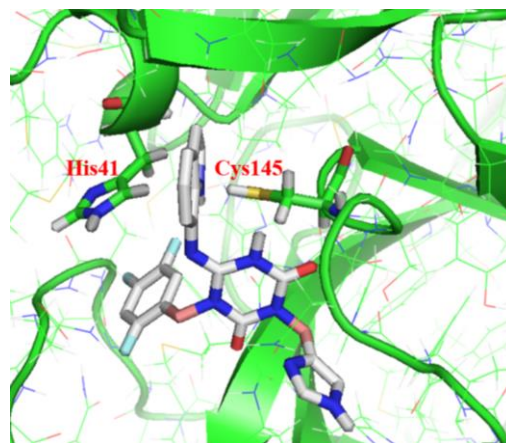
LigandScout Score: -40.8

Рисунок 2.6 - Молекулярна структура енсітрелвіру (1) та його аналогів (2-6), які виявляють вищу спорідненість зв'язування з M^{pro} .



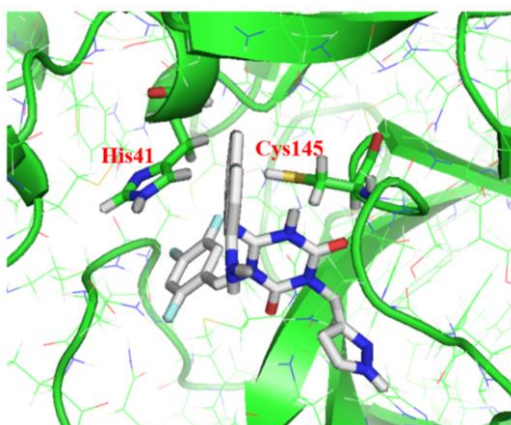
енсітрелвір (1)

Vina: -10.0 kcal/mol



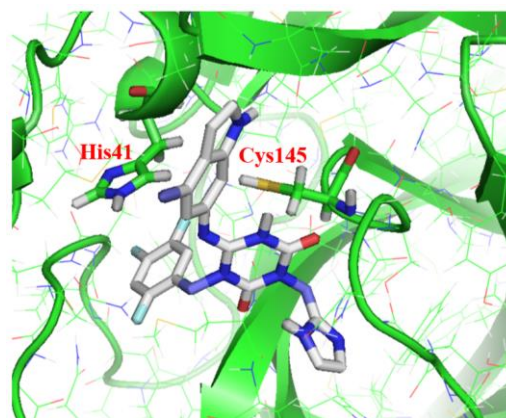
2

Vina: -11.1 kcal/mol



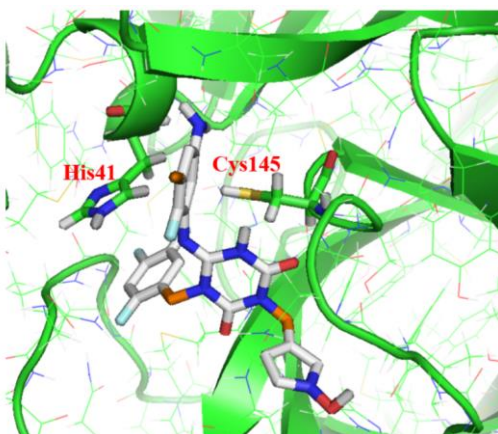
3

Vina: -10.7 kcal/mol



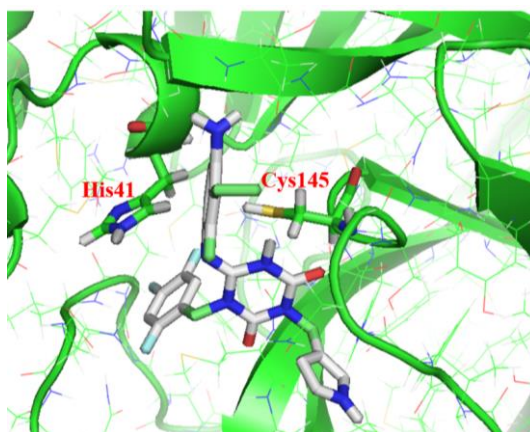
4

Vina: -10.6 kcal/mol



5

Vina: -10.3 kcal/mol



6

Vina: -10.3 kcal/mol

Рисунок 2.7 - Найкращі режими зв'язування енсітрелвіру (1) та його аналогів 2-6 з активним центром протеази M^{pro} вірусу SARS-CoV-2 (PDB: 8HEF).

Характерною структурною рисою зв'язування та стикування відібраних інгібіторів з активним центром M^{pro} є збереження конфігурації трифторметильного фрагменту, яке спостерігається у похідних **2-6** представлених на рис. 2.6-2.7. Спроби замінити 2,4,5-трифторметильну частину енсїтрелвіру не сприяли зв'язуванню. Підвищення загальної спорідненості зв'язування зазначених інгібіторів відбуваються за рахунок структурних модифікацій протилежної частини молекули. Основні структурні модифікації, які відбулися в інгібіторах **2-6** зосереджені у двох фрагментах молекули енсїтрелвіру, а саме, у 1-метил-1Н-1,2,4-тріазольному і 6-хлор-2-метил-2Н-індазольному фрагментах (рис. 2.6).

Результати рис. 2.6-2.7 свідчать про те, що збільшення ентальпії зв'язування та підвищення інтегрального показника спорідненості відбувається внаслідок таких парних структурних модифікацій вихідної структури енсїтрелвіру (**1**): заміна метил-1,2,4-тріазолу і 6-хлор-2-метил-2Н-індазолу на, відповідно, імідазольний цикл і індолий цикл (сполука **2**), на піразольний цикл і амінонафтол (сполука **3**), хлоріндол і імідазольний цикл (сполука **4**), фторметиланілін і гідроксипірольний цикл (сполука **5**), етилметиланілін і пірольний цикл (сполука **6**). Дані модифікації вочевидь сприяють збільшенню противірусної дії похідних енсїтрелвіру.

3. ВИСНОВКИ

Сучасні підходи для пошуку новітніх потенційних лікарських засобів активно використовують методи комп'ютерного моделювання. У кваліфікаційній роботі досліджено міжмолекулярні взаємодії ліганд-білок з використанням методу молекулярного докінгу, розраховано оптимальну геометрію стикування похідних енсїтрелвіру з активним центром основної хімотрипсин-подібної протеази M^{pro} коронавірусу SARS-CoV-2 та встановлено наступне:

- створено еволюційну бібліотеку з 6334 структурно-подібних похідних енсїтрелвіру з використанням критеріїв придатності, таких, як Mw, cLogP, площа полярної поверхні, структурна та конформаційна подібність, гнучкість та форма молекули. Подальша фільтрація бібліотеки за критерієм відповідності з 3D фармакофорною моделлю енсїтрелвіру дозволила ідентифікувати 41 похідних-лідера;

- детальний структурно-енергетичний аналіз спорідненості похідних-лідерів з протеазою M^{pro} з використанням методу молекулярного докінгу дозволив відібрати 10 аналогів енсїтрелвіру, які характеризуються кращою спорідненістю до зв'язування з протеазою M^{pro} ніж оригінальний інгібітор енсїтрелвір;

- вперше показано, що основні структурні модифікації, які підвищують загальну противірусну дію інгібітору локалізовані у 1-метил-1H-1,2,4-триазольному і 6-хлор-2-метил-2H-індазольному фрагментах енсїтрелвіру.



СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Yevsieieva L. V., Lohachova K. O., Kyrychenko A., Kovalenko S. M., Ivanov V. V., Kalugin O. N. Main and papain-like proteases as prospective targets for pharmacological treatment of coronavirus SARS-CoV-2. *RSC Adv.* **2023**, 13 (50), 35500-35524.
2. Naseer S., Khalid S., Parveen S., Abbass K., Song H., Achim M. V. COVID-19 outbreak: Impact on global economy. *Front. Public Health* **2022**, 10, 1009393.
3. Lau J. J., Cheng S. M. S., Leung K., Lee C. K., Hachim A., Tsang L. C. H., Yam K. W. H., Chaothai S., Kwan K. K. H., Chai Z. Y. H., Lo T. H. K., Mori M., Wu C., Valkenburg S. A., Amarasinghe G. K., Lau E. H. Y., Hui D. S. C., Leung G. M., Peiris M., Wu J. T. Real-world COVID-19 vaccine effectiveness against the Omicron BA.2 variant in a SARS-CoV-2 infection-naïve population. *Nat. Med.* **2023**, 29 (2), 348–357.
4. Fischer C., Willscher E., Paschold L., Gottschick C., Klee B., Diexer S., Bosurgi L., Dutzmann J., Sedding D., Frese T., Girndt M., Hoell J. I., Gekle M., Addo M. M., Schulze Zur Wiesch J., Mikolajczyk R., Binder M., Schultheiß C. SARS-CoV-2 vaccination may mitigate dysregulation of IL-1/IL-18 and gastrointestinal symptoms of the post-COVID-19 condition. *NPJ Vaccines* **2024**, 9 (1), 23.
5. Carabelli A. M., Peacock T. P., Thorne L. G., Harvey W. T., Hughes J., de Silva T. I., Peacock S. J., Barclay W. S., de Silva T. I., Towers G. J., Robertson D. L. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, 21 (3), 162–177.
6. Markov P. V., Ghafari M., Beer M., Lythgoe K., Simmonds P., Stilianakis N. I., Katzourakis A. The evolution of SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, 21 (6), 361–379.
7. Uriu K., Ito J., Zahradnik J., Fujita S., Kosugi Y., Schreiber G., Sato K. Enhanced transmissibility, infectivity, and immune resistance of the SARS-CoV-2 omicron XBB.1.5 variant. *Lancet. Infect. Dis.* **2023**, 23 (3), 280–281.
8. Wang Z., Yang L. Post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection: A neglected public health issue. *Front. Public Health* **2022**, 10, 908757.
9. Davis H. E., McCorkell L., Vogel J. M., Topol E. J. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, 21 (3), 133–146.

10. Al-Shargi O. Y., Alzaid S. M., Al-Dosari B. S., Alzubaidi A. S. Adverse events associated with COVID-19 treatment and their possible relationship with patient characteristics: A narrative review. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2023**, *13* (5), 41–49.
11. Wang R., Hozumi Y., Yin C., Wei G.-W. Decoding SARSCoV-2 transmission and evolution and ramifications for COVID-19 diagnosis, vaccine, and medicine. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60* (12), 5853–5865.
12. Kumar A., Asghar A., Singh H. N., Faiq M. A., Kumar S., Narayan R. K., Kumar G., Dwivedi P., Sahni C., Jha R. K., Kulandhasamy M., Prasoon P., Sesham K., Kant K., Pandey S. N. SARS-CoV-2 Omicron variant genomic sequences and their epidemiological correlates regarding the end of the pandemic: In silico analysis. *JMIR Bioinform. Biotechnol.* **2023**, *4*, e42700.
13. Wu Cr., Yin Wc., Jiang Y., Xu H. E. Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant: drug design templates for COVID-19, *Acta Pharmacol. Sin.* **2022**, *43*, 3021–3033.
14. Polatoglu 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.
15. Zhu W., Shyr Z., Lo D. C., Zheng W. Viral proteases as targets for coronavirus disease 2019 drug development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2021**, *378* (2), 166–172.
16. Blomberg B., Mohn K. G., Brokstad K. A., Zhou F., Linchausen D. W., Hansen B. A., Lartey S., Onyango T. B., Kuwelker K., Savik M., Bartsch H., Tondel C., Kittang B. R., Cox R. J., Langeland N. Long COVID in a prospective cohort of home-isolated patients. *Nat. Med.* **2021**, *27* (9), 1607–1613.
17. Cheng V. C., Lau S. K., Woo P. C., Yuen K. Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20* (4), 660–694.
18. Shehzadi K., Saba A., Yu M., Liang J. Structure-based drug design of RdRp inhibitors against SARS-CoV-2. *Top. Curr. Chem. (Cham)* **2023**, *381* (5), 22.
19. Park G. J., Osinski A., Hernandez G., Eitson J. L., Majumdar A., Tonelli M., Henzler-Wildman K., Pawłowski K., Chen Z., Li Y., Schoggins J. W., Tagliabracci V. S. The mechanism of RNA capping by SARS-CoV-2. *Nat.* **2022**, *609* (7928), 793–800.

20. Malone B., Urakova N., Snijder E. J., Campbell E. A. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, 23 (1), 21–39.
21. 18. Hoang H. D., Naeli P., Alain T., Jafarnejad S. M. Mechanisms of impairment of interferon production by SARS-CoV-2. *Biochem. Soc. Trans.* **2023**, 51 (3), 1047–1056.
22. Chan J. F., Lau S. K., To K. K., Cheng V. C., Woo P. C., Yuen K. Y. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, 28 (2), 465–522.
23. Li G., De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, 19 (3), 149–150.
24. V’Kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, 19 (3), 155–170.
25. Yang H., Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, 19 (11), 685–700.
26. Zhang Q., Xiang R., Huo S., Zhou Y., Jiang S., Wang Q., Yu F. Molecular mechanism of interaction between SARSCoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, 6 (1), 233.
27. Hanson Q. M., Wilson K. M., Shen M., Itkin Z., Eastman R. T., Shinn P., Hall M. D. 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), 1352–1360.
28. 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), 1734–1749.
29. Walker A. P., Fan H., Keown J. R., Knight M. L., Grimes J. M., Fodor E. The SARS-CoV-2 RNA polymerase is a viral RNA capping enzyme. *Nucleic Acids Res.* **2021**, 49 (22), 13019–13030.
30. Yin W., Mao C., Luan X., Shen D. D., Shen Q., Su H., Wang X., Zhou F., Zhao W., Gao M., Chang S., Xie Y. C., Tian G., Jiang H. W., Tao S. C., Shen J., Jiang Y., Jiang H., Xu Y., Zhang S., Zhang Y., Xu H. E. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science* **2020**, 368 (6498), 1499–1504.

31. Poduri R., Joshi G., Jagadeesh G. Drugs targeting various stages of the SARS-CoV-2 life cycle: Exploring promising drugs for the treatment of Covid-19. *Cell Signal* **2020**, *74*, 109721.

32. Yang H., Yang M., Ding Y., Liu Y., Lou Z., Zhou Z., Sun L., Mo L., Ye S., Pang H., Gao G. F., Anand K., Bartlam M., Hilgenfeld R., Rao Z. The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100* (23), 13190–13195.

33. Sacco M. D., Ma C., Lagarias P., Gao A., Townsend J. A., Meng X., Dube P., Zhang X., Hu Y., Kitamura N., Hurst B., Tarbet B., Marty M. T., Kolocouris A., Xiang Y., Chen Y., Wang J. Structure and inhibition of the SARS-CoV-2 main protease reveal strategy for developing dual inhibitors against M^{pro} and cathepsin L. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (50), eabe0751.

34. 21. MacDonald E. A., Frey G., Namchuk M. N., Harrison S. C., Hinshaw S. M., Windsor I. W. Recognition of divergent viral substrates by the SARS-CoV-2 main protease. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7* (9), 2591-2595.

35. Zagórska A., Czopek A., Fryc M., Jończyk J. Inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}) as anti-coronavirus agents. *Biomolecules* **2024**, *14* (7), 797.

36. Kuzikov M., Costanzi E., Reinshagen J., Esposito F., Vangeel L., Wolf M., Ellinger B., Claussen C., Geisslinger G., Corona A., Iaconis D., Talarico C., Manelfi C., Cannalire R., Rossetti G., Gossen J., Albani S., Musiani F., Herzog K., Ye Y., Giabbai B., Demitri N., Jochmans D., Jonghe S., Rymenants J., Summa V., Tramontano E., Beccari A. R., Leyssen P., Storici P., Neyts J., Gribbon P., Zaliani A. Identification of inhibitors of SARS-CoV-2 3CL-Pro enzymatic activity using a small molecule in vitro repurposing screen. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**, *4* (3), 1096-1110.

37. Ma C., Xia Z., Sacco M. D., Hu Y., Townsend J. A., Meng X., Choza J., Tan H., Jang J., Gongora M. V., Zhang X., Zhang F., Xiang Y., Marty M. T., Chen Y., Wang J. Discovery of di- and trihaloacetamides as covalent SARS-CoV-2 main protease inhibitors with high target specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (49), 20697-20709.

38. Paul A. S., Islam R., Parves M. R., Mamun A. A., Shahriar I., Hossain M. I., Hossain M. N., Ali M. A., Halim M. A. Cysteine focused covalent inhibitors against the main protease of SARS-CoV-2. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2022**, *40* (4), 1639-1658.

39. Yang Y., Luo Y. D., Zhang C. B., Xiang Y., Bai X. Y., Zhang D., Fu Z. Y., Hao R. B., Liu X. L. Progress in research on inhibitors targeting SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}). *ACS Omega* **2024**, 9 (32), 34196-34219.
40. Qomara, W.F.; Primanissa, D.N.; Amalia, S.H.; Purwadi, F.V.; Zakiyah, N. Effectiveness of remdesivir, lopinavir/ritonavir, and favipiravir for COVID-19 treatment: A systematic review. *Int. J. Gen. Med.* **2021**, 14, 8557–8571.
41. De Cesco S., Kurian J., Dufresne C., Mittermaier A. K., Moitessier N. Covalent inhibitors design and discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 138, 96–114.
42. Strelow J. M. A perspective on the kinetics of covalent and irreversible inhibition. *SLAS Discov.* **2017**, 22 (1), 3–20.
43. 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 SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* **2020**, 582 (7811), 289–293.
44. Manandhar A., Srinivasulu V., Hamad M., Tarazi H., Omar H., Colussi D. J., Gordon J., Childers W., Klein M. L., Al-Tel T. H., Abou-Gharbia M., Elokely K. M. Discovery of novel small-molecule inhibitors of SARS-CoV-2 main protease as potential leads for COVID-19 treatment. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, 61 (9), 4745-4757.
45. Vuong W., Khan M. B., Fischer C., Arutyunova E., Lamer T., Shields J., Saffran H. A., McKay R. T., van Belkum M. J., Joyce M. A., Young H. S., Tyrrell D. L., Vederas J. C., Lemieux M. J. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat. Commun.* **2020**, 11 (1), 4282.
46. Huang C., Shuai H., Qiao J., Hou Y., Zeng R., Xia A., Xie L., Fang Z., Li Y., Yoon C., Huang Q., Hu B., You J., Quan B., Zhao X., Guo N., Zhang S., Ma R., Zhang J., Wang Y., Yang R., Zhang S., Nan J., Xu H., Wang F., Lei J., Chu H., Yang S. A new generation M^{pro} inhibitor with potent activity against SARS-CoV-2 Omicron variants. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2023**, 8 (1), 128.
47. Owen D. R., Allerton C. M. N., Anderson A. S., Aschenbrenner L., Avery M., Berritt S., Boras B., Cardin R. D., Carlo A., Coffman K. J., Dantonio A., Di L., Eng H., Ferre R., Gajiwala K. S., Gibson S. A., Greasley S. E., Hurst B. L., Kadar E. P., Kalgutkar A. S., Lee J. C., Lee J., Liu W., Mason S. W., Noell S., Novak J. J., Obach R. S., Ogilvie

K., Patel N. C., Pettersson M., Rai D. K., Reese M. R., Sammons M. F., Sathish J. G., Singh R. S. P., Steppan C. M., Stewart A. E., Tuttle J. B., Updyke L., Verhoest P. R., Wei L., Yang Q., Zhu Y. An oral SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science* **2021**, 374 (6575), 1586-1593.

48. Krüger N., Kronenberger T., Xie H., Rocha C., Pöhlmann S., Su H., Xu Y., Laufer S. A., Pillaiyar T. Discovery of polyphenolic natural products as SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors for COVID-19. *Pharmaceuticals (Basel)* **2023**, 16 (2), 190.

49. Shi T. H., Huang Y. L., Chen C. C., Pi W. C., Hsu Y. L., Lo L. C., Chen W. Y., Fu S. L., Lin C. H. Andrographolide and its fluorescent derivative inhibit the main proteases of 2019-nCoV and SARS-CoV through covalent linkage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, 533 (3), 467-473.

50. Khanfar M. A., Salaas N., Abumostafa R. Discovery of natural-derived M^{pro} inhibitors as therapeutic candidates for COVID-19: Structure-based pharmacophore screening combined with QSAR analysis. *Mol. Inform.* **2023**, 42 (4), e2200198.

51. Samad A., Ajmal A., Mahmood A., Khurshid B., Li P., Jan S. M., Rehman A. U., He P., Abdalla A. N., Umair M., Hu J., Wadood A. Identification of novel inhibitors for SARS-CoV-2 as therapeutic options using machine learning-based virtual screening, molecular docking and MD simulation. *Front. Mol. Biosci.* **2023**, 10, 1060076.

52. Pillai U. J., Cherian L., Taunk K., Iype E., Dutta M. Identification of antiviral phytochemicals from cranberry as potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}). *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, 261 (1), 129655.

53. Ambrosio F. A., Costa G., Romeo I., Esposito F., Alkhatib M., Salpini R., Svicher V., Corona A., Malune P., Tramontano E., Ceccherini-Silberstein F., Alcaro S., Artese A. Targeting SARS-CoV-2 main protease: A successful story guided by an *in silico* drug repurposing approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2023**, 63 (11), 3601-3613.

54. Wu C. Y., Jan J. T., Ma S. H., Kuo C. J., Juan H. F., Cheng Y. S., Hsu H. H., Huang H. C., Wu D., Brik A., Liang F. S., Liu R. S., Fang J. M., Chen S. T., Liang P. H., Wong C. H. Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101 (27), 10012-10017.

55. Rothan H. A., Teoh T. C. Cell-based high-throughput screening protocol for discovering antiviral inhibitors against SARS-COV-2 main protease (3CL^{pro}). *Mol. Biotechnol.* **2021**, 63 (3), 240-248.

56. Zhu W., Xu M., Chen C. Z., Guo H., Shen M., Hu X., Shinn P., Klumpp-Thomas C., Michael S. G., Zheng W. Identification of SARS-CoV-2 3CL protease inhibitors by a quantitative high-throughput screening. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, 3 (5), 1008–1016.
57. Narayanan A., Narwal M., Majowicz S. A., Varricchio C., Toner S. A., Ballatore C., Brancale A., Murakami K. S., Jose J. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors targeting Mpro and PLpro using in-cell-protease assay. *Commun. Biol.* **2022**, 5 (1), 169.
58. Zhang J., Yan H., Yan G., Liu X., Wang Y., Chen Y. Protocol for high-throughput screening of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using a robust fluorescence polarization assay. *STAR Protoc.* **2022**, 3 (4), 101794.
59. Zang Y., Su M., Wang Q., Cheng X., Zhang W., Zhao Y., Chen T., Jiang Y., Shen Q., Du J., Tan Q., Wang P., Gao L., Jin Z., Zhang M., Li C., Zhu Y., Feng B., Tang B., Xie H., Wang M. W., Zheng M., Pan X., Yang H., Xu Y., Wu B., Zhang L., Rao Z., Yang X., Jiang H., Xiao G., Zhao Q., Li J. High-throughput screening of SARS-CoV-2 main and papain-like protease inhibitors. *Protein Cell.* **2022**, 14 (1), 17-27.
60. Smith E., Davis-Gardner M. E., Garcia-Ordóñez R. D., Nguyen T. T., Hull M., Chen E., Yu X., Bannister T. D., Baillargeon P., Scampavia L., Griffin P., Farzan M., Spicer T. P. High throughput screening for drugs that inhibit 3C-like protease in SARS-CoV-2. *SLAS Discov.* **2023**, 28 (3), 95-101.
61. Dai W., Zhang B., Jiang X. M., Su H., Li J., Zhao Y., Xie X., Jin Z., Peng J., Liu F., Li C., Li Y., Bai F., Wang H., Cheng X., Cen X., Hu S., Yang X., Wang J., Liu X., Xiao G., Jiang H., Rao Z., Zhang L. K., Xu Y., Yang H., Liu H. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science* **2020**, 368 (6497), 1331-1335.
62. Lockbaum G. J., Reyes A. C., Lee J. M., Tilvawala R., Nalivaika E. A., Ali A., Kurt Yilmaz N., Thompson P. R., Schiffer C. A. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease in complex with the non-covalent inhibitor ML188. *Viruses* **2021**, 13 (2), 174.
63. Balaramnavar V. M., Ahmad K., Saeed M., Ahmad I., Kamal M., Jawed T. Pharmacophore-based approaches in the rational repurposing technique for FDA approved drugs targeting SARS-CoV-2 M^{pro}. *RSC Adv.* **2020**, 10 (66), 40264-40275.

64. Trivedi G. N., Karlekar J. T., Dhimmkar K., Panchal H. Fbddd: In-silico strategy to inhibit Mpro activity using drugs from previous outbreaks. *J. Exp. Biol. Agric. Sci.* **2021**, 9 (4), 472–480.
65. Lee J. Y., Kuo C. J., Shin J. S., Jung E., Liang P. H., Jung Y. S. Identification of non-covalent 3C-like protease inhibitors against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 via virtual screening of a Korean compound library. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, 42, 128067.
66. Luo D., Tong J. B., Zhang X., Xiao X. C., Bian S. Computational strategies towards developing novel SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors against COVID-19. *J. Mol. Struct.* **2022**, 1247, 131378.
67. Zhai T., Zhang F., Haider S., Kraut D., Huang Z. An integrated computational and experimental approach to identifying inhibitors for SARS-CoV-2 3CL protease. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, 8, 661424.
68. Mercorelli B., Desantis J., Celegato M., Bazzacco A., Siragusa L., Benedetti P., Eleuteri M., Croci F., Cruciani G., Goracci L., Loregian A. Discovery of novel SARS-CoV-2 inhibitors targeting the main protease M^{pro} by virtual screenings and hit optimization. *Antiviral. Res.* **2022**, 204, 105350.
69. Rossetti G. G., Ossorio M. A., Rempel S., Kratzel A., Dionellis V. S., Barriot S., Tropia L., Gorgulla C., Arthanari H., Thiel V., Mohr P., Gamboni R., Halazonetis T. D. Non-covalent SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors developed from in silico screen hits. *Sci. Rep.* **2022**, 12 (1), 2505.
70. Gante J. Peptidomimetics – tailored enzyme inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33 (17), 1699–1720.
71. Hirschmann R. Medicinal chemistry in the golden age of biology: Lessons from steroid and peptide research. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30 (10), 1278–1301.
72. Rizo J., Gierasch L. M. Constrained peptides: Models of bioactive peptides and protein substructures. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, 61, 387–416.
73. Citarella A., Scala A., Piperno A., Micale N. SARS-CoV-2 Mpro: A potential target for peptidomimetics and small-molecule inhibitors. *Biomolecules* **2021**, 11 (4), 607
74. Somboon T., Mahalapbutr P., Sanachai K., Maitarad P., Lee V. S., Hannongbua S., Rungrotmongkol T. Computational study on peptidomimetic inhibitors against SARS-CoV-2 main protease. *J. Mol. Liq.* **2021**, 322, 114999.

75. Shindo N., Ojida A. Recent progress in covalent warheads for in vivo targeting of endogenous proteins. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, 47, 116386.
76. Zhang L., Lin D., Kusov Y., Nian Y., Ma Q., Wang J., Von Brunn A., Leyssen P., Lanko K., Neyts J., de Wilde A., Snijder E. J., Liu H., Hilgenfeld R. α -Ketoamides as broad-spectrum inhibitors of coronavirus and enterovirus replication: Structure-based design, synthesis, and activity assessment. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (9), 4562–4578.
77. Chuck C. P., Chen C., Ke Z., Wan D. C., Chow H. F., Wong K. B. Design, synthesis and crystallographic analysis of nitrile-based broad-spectrum peptidomimetic inhibitors for coronavirus 3C-like proteases. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 59, 1-6.
78. Jain R. P., Pettersson H. I., Zhang J., Aull K. D., Fortin P. D., Huitema C., Eltis L. D., Parrish J. C., James M. N., Wishart D. S., Vederas J. C. Synthesis and evaluation of keto-glutamine analogues as potent inhibitors of severe acute respiratory syndrome 3CLpro. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (25), 6113-6116.
79. Zhu L., George S., Schmidt M. F., Al-Gharabli S. I., Rademann J., Hilgenfeld R. Peptide aldehyde inhibitors challenge the substrate specificity of the SARS-coronavirus main protease. *Antiviral. Res.* **2011**, 92 (2), 204-212.
80. Lee T. W., Cherney M. M., Huitema C., Liu J., James K. E., Powers J. C., Eltis L. D., James M. N. Crystal structures of the main peptidase from the SARS coronavirus inhibited by a substrate-like aza-peptide epoxide. *J. Mol. Biol.* **2005**, 353 (5), 1137-1151.
81. Wang F., Chen C., Yang K., Xu Y., Liu X., Gao F., Liu H., Chen X., Zhao Q., Liu X., Cai Y., Yang H. Michael acceptor-based peptidomimetic inhibitor of main protease from porcine epidemic diarrhea virus. *J. Med. Chem.* **2017**, 60 (7), 3212-3216.
82. Pillaiyar T., Meenakshisundaram S., Manickam M. Recent discovery and development of inhibitors targeting coronaviruses. *Drug. Discov. Today* **2020**, 25 (4), 668-688.
83. Hoffman R. L., Kania R. S., Brothers M. A., Davies J. F., Ferre R. A., Gajiwala K. S., He M., Hogan R. J., Kozminski K., Li L. Y., Lockner J. W., Lou J., Marra M. T., Mitchell L. J. Jr, Murray B. W., Nieman J. A., Noell S., Planken S. P., Rowe T., Ryan K., Smith G. J. 3rd, Solowiej J. E., Steppan C. M., Taggart B. Discovery of ketone-based covalent inhibitors of coronavirus 3CL proteases for the potential therapeutic treatment of COVID-19. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (21), 12725-12747.

84. Ma C., Sacco M. D., Hurst B., Townsend J. A., Hu Y., Szeto T., Zhang X., Tarbet B., Marty M. T., Chen Y., Wang J. Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease. *Cell Res.* **2020**, 30 (8), 678-692.
85. Mahmoud A., Mostafa A., Al-Karmalawy A. A., Zidan A., Abulkhair H. S., Mahmoud S. H., Shehata M., Elhefnawi M. M., Ali M. A. Telaprevir is a potential drug for repurposing against SARS-CoV-2: computational and *in vitro* studies. *Heliyon* **2021**, 7 (9), e07962.
86. Arafet K., Serrano-Aparicio N., Lodola A., Mulholland A. J., González F. V., Świderek K., Moliner V. Mechanism of inhibition of SARS-CoV-2 M^{pro} by N3 peptidyl Michael acceptor explained by QM/MM simulations and design of new derivatives with tunable chemical reactivity. *Chem. Sci.* **2020**, 12 (4), 1433-1444.
87. Martí S., Arafet K., Lodola A., Mulholland A. J., Świderek K., Moliner V. Impact of warhead modulations on the covalent inhibition of SARS-CoV-2 M^{pro} explored by QM/MM simulations. *ACS Catal.* **2022**, 12 (1), 698-708.
88. Zaidman D., Gehrtz P., Filep M., Fearon D., Gabizon R., Douangamath A., Prilusky J., Duberstein S., Cohen G., Owen C. D., Resnick E., Strain-Damerell C., Lukacik P., Barr H., Walsh M. A., von Delft F., London N. An automatic pipeline for the design of irreversible derivatives identifies a potent SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor. *Cell. Chem. Biol.* **2021**, 28 (12), 1795-1806.e5.
89. Tan B., Sacco M., Tan H., Li K., Joyce R., Zhang X., Chen Y., Wang J. Exploring diverse reactive warheads for the design of SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, 259, 115667.
90. Unoh Y., Uehara S., Nakahara K., Nobori H., Yamatsu Y., Yamamoto S., Maruyama Y., Taoda Y., Kasamatsu K., Suto T., Kouki K., Nakahashi A., Kawashima S., Sanaki T., Toba S., Uemura K., Mizutare T., Ando S., Sasaki M., Orba Y., Sawa H., Sato A., Sato T., Kato T., Tachibana Y. 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), 6499-6512.
91. Noske G. D., de Souza Silva E., de Godoy M. O., Dolci I., Fernandes R. S., Guido R. V. C., Sjö P., Oliva G., Godoy A. S. 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.

92. Yang Y., Cao L., Yan M., Zhou J., Yang S., Xu T., Huang S., Li K., Zhou Q., Li G., Zhu Y., Cong F., Zhang H., Guo D., Li Y., Zhang X. Synthesis of deuterated S-217622 (Emsitrelvir) with antiviral activity against coronaviruses including SARS-CoV-2. *Antiviral. Res.* **2023**, 213, 105586.

93. Duan Y., Zhou H., Liu X., Iketani S., Lin M., Zhang X., Bian Q., Wang H., Sun H., Hong S. J., Culbertson B., Mohri H., Luck M. I., Zhu Y., Liu X., Lu Y., Yang X., Yang K., Sabo Y., Chavez A., Goff S. P., Rao Z., Ho D. D., Yang H. Molecular mechanisms of SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. *Nature* **2023**, 622 (7982), 376-382.

94. Kovalevsky A., Aniana A., Ghirlando R., Coates L., Drago V. N., Wear L., Gerlits O., Nashed N. T., Louis J. M. 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), 18478-18490.

95. Watanabe C., Tanaka S., Okiyama Y., Yuki H., Ohyama T., Kamisaka K., Takaya D., Fukuzawa K., Honma T. Quantum chemical interaction analysis between SARS-CoV-2 main protease and emsitrelvir compared with its initial screening hit. *J. Phys. Chem. Lett.* **2023**, 14 (15), 3609-3620.

96. Bekono B. D., Onguéné P. A., Simoben C. V., Owono L. C. O., Ntie-Kang F. Computational discovery of dual potential inhibitors of SARS-CoV-2 spike/ACE2 and M^{pro}: 3D-pharmacophore, docking-based virtual screening, quantum mechanics and molecular dynamics. *Eur. Biophys. J.* **2024**, 53 (5-6), 277-298.

97. Chhetri S. P., Bhandari V. S., Maharjan R., Lamichhane T. R. Identification of lead inhibitors for 3CL^{pro} of SARS-CoV-2 target using machine learning based virtual screening, ADMET analysis, molecular docking and molecular dynamics simulations. *RSC Adv.* **2024**, 14 (40), 29683-29692.

98. Costacurta F., Dodaro A., Bante D., Schöppe H., Peng J. Y., Sprenger B., He X., Moghadasi S. A., Egger L. M., Fleischmann J., Pavan M., Bassani D., Menin S., Rauch S., Krismer L., Sauerwein A., Heberle A., Rabensteiner T., Ho J., Harris R. S., Stefan E., Schneider R., Dunzendorfer-Matt T., Naschberger A., Wang D., Kaserer T., Moro S., von Laer D., Heilmann E. A comprehensive study of SARS-CoV-2 main protease (M^{pro})

inhibitor-resistant mutants selected in a VSV-based system. *PLoS Pathog.* **2024**, 20 (9), e1012522.

99. Krismer L., Schöppe H., Rauch S., Bante D., Sprenger B., Naschberger A., Costacurta F., Fürst A., Sauerwein A., Rupp B., Kaserer T., von Laer D., Heilmann E. 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.

100. Mizuno A., Nakayoshi T., Kato K., Kurimoto E., Oda A. Computational estimation of residues involving resistance to the SARS-CoV-2 main protease inhibitor ensitrelvir based on virtual alanine scan of the active site. *Biol. Pharm. Bull.* **2024**, 47 (5), 967-977.

101. Borba J. R. B. M., de Araújo L. P., Veloso M. P., da Silveira N. J. F. Applying the bioisosterism strategy to obtain lead compounds against SARS-CoV-2 cysteine proteases: An in-silico approach. *J. Comput. Chem.* **2024**, 45 (1), 35-46.

102. Ren P., Li S., Wang S., Zhang X., Bai F. Computer-aided prediction of the interactions of viral proteases with antiviral drugs: Antiviral potential of broad-spectrum drugs. *Molecules* **2023**, 29 (1), 225.

103. Zhao W., Lupala C. S., Hou S., Yang S., Yan Z., Liao S., Li X., Li N. Assessing the inhibition efficacy of clinical drugs against the main proteases of SARS-CoV-2 variants and other coronaviruses. *Quant. Biol.* **2024**, 12 (3), 324–328.

104. Eltayb W. A., Abdalla M., Rabie A. M. 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), 5234-5246.

105. Hongyu H., Wu T., He F., Chao M., Huang J., Wang X., Niu Z., Tang B. The binding mechanism of failed, in processing and succeed inhibitors target SARS-CoV-2 main protease. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2024**, 42 (20), 10565-10576.

106. Kovalevsky A., Aniana A., Coates L., Bonnesen P. V., Nashed N. T., Louis J. M. Contribution of the catalytic dyad of SARS-CoV-2 main protease to binding covalent and noncovalent inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2023**, 299 (7), 104886.

107. Moghadasi S. A., Heilmann E., Khalil A. M., Nnabuife C., Kearns F. L., Ye C., Moraes S. N., Costacurta F., Esler M. A., Aihara H., von Laer D., Martinez-Sobrido L.,

Palzkill T., Amaro R. E., Harris R. S. Transmissible SARS-CoV-2 variants with resistance to clinical protease inhibitors. *Sci. Adv.* **2023**, 9 (13), eade8778.

108. Kovalevsky A., Aniana A., Coates L., Ghirlando R., Nashed N. T., Louis J. M. Visualizing the active site oxyanion loop transition upon ensitrelvir binding and transient dimerization of SARS-CoV-2 main protease. *J. Mol. Biol.* **2024**, 436 (13), 168616.

109. Lin M., Zeng X., Duan Y., Yang Z., Ma Y., Yang H., Yang X., Liu X. Molecular mechanism of ensitrelvir inhibiting SARS-CoV-2 main protease and its variants. *Commun Biol.* **2023**, 6 (1), 694.

110. Huynh T. N. T., Kieu M. N., Kieu N. H., Nguyen Quoc T. Molecular mechanism of Ensitrelvir and its similarity inhibiting SARS-CoV-2 main protease by molecular dynamics simulation. *Dong Thap University J. Sci.* **2024**, 13 (5), 37-44.

111. Shimizu R., Sonoyama T., Fukuhara T., Kuwata A., Matsuo Y., Kubota R. A Phase 1 Study of Ensitrelvir Fumaric Acid Tablets Evaluating the Safety, Pharmacokinetics and Food Effect in Healthy Adult Populations. *Clin. Drug. Investig.* **2023**, 43 (10), 785-797.

112. Yotsuyanagi H., Ohmagari N., Doi Y., Yamato M., Bac N. H., Cha B. K., Imamura T., Sonoyama T., Ichihashi G., Sanaki T., Tsuge Y., Uehara T., Mukae H. Efficacy and safety of 5-day oral ensitrelvir for patients with mild to moderate COVID-19: The SCORPIO-SR randomized clinical trial. *JAMA Netw. Open.* **2024**, 7 (2), e2354991.

113. Mukae H., Yotsuyanagi H., Ohmagari N., Doi Y., Sakaguchi H., Sonoyama T., Ichihashi G., Sanaki T., Baba K., Tsuge Y., Uehara T. Efficacy and safety of ensitrelvir in patients with mild-to-moderate coronavirus disease 2019: The phase 2b part of a randomized, placebo-controlled, phase 2/3 study. *Clin. Infect. Dis.* **2023**, 76 (8), 1403-1411.

114. Song L., Gao S., Ye B., Yang M., Cheng Y., Kang D., Yi F., Sun J. P., Menéndez-Arias L., Neyts J., Liu X., Zhan P. Medicinal chemistry strategies towards the development of non-covalent SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B* **2024**, 14 (1), 87-109.

115. Yotsuyanagi H., Ohmagari N., Doi Y., Imamura T., Sonoyama T., Ichihashi G., Sanaki T., Tsuge Y., Uehara T., Mukae H. A phase 2/3 study of S-217622 in participants with SARS-CoV-2 infection (Phase 3 part). *Medicine (Baltimore)* **2023**, 102 (8), e33024.

116. Ivanov V., Lohachova K., Kolesnik Y., Zakharov A., Yevsieieva L., Kyrychenko A., Langer T., Kovalenko S. M., Kalugin O. N. Recent advances in computational drug discovery for therapy against coronavirus SARS-CoV-2. *Sci.: Pharm. Sci.* **2023**, 6 (46).

117. Amin S. A., Banerjee S., Singh S., Qureshi I. A., 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), 1827-1838.

118. Chen W., Liu X., Zhang S., Chen S. Artificial intelligence for drug discovery: Resources, methods, and applications. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2023, 31, 691-702.

119. Muratov E. N., Amaro R., Andrade C. H., Brown N., Ekins S., Fourches D., Isayev O., Kozakov D., Medina-Franco J. L., Merz K. M., Oprea T. I., Poroikov V., Schneider G., Todd M. H., Varnek A., Winkler D. A., Zakharov A. V., Cherkasov A., Tropsha A. A critical overview of computational approaches employed for COVID-19 drug discovery. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50 (16), 9121-9151.

120. Nasser M., Yusof U. K., Salim N. Deep learning based methods for molecular similarity searching: A systematic review. *Processes* **2023**, 11 (5).

121. Gentile F., Yaacoub J. C., Gleave J., Fernandez M., Ton A. T., Ban F., Stern A., Cherkasov A. Artificial intelligence-enabled virtual screening of ultra-large chemical libraries with deep docking. *Nat. Protoc.* **2022**, 17 (3), 672–697.

122. Tetko I. V., Gasteiger J., Todeschini R., Mauri A., Livingstone D., Ertl P., Palyulin V. A., Radchenko E. V., Zefirov N. S., Makarenko A. S., Tanchuk V. Y., Prokopenko V. V. Virtual computational chemistry laboratory--design and description. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2005**, 19 (6), 453-463.

123. Yap C. W. PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. *J. Comput. Chem.* **2011**, 32 (7), 1466–1474.

124. Alves V. M., Bobrowski T., Melo-Filho C. C., Korn D., Auerbach S., Schmitt C., Muratov E. N., Tropsha A. QSAR modeling of SARS-CoV M^{pro} inhibitors identifies sufugolix, cenicriviroc, proglumetacin, and other drugs as candidates for repurposing against SARS-CoV-2. *Mol. Inform.* **2021**, 40 (1), e2000113.

125. 82. 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), 160-169.

126. Salo-Ahen O. M. H., Alanko I., Bhadane R., Bonvin A. M. J. J., Honorato R. V., Hossain S., Juffer A. H., Kabedev A., Lahtela-Kakkonen M., Larsen A. S., Lescrinier E., Marimuthu P., Mirza, M. U., Mustafa G., Nunes-Alves A., Pantsar T., Saadabadi A., Singaravelu K., Vanmeert M. Molecular dynamics simulations in drug discovery and pharmaceutical development. *Processes*, 2021, 9 (1), 71.
127. Ahmad M., Dwivedy A., Mariadasse R., Tiwari S., Kar D., Jeyakanthan J., Biswal B. K. Prediction of small molecule inhibitors targeting the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 RNA-dependent RNA polymerase. *ACS Omega* **2020**, 5 (29), 18356-18366.
128. 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.
129. Grottesi A., Bešker N., Emerson A., Manelfi C., Beccari A. R., Frigerio F., Lindahl E., Cerchia C., Talarico C. Computational studies of SARS-CoV-2 3CLpro: Insights from MD simulations. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21 (15), 5346.
130. Muhammad I. A., Muangchoo K., Muhammad A., Ajingi Y. S., Muhammad I. Y., Umar I. D., Muhammad A. B. A computational study to identify potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (Mpro) from Eucalyptus active compounds. *Computation* **2020**, 8 (3), 79.
131. Alamri M. A., Qamar M. T. U. I., Mirza M. U., Bhadane R., Alqahtani S. M., Muneer I., Froeyen M., Salo-Ahen O. M. H. Pharmacoinformatics and molecular dynamics simulation studies reveal potential covalent and FDA-approved inhibitors of SARS-CoV-2 main protease 3CL^{pro}. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, 39 (13), 4936-4948.
132. Kundu D., Selvaraj C., Singh S. K., Dubey V. K. Identification of new anti-nCoV drug chemical compounds from Indian spices exploiting SARS-CoV-2 main protease as target. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, 39 (9), 3428-3434.
133. Coderc de Lacam E. G., Blazhynska M., Chen H., Gumbart J. C., Chipot C. When the dust has settled: Calculation of binding affinities from first principles for SARS-CoV-2 variants with quantitative accuracy. *J. Chem. Theory Comput.* **2022**, 18 (10), 5890-5900.
134. Gupta A., Zhou H. X. Profiling SARS-CoV-2 main protease (M^{PRO}) binding to repurposed drugs using molecular dynamics simulations in classical and neural network-trained force fields. *ACS Comb. Sci.* **2020**, 22 (12), 826-832.

135. 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), 460-473.
136. 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), 3714-3717.
137. 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), 160-169.
138. Goodsell D. S., Morris G. M., Olson A. J. Automated docking of flexible ligands: Applications of AutoDock. *J. Mol. Recognit.* **1996**, 9 (1), 1-5.
139. Trott O., Olson A. J. Autodock vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31 (2), 455-461.