

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**Національний фармацевтичний університет**  
**Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту**  
**Кафедра медичної хімії**

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
на тему: «*IN SILICO* ДОСЛІДЖЕННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ  
**ПРОТИВІРУСНИХ МОЛЕКУЛ ЩОДО ВІРУСНОЇ ПРОТЕАЗИ (M<sup>PRO</sup>)**  
**SARS-COV-2»**

**Виконала:** здобувачка вищої освіти групи

Фс18(4,5з)мед-016

спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація

освітньої програми Фармація

Катерина СИДОРЕНКО

**Керівник:** доцент закладу вищої освіти кафедри  
медичної хімії, к.фарм.н., доцент

Маргарита СУЛЕЙМАН

**Рецензент:** доцент закладу вищої освіти кафедри  
фармацевтичної хімії, д.фарм.н., доцент

Ганна СЕВЕРІНА

## АНОТАЦІЯ

Робота присвячена використанню *in silico* досліджень для пошуку потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази ( $M^{\text{pro}}$ ) SARS-COV-2. Отримані результати докінгової стиковки можуть бути корисними для пошуку майбутніх кандидатів та подальшого проведення експериментального скринінгу. Робота складається із вступу, трьох розділів, висновків, списку використаної літератури, що включає 68 найменувань. Зміст роботи викладено на 47 сторінках машинописного тексту та містить 4 таблиці та 22 малюнки.

*Ключові слова:* SARS-COV-2, вірусна протеаза ( $M^{\text{pro}}$ ), *in silico* дослідження противірусна активність, молекулярний докінг.

## ANNOTATION

The work is devoted to the use of *in silico* study to search for potential antiviral molecules relative to the viral protease ( $M^{\text{pro}}$ ) of SARS-COV-2. The results of the docking docking may be useful for the search for future candidates and further experimental screening. The work consists of an introduction, three sections, conclusions, a list of references, which includes 68 titles. The content of the work is set out on 47 pages of typewritten text and contains 4 tables and 22 figures.

*Key words:* SARS-COV-2, viral protease ( $M^{\text{pro}}$ ), *in silico* study, antiviral activity, molecular docking.

## ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП .....	4
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНІЗМІВ ДІЇ ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ. ОГЛЯД ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ З ПРОТИВІРУСНОЮ АКТИВНІСТЮ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)</b>	7
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1 .....	25
<b>РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ТА АРГУМЕНТАЦІЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ І МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.</b>	26
2.1. Об'єкти досліджень, характеристика структур.....	26
2.2. Обґрунтування вибору молекулярного докінгу як сучасного методу <i>in silico</i> досліджень для прогнозування активності потенційних ліків.....	27
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 2.....	31
<b>РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ ДЛЯ ПОШУКУ ПОТЕНЦІЙНИХ ПРОТИВІРУСНИХ МОЛЕКУЛ ЩОДО ВІРУСНОЇ ПРОТЕАЗИ (M<sup>PRO</sup>) SARS-COV-2</b>	32
3.1. Органайзер кристалографічних мішеней вірусної протеази SARS-COV-2.	37
3.2. Молекулярний докінг потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M <sup>PRO</sup> ) SARS-COV-2.	37
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.....	45
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ .....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	48

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Боротьба між людиною та вірусами продовжується, і обидва швидко вдосконалюють стратегії нападу та захисту. В останні роки досягнуто величезного прогресу в розумінні генетичної основи та молекулярного механізму хвороб. Було розроблено різні нові ліки, і в даний час ведеться розробка багатьох інших. Проте, нові інфекційні захворювання, викликані вірусами, наприклад, SARS-COV-2, залишаються проблемою. Крім того, невдачі ліків у випробуваннях на людях – це загальний процес, який необхідно опрацювати та розглянути. Багатообіцяючі результати очікуються завдяки появі нових технологій. Велику допомогу в розробці нових ліків з противірусною активністю надають знання про віруси, методи та інструменти, що швидко розвиваються. Найкраще розуміння вірусів дозволить встановити корисні заходи для боротьби з вірусними захворюваннями, і дослідники всього світу докладають усіх можливих зусиль, щоб контролювати поширення вірусних захворювань. Початковим етапом розробки нових молекул та пошук потенційних засобів спрямованої дії серед існуючих – є методологія зв'язування ліганд-мішень в активному сайті обраного ферменту чи рецептора. Отримані результати даного дослідження дозволять скоротити витрати, як матеріальні так і технологічні, на етапах синтетичних і скринінгових досліджень.

**Метою дослідження** є використання молекулярного докінгу, як сучасного методу *in silico* досліджень, для пошуку потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (Mpro) SARS-COV-2.

### **Завдання дослідження:**

- Створити необхідний органайзер мішеней кристалографічних моделей вірусної протеази протеази (Mpro) SARS-COV-2 з метою вибору оптимальної докінгової стиковки;
- Провести молекулярний докінг нових молекул для виявлення противірусної активності та дослідити характер зв'язування Ремдесивіру та Гідроксихлорохіну з вірусною протеазою;

- Дати оцінку отриманим обчислювальним результатам докінгу та провести докладний аналіз геометричного розташування досліджуваних лігандів в активному сайті вірусної протеази.

**Об'єкт дослідження.** Докінгові дослідження, вірусна протеаза (Mpro) SARS-COV-2, конденсовані похідні циклоalkanів та циклоалкенів, лікарські молекули Ремдесивір та Гідроксихлорохін.

**Предмет дослідження** – рецепторно-орієнтований гнучкий молекулярний докінг.

**Методи дослідження.** *In silico* методи: молекулярний докінг.

**Елементи наукових досліджень.** Вірусні протеази є критичними ферментами для розвитку багатьох патогенних вірусів людини і таким чином є ключовими мішенями для протівірусних препаратів прямої дії. Органайзер кристалографічних моделей вірусної протеази (Mpro) SARS-COV-2 дозволив вибрати найбільш оптимальну модель для стикування досліджуваних молекул. Відповідно до отриманих результатів молекулярного докінгу, а саме: негативними значеннями скорингової функції Affinity DG (ккал/моль), розрахунковими значеннями вільної енергії зв'язування EDoc (ккал/моль) та констант зв'язування  $K_i$  встановлено, що досліджувані молекули мають велику спорідненість до вірусної протеази. Інгібуюча активність молекул, що тестуються по відношенню до вірусної протеази (Mpro) SARS-COV-2, може проявлятися утворенням між ними комплексів, їх стійкість забезпечується за рахунок енергетично вигідного геометричного розташування лігандів в активному сайті акцептора. Таке утворення можливе за рахунок наявності водневих зв'язків, міжмолекулярних електростатичних та донорно-акцепторних взаємодій між ними. Отримані результати молекулярного стикування можуть бути корисними для подальшого експериментального скринінгу.

**Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.** Випускна робота складається із вступу, огляду літератури, розділу аналітико-дослідницької аргументації об'єктів та методів досліджень, розділу докінгових досліджень,

висновків, списку використаної літератури. Загальний обсяг роботи складає 47 стор. Робота ілюстрована, 4 таблицями, 22 рисунками. Список використаної літератури містить 68 найменувань.

## **РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНІЗМІВ ДІЇ ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ. ОГЛЯД ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ З ПРОТИВІРУСНОЮ АКТИВНІСТЮ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)**

Інфекційні хвороби добре відомі людській цивілізації з давніх часів. Інфекційні захворювання викликаються різними мікроорганізмами (бактеріями, вірусами та грибами) [1]. Вірусна структура проста і складається з білкової оболонки, нуклеїнової кислоти, вірусних ферментів і іноді ліпідної оболонки, на відміну від складної структури грибів, гельмінтів і протозоїв. Крім того, віруси використовують клітинний механізм господаря для реплікації, отже є облігатними внутрішньоклітинними патогенами. Такі показники створюють труднощі розробки ліків з селективною токсичністю проти вірусів [2]. Віруси є ультрамікроскопічні агенти, що містять або ДНК, або РНК як генетичний матеріал, і, як відомо, викликають різні захворювання у людей, тварин і рослин. Боротьба між людьми та вірусами – це безперервний процес, оскільки обидва будуть використовувати різні стратегії для боротьби одна з одною. Розробка противірусних препаратів – стомлюючий процес, що включає безліч етапів, таких як ідентифікація та скринінг мішеней, пошук та оптимізація потенційних клієнтів, клінічні дослідження та реєстрація ліків тощо [3]. Динамічна розробка противірусних препаратів є нагальною необхідністю, оскільки вірусні інфекції викликали людські смерті в усьому світі протягом усієї людської цивілізації. Затвердження першого противірусного препарату Ідоксурідину в червні 1963 відкрило нову еру в розробці противірусних препаратів. З того часу було розроблено безліч препаратів із противірусним потенціалом для клінічного застосування для лікування мільйонів людей у всьому світі [4]. Противірусні препарати є класом лікарських засобів, що особливо використовуються для лікування вірусних інфекцій. Конкретні противірусні препарати використовуються для лікування певних вірусів так само як антибіотики для бактерій. Противірусні препарати, на відміну більшості антибіотиків, не

знищують збудників-мішеней; швидше гальмують їхній розвиток. Оскільки віруси використовують клітини господаря для реплікації, це ускладнює розробку безпечного та ефективного противірусного препарату. Тому важко знайти лікарські мішені, які заважали б вірусу, не пошкоджуючи клітини господаря. Більше того, основні складності розробки антивірусних препаратів і вакцин пов'язані з мінливістю вірусу [5].

Одним із важливих способів пошуку противірусних препаратів є комп'ютерне відкриття ліків, і для цього підходу нелфінавір є прикладом відкритого у 1990-х роках засобу для лікування інфекції, спричиненої вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) [6]. Незважаючи на сучасні інструменти та суворі заходи щодо контролю якості, лише кілька противірусних препаратів отримують схвалення для використання людиною або через побічні ефекти, або через стійкість до противірусних препаратів. Зі зростанням поінформованості про віруси, механізм їх зараження та швидкий розвиток нових стратегій та методів для противірусних препаратів прискориться розробка нових противірусних препаратів. Вона прискорюється, в основному через безпрецедентну зміну клімату та глобалізацію [8].

**ДНК віруси**, такі як поксвіруси, герпес, аденовіруси та віруси папіломи, зазвичай містять двох ланцюгову ДНК, залишаючи одно розрядну ДНК. ДНК вірус проникає в центр клітини та призводить до нових вірусів.

**РНК віруси** включають грип, кір, епідемічний паротит, застуду, менінгіт, поліомієліт, ретро віруси (СНІД, Т-клітинний лейкоз), аденовіруси, що розглядаються, одно дескрипторні РНК (оцРНК). РНК вірус не проникає у клітинний центр (крім зараження вірусом застуди). Потім вірусна РНК використовується для створення ДНК копії вірусної РНК, яка організована геномом господаря, за яким йдуть ретро віруси.

**Етапи розвитку вірусних інфекцій.** Вірусна інфекція включає проникнення вірусної ДНК у клітину-господар, реплікацію цієї ДНК та вивільнення нових вірусів. Шість стадій реплікації вірусу включають



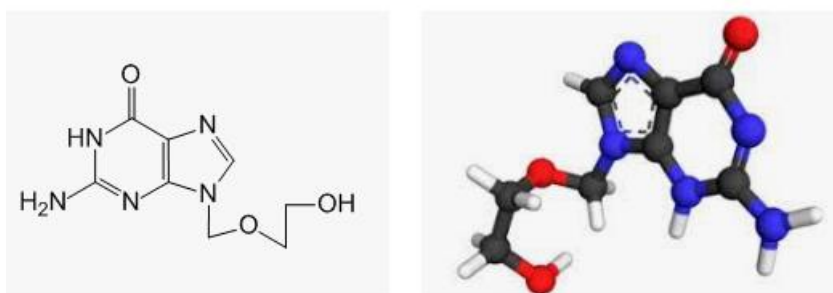
прикріплення вірусу, інвазію, зняття оболонки, реплікацію, збирання та вивільнення:

- Вірус прикріплюється до клітини-господаря, вводять свій генетичний матеріал у клітину-господар на стадії прикріплення та проникнення.

- На наступному етапі вірусна ДНК або РНК сама включається до генетичного матеріалу клітини-господаря, спонукаючи її до реплікації вірусного геному. Цей етап включає зняття оболонки, реплікацію та складання протягом життєвого циклу вірусу.

- Під час вивільнення клітина-господар вивільняє новостворені віруси, або руйнуючи клітину, очікуючи загибелі клітини, або відгалужуючись через клітинну мембрану [9,10].

Ацикловір (рис. 1.1) є основою 2'-дезоксигуанозину, який має противірусну дію після біотрансформації до ацикловітрифосфату.



**Рис. 1.1. Хімічна структура Ацикловіру**

Прихований розвиток цієї методології, підвищення рівня ацикловіру монофосфату, каталізується тимідинкіназою, що викликається клітинами, зараженими інфекцією простого герпесу [11, 12] або вітряною інфекцією, що оперізує, або фосфотрансферазою, що виробляється цитомегаловірусом. Потім клітинний білок додає фосфат для виробництва ацикловіру дифосфату та ацикловіру трифосфату. Ацикловітрифосфат уповільнює змішування вірусної ДНК, протидіючи 2'-дезоксигуанозинтрифосфату як субстрат для вірусної ДНК-полімерази. Ланцюг ацикловірмонофосфату у вірусній ДНК необоротний, враховуючи, що екзонуклеаза, пов'язана з полімеразами 3', 5', не може їх розділити [13]. У цьому методі вірусна ДНК-полімераза

інактивується так само. Ацикловір трифосфат у 30 разів сильніший, ніж інгібітори ДНК-полімерази простого герпесу типу 1, ніж клітини альфа-ДНК-полімерази людини [14, 15]. Невелике утворення ацикловіру трифосфату в неінфікованих клітинах та його експресія для ДНК вірусного навантаження призводить до нешкідливих клітинних токсичних ефектів. Крім того, більше 80% ацикловіру, який з'являється під час дифузії, не піддається впливу сечі [17-19]. Навіть при зниженій пероральній біодоступності насичення ацикловіром у плазмі перевищує 50% інгібуючу концентрацію для контамінації простим герпесом 1 і 2 типу, яка зростає у дорослих після комбінації 200 мг ацикловіру, з іншого боку, 800 мг дуже важливо забезпечити концентрацію плазми для вірусу *varicella zoster*. Ацикловір із досить коротким періодом на пів виведення з плазми, 7,7 мг слід призначати кожні 4-6 годин пацієнтам, ураженим вітряною віспою. Було показано, що ацикловір підходить для лікування захворювань, спричинених зараженням вірусом простого герпесу 1 та 2 та вірусом вітряної віспи, а також для маскування певних типів цитомегаловірусу [16].

Валацикловір, L-валіловий ефір ацикловіру (рис. 1.2). Після прийому препарат негайно перетворюється на ацикловір під дією валацикловіргідролази в травному тракті та печінці. Початкова біодоступність у три або кілька разів вища, ніж у ацикловіру [19]. Валацикловір виявився винятковим при лікуванні захворювань, спричинених вірусом простого герпесу та вірусом вітряної віспи, а також для профілактики цитомегаловірусу.

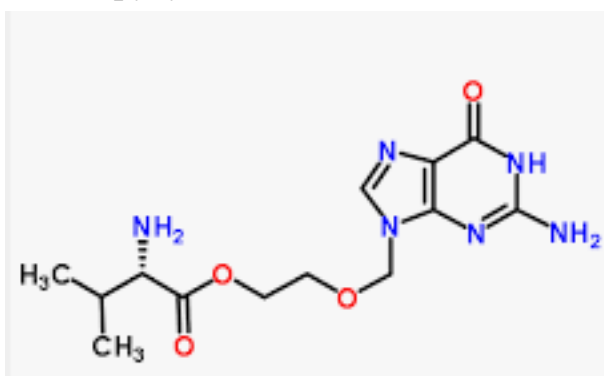
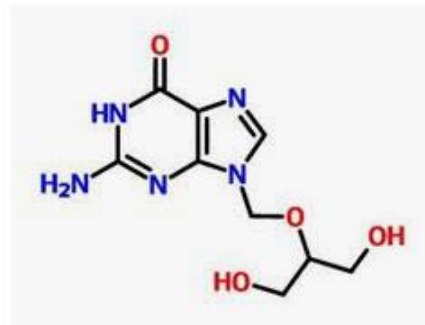


Рис. 1.2. Хімічна структура Валацикловіру

Ганцикловір (рис. 1.3) контрастує з ацикловіром тим, що має гідроксиметильну групу в положенні 3' від нециклічного бічного ланцюга. Засвоєння та організація його дії подібні до ацикловіру, з іншого боку, він дійсно має вуглець 3' з гідроксильним угрупованням, що дозволяє розширювати конструкцію основи подібно до порівняних терміналів ланцюгів ДНК.

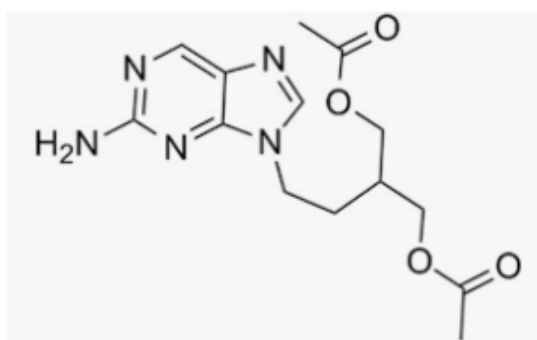


**Рис. 1.3. Хімічна структура Ганцикловіру**

Ганцикловір заміщається ганцикловірмонофосфатом за допомогою кодованої вірусом фосфотрансферази, що спрямовується в клітини, контаміновані цитомегаловірусом. Це субстрат, який перевершує ацикловір для цієї фосфотрансферази, і половина присутності внутрішньоклітинного ганцикловіру трифосфату у будь-якому випадку становить 12 годин порівняно з 1-2 годинами для ацикловіру. Ця різниця є причиною того, що ганцикловір краще, ніж ацикловір, для лікування цитомегаловірусу. Пікова плазмова фіксація після внутрішньовенного введення звичайними порціями набагато вище 3 мкМ, що має інгібувати більшість штамів цитомегаловірусу [20]. Внутрішньовенний ганцикловір дуже ефективний для профілактики та лікування цитомегаловірусу. Також було виявлено, що пероральний ганцикловір корисний для профілактики цитомегаловірусу, але його цінність обмежена його низькою біодоступністю (8-9%) [21] через кисень або нециклічної рибозної частини молекули. Його травний компонент та активність аналогічні ацикловіру, так що знову ж таки, пов'язаний лише термінал ланцюга ДНК. Інгібуюча дія пенцикловіру *in vitro* на простий герпес 1 і 2 типів та на інфекцію вітряної віспи подібна до ацикловіру [22]. В даний час він заявлений тільки для лікування герпесу. Внутрішньовенні

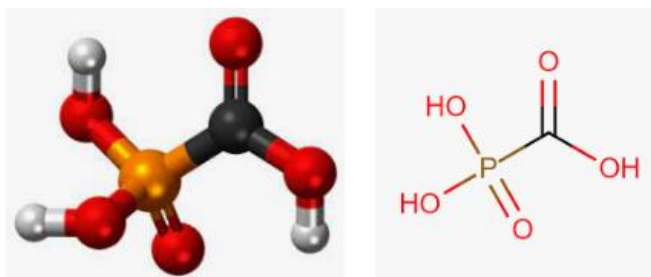
препарати розглядаються як засіб лікування слизово-шкірного герпесу у пацієнтів із ослабленим імунітетом.

Фамцикловір (рис. 1.4) являє собою просте діацетил-6-дезоксипохідне пенцикловіру. Дана молекула засвоюється після перорального прийому та швидко біотрансформується до пенцикловіру шляхом деацетилювання у травному тракті, крові та печінці, після чого окислюється печінкою у положенні 6 пуринового циклу. Половина дії динамічного внутрішньоклітинного препарату, пенцикловіру трифосфату дуже тривала, тому має можливу ефективну дозу один раз на день. Фамцикловір діє проти генітального герпесу та вірусу оперізувального лишая [23]



**Рис. 1.4. Хімічна структура Фамцикловіру**

Фоскарнет (тринатрійфосфоформіат) (рис. 1.5) є простий природний неорганічний пірофосфат. Ця структура з ДНК, ДНК-полімеразою на ділянці, яка обмежує пірофосфат, підтримує відділення пірофосфату від нуклеозидтрифосфату і по цій лінії блокує подальше збільшення формату основи.



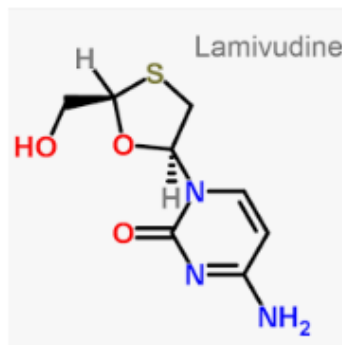
**Рис. 1.5. Хімічна структура Фоскарнету**

Фоскарнет слід вводити внутрішньовенно, оскільки докладні дані про пероральне введення ще не отримані. Клінічні дослідження показують, що

фоскарнет ідентичний ганцикловіру при лікуванні цитомегаловірусу і краще, ніж відарабін, при лікуванні контамінації, викликаної інфекцією, стійкою до ацикловіру вірусом простого герпесу.

Після внутрішньоклітинного фосфорилювання рибавіринтрифосфат перешкоджає початковій своєчасності трансляції вірусу, наприклад, доповнюючи та розширюючи РНК та пригнічуючи синтез рибонуклеопротеїну. Він має широкий спектр дії *in vitro* проти РНК інфекції. Достовірна конвергенція метаболітів – 1,2,4-тріазол-3-карбоксаміду – вища при сечовипусканні після прийому внутрішньо, ніж після внутрішньовенного введення, що свідчить про зниження концентрації препарату в травному тракті та печінці. Аерозоль рибавірину засвоюється елементарно, потім вказує близькість фіксації, яку можна виміряти в плазмі. Клінічна придатність була продемонстрована для лікування інфекції, викликаної лихоманкою Денге (з докладним описом перорального та внутрішньовенного введення рибавірину) та гепатиту С (перорально) рибавірину, змішаного з інтерфероном [24, 25].

Ламівудин (рис. 1.6) являє собою піримідиновий нуклеозид, який спочатку застосовувався як антиретровірусний препарат. Це простий цитидин, який внутрішньоклітинно перетворюється на ламівудинтрифосфат, який зв'язується з ДНК-полімеразою гепатиту В, а також зворотною транскриптазою ВІЛ.

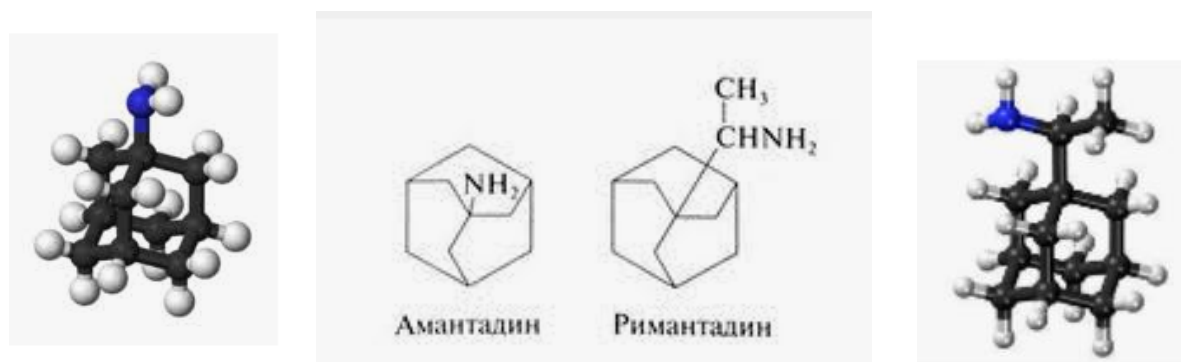


**Рис. 1.6. Хімічна структура Ламівудину**

Ламівудин - це рецептурний нуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази (НДПТ), який використовується в комбінації з іншими

препаратами як противірусне лікування вірусу імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1) та як монотерапія вірусу гепатиту В (ВГВ) [26]. Висока пероральна біодоступність і зазвичай тривалий період на пів виведення (5-7 годин) ламівудину дозволяють приймати його один раз на день пацієнтам із гепатитом В.

Амантадин є амін, що має особливе кільце з 10 атомів вуглецю; Римантадин гідрохлорид є парою, отриманою шляхом об'єднання етилвуглецевого зв'язку з циклом C10 (рис. 1.7).



**Рис. 1.7. Структури Амантадину і Римантадину**

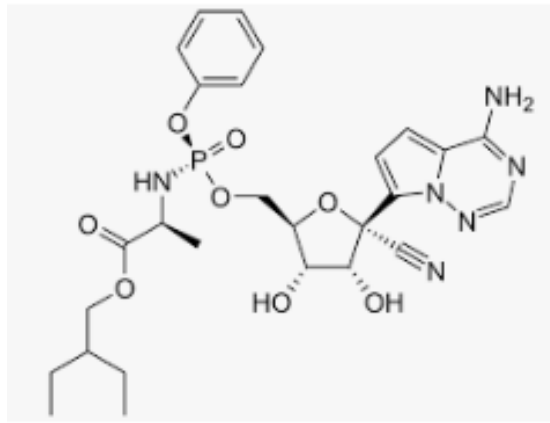
Обидва препарати, мабуть, пригнічують реплікацію грипозної інфекції, блокуючи канал часток вірусу з білком N2, що знижує вплив цього вірусного білка на вивільнення вірусу та контролює значення рН у заражених клітинах. Амантадин має високу біодоступність при пероральному прийомі та ряді симптомів, особливо у пацієнтів віком 60 років і старших, у яких концентрації в плазмі приблизно у кілька разів вищі, ніж у молодих людей, які отримують півтори дози – час життя в плазмі приблизно на 12 годин більше. Амантадин виводиться шляхом клубочкової фільтрації та немедикаментозного циліндричного вивільнення, тому зміна фармакокінетики у людей похилого віку, ймовірно, пов'язана зі зниженням ниркової здатності. Римантадин також добре засвоюється; 75% дози переробляється в печінці, переважно шляхом гідроксилювання. Людям похилого віку необхідне зниження дози, ймовірно через вікове зниження

емності печінки. Ці два препарати активні в інгібуванні та лікуванні грипозної інфекції [27].

Нормальний інтерферон (Інтерферон-альфа) являє собою глікопротеїн, що має передбачувану противірусну дію завдяки реєстрації клітинних хімічних речовин, що інгібують включення вірусних білків. Комерційне розташування інтерферону-альфа трохи менше, ніж у звичайних білків (субатомна маса близько 19 000), і він виробляється мікробами за допомогою рекомбінантної стратегії ДНК [11]. Інтерферон недоступний перорально, його слід вводити внутрішньом'язово або підшкірно. Недостатньо інформації про інгібування реплікації вірусів *in vitro*, мабуть тому, що інтерферони інгібують їх противірусну активність, пригнічуючи та інтерпретуючи вірусну РНК і утримуючи клітини. Показано ефективність інтерферону альфа при лікуванні захворювань, викликаних вірусом герпесу людини типу 8, вірусом папіломи (саркоми Капоші), вірусом гепатиту В і С.

Всесвітній спалах вірусної інфекції COVID-19 пов'язаний із відсутністю конкретних препаратів для боротьби з цією вірусною інфекцією. На сьогоднішній день майже 10 мільйонів людей інфіковано і близько 500 000 людей помирають у всьому світі через вірусну інфекцію COVID-19. Щоб знайти рішення для цієї вірусної інфекції, були зроблені і продовжуються великі зусилля з розробки вакцин, низькомолекулярних ліків або моноклональних антитіл, які можуть запобігти поширенню інфекції, щоб уникнути очікуваних людських, соціальних та економічних руйнувань, пов'язаних із цією інфекцією. У літературі та лікарнях під час клінічних випробувань повідомлялося про кілька схвалених FDA препаратів для лікування або зниження тяжкості перебігу COVID-19.

Ремдесивір (GS-5734) Ремдесивір - це новий противірусний препарат, що спочатку використовувався для лікування інфекцій, викликаних вірусами Марбург та Ебола, і цей препарат був розроблений Gilead Sciences. Це проліки аналога нуклеотиду, що метаболізується внутрішньоклітинно до аналога аденозинтрифосфату, що інгібує вірусні РНК-полімерази (рис. 1.8).



**Рис. 1.8.** Хімічна структура Ремдесивіру

Він діє як інгібітор РНК залежної РНК полімерази, та його характеристики та фармакокінетика були вивчені при інфекціях MERS CoV та SARS-CoV. Цей препарат викликає зниження реплікації вірусного геному та його продукції через зміни до функцій вірусної екзонуклеази та порушення коректурного читання. Його можна рекомендувати для запобігання тяжкості перебігу захворювання у хворих на COVID-19, оскільки він запобігає реплікації вірусу. Щоб підтвердити його терапевтичний потенціал щодо COVID-19, у фазі 3 проводяться подвійні сліпі рандомізовані клінічні випробування з такими пацієнтами [28]. Дослідження *in vitro* показали, що на додаток до його ефективності проти COVID-19 в епітеліальних клітинах дихальних шляхів людини ремдесивір а також клінічна ефективність моделі приматів, відмінних від людини [29].

Ремдесивір має противірусну активність широкого спектру проти кількох членів сімейства вірусів, включаючи коронавіруси, наприклад, коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому (MERS-CoV) і SARS-CoV, і філовіруси, наприклад, Ебола, і показав терапевтичну та профілактичну ефективність щодо цих коронавірусів. Ремдесивір при тестуванні в лабораторних умовах з використанням клітин Vero E6 показав значення EC<sub>50</sub>, що дорівнює 1,76 мкМ, що свідчить про його активність проти SARS-CoV-2, припускаючи, що його робоча концентрація, ймовірно, буде досягнута на моделях нелюдиноподібних приматів [30 , 31]. Внутрішньовенне введення ремдесивіру показало значне поліпшення



першого пацієнта з COVID-19 у США [32], а потім було розпочато випробування для швидкої оцінки безпеки та ефективності ремдесивіру у госпіталізованих пацієнтів, інфікованих nCoV-19. У когорті госпіталізованих пацієнтів з тяжкою формою COVID-19, які отримували ремдесивір, покращення клінічних показників спостерігалось у 68% пацієнтів [33]. Без плацебо або активного препарату порівняння у дослідженні важко зробити будь-який однозначний висновок про ефективність терапії. В даний час у Сполучених Штатах проводиться чотири клінічні випробування за участю пацієнтів, а два додаткові випробування в Китаї були зареєстровані тільки на ClinicalTrials.gov, NCT04252664 (легке-помірне захворювання) та NCT04257656 (важке захворювання) [34].

Нітазоксанід та його активний компонент тизоксанід продемонстрували потенціал проти MERS CoV та SARS CoV-2 у дослідженні *in vitro* з використанням клітин Vero E6 з EC50 0,92 та 2,12 мкМ відповідно [31]. Він також показав активність широкого спектру проти деяких вірусів, включаючи норовірус, ротавірус, парагрип, респіраторно-синцитіальний вірус та вірус грипу на додаток до корона вірусів. Ця противірусна активність пов'язана з тим, що механізм дії ґрунтується на втручанні в регульовані господарем шляхи реплікації вірусу, а не на специфічні шляхи вірусу [35]. Вроджені противірусні механізми активуються нітазоксанідом за допомогою ампліфікації цитоплазматичної РНК. Нітазоксанід активує точні механізми господаря, що перешкоджають вірусній інфекції, і віруси націлені на те, щоб обійти клітинний захист господаря [36]. Дослідження показали, що нітазоксанід при використанні проти вірусів грипу блокує дозрівання вірусного гемаглютиніну на пост трансляційній стадії [37, 38]. Цей препарат проходить оцінку в рандомізованих контрольованих клінічних випробуваннях щодо лікування деяких гострих респіраторних інфекцій, таких як грип, навіть незважаючи на те, що результати ще недоступні. Хоча обнадійливі результати отримані завдяки активності нітазоксаніду *in vitro*

щодо SARS-CoV-2, необхідні додаткові дослідження, щоб чітко визначити його роль у лікуванні COVID-19.

Колись було визнано, що не може бути знайдено специфічного інгібітору репродукції вірусу. Ця впевненість була посилена розчаруванням перших противірусних препаратів, таких як ідоксуридин та есенціальний цитарабін, фіалуридин. На щастя, були розроблені ліки, що впливають на реплікацію вірусу більшою мірою, ніж клітини. Усі противірусні препарати можуть мати ефекти, і деякі з них незрозумілі, наприклад, тромботична мікроангіопатія, пов'язана з валацикловіром у пацієнтів із синдромом імунодефіциту.

Еленолат кальцію, монотерпен, отриманий з агресивних рідких концентратів, гідролізованих з різних частин оливкового дерева, виявляє віруліцидну дію *in vitro* проти різних РНК- та ДНК- інфекцій, явно взаємодіючи з білковим шаром молекули, що заражає [39]. У дослідженні тварин інтраназальне введення знижувало ймовірність зараження парагрипом без значних побічних ефектів. Препарати людини з цією сполукою продемонстрували життєздатність лише в тому випадку, якщо лікування було розпочато одразу після зараження. Певні дигідроізохіноліни продемонстрували інактивуючу дію на інфекції грипу А та В та інфекції парагрипу; ці інфекції мали сильний противірусний ефект у клітинній культурі, а пізніше було виявлено, що вони мають помірний ефект у тестах на тваринах.

Оскільки інфекції спочатку заражали еукаріотичну клітину, виникають певні загальні стадії процесу хвороби, які можуть бути загальними для локалізації дії потенційних противірусних препаратів. На цих стадіях контамінуючий віріон зв'язується з рецепторами на клітинній плівці, проникає в клітинний шар і, потрапивши до цитоплазми клітини, білковий шар віріону випорожнюється і вірусне ядро роз'їдає речовину. Контакт або вірусна адсорбція були найменш життєздатним місцем для атаки противірусних агентів, оскільки не були виявлені речовини, які досі були

досить динамічними, щоб гарантувати клінічне випробування. Вважається, що сульфатований полісахарид зв'язується з інфекційними частинками, тим самим знижуючи швидкість зв'язування клітин *in vitro* [40, 41]. Уражені інфекції включають енцефаломіокардит, реверберацію, грип, пропасницю денге та сказ. Помірний ефект *in vivo* також спостерігався проти інфекції лихоманки денге у мишей. Гепарин, мукополісахарид із несприятливим зарядом, явно утворює неінфекційний комплекс із герпетичною інфекцією, який перешкоджає його секреції у клітину-господаря. Дію проти герпетичної інфекції спостерігали як *in vitro*, так і при аналізі істот, в останньому випадку в шкіру кролика вводили ін'єкцію гепарину, через іонну концепцію зв'язку гепарин у всіх відносинах має вражаючий ступінь не специфічності.

Інгібітори ферментів, асоційованих з віріонами ДНК і РНК полімераз є одним з актуальних напрямів для пошуку нових протівірусних молекул. Безліч речовин приймають протівірусний напрямок завдяки інгібуванню ДНК-полімераз, асоційованих з віріонами. Протівірусні препарати цього типу можуть бути широко зібрані в аналоги пірофосфатів та аналоги звичайних поліфосфатів нуклеозидів. В основній класифікації є дві цікаві суміші: тринатрійфосфонооформіат (PF An) та тринатрійфосфоноацетат (PA). PFA видаляє половину ДНК-полімерази типу I з Herpes simplex інфекції. Вплив еукаріотичної ДНК полімерази може знижувати експансію білка. Для розмноження клітин (клітини HeLa) більш важливою вимогою до 100 мкМ PFA середовищі було досягнення половинного інгібування. PFA, як правило, динамічна *in vitro* щодо ДНК інфекцій простого герпесу 1 і 2, а також інфекції у тварин, що моделюються. Подібно до PFA, P може створювати враження, що потужний інгібітор інфекції простого герпесу залежить від ДНК полімерази, але не впливає на полімеразу клітини-господаря (WI-38) [42, 43].

Відомо, що різні речовини запобігають ДНК- і РНК- опосередкованої РНК-полімерази *in vitro*, і ця активність неодноразово вважалася відповідальною за протівірусну активність. Наприклад, у ретельному звіті

Ericsson et al. Повідомили про рибавіринтрифосфат (RTP). Він є потужним антиоксидантом, який стимулює РНК-полімеразу. Поляризація вірусних полімерів сильна для АТФ та ГТФ, але не для УТФ чи ЦТФ. РНК-інтерференційні полімери були ідентифіковані як більш складні, ніж гуаніновмісні динуклеотиди, а Plotch і Krug показали, що ApG або GpC вбудовані в 5'-кінець гена AcG. Ерікссон та ін. виявили, що RTP скасовує опосередковане ApG і GpC посилення віртуальної полімерази. Не зовсім зрозуміло, що цей підхід може відбивати унікальні ефекти грипозної інфекції рибавірином. Ерікссон та ін. заявили, що найважливішою метою є те, що блокада RTP інгібіторів вірусної РНК-полімерази поширюється від утворення клітинних полімерів до дисфункційних еукаріотичних РНК. Джеймісон та ін. показали, що RTP не інгібує еукаріотичні РНК-полімерази I та II та не впливає на еукаріотичні полімерази (A).

Дезоксипіримідинкіназа ініціює вірус. Звичайно, є два способи зробити це: перший – безпосередня конкуренція зі звичайними субстратами, а другий – каталітична рестрикція алостеричними модуляторами, кіназа готова фосфорилувати інший тимідин, дезоксицитидин, який фосфорилує тимідин. Він був детально описаний та порівняний з хімією мітохондрій людини та миші в деяких варіантах, особливо з фосфорильованими екстрактами, хоча dCTP не контролює інфекцію тимідиновим вірусом [44, 45].

Всі тимідинкінази критично залучені до dTTP. Cheng та ін. [46] показали, що аналоги тимідину мають противірусну активність, тоді як вірус простого герпесу може активувати тимідинкіназу, а Declercq і Torrence [47] (10S) продемонстрували деякі аналоги тироїду, що особливо важливий для вірусів герпесу. Cheng et al виявили у звіті, що багато захворювань, що мають 5-субдезоксиуридини, є вірусом простого герпесу 1, і було показано, що 2-тимідинкіназа є сильною рушійною силою в цьому аспекті. 5-IdC і 5-BrdC стають дедалі більш активними, привабливими інгібіторами тимідинкінази. Герпес простого класу 1 бореться тільки з тимідинкіназою. Вищезгадані

комбінації є простим герпесом типу 1 або простим герпесом типу 2. Він є активним інгредієнтом у регенерації, але не певного типу вірусу простого герпесу, який швидко набув здатності стимулювати тимідинкіназу [48].

Різні погляди на роботу віріон-асоційованих нейрамінідаз, але незалежно від того, чи вони інфільтровані або агломеровані, тяжкість побічних ефектів грипу збільшується серед добровольців і посилює імунну відповідь на нейрамінідазу по відношенню до плазми. 2-Дезокси-2,3-дегідро-N-трифторцетилнейрамін є інгібітором грипозної інфекції. Його дія включає ферментативне видалення нейрамінової ділянки з інфікованої оболонки, а також широке скупчення інфекційних частинок і, зрештою, пригнічення реплікації вірусу. мРНК гуанілтрансферази та мРНК метилтрансферази мРНК складаються з 7 метилгуанозинових структур, пов'язаних з 2'-трифосфатними гібридами з 5'-розташуваннями різних вірусів та еукаріотів. Структура містить «О» метилрибонуклеозид та відповідну хімічну речовину, що містить «верхню» структуру, яка була виявлена в центрах вакцин та реовірусів. Наступні випробування в цій галузі показали, що інфекції, що містять різні РНК та ДНК, мали «чудову» структуру, тоді як поліомієліт не був інфекцією, а рибавірин не проявляв активності щодо поліомієлітної інфекції. Тому було вивчено вплив процедури полірування [49].

RTP є потужним та серйозним інгібітором мРНК-гуанілтрансферази, ( $K_j=32\text{p.M}$  та  $GTP K_m=22\text{p.M}$ ). Крім того, відсутність GTP 1 мм RTP інгібує метилювання мРНК вакцини, але синепунгін підвищує ефективність, навіть якщо він є протигрибковим агентом. Пептиди вірусів грипу не швидко зв'язуються з фрагментами рибавірину, але синтез цього пептиду в клітинах нирок господаря не регулюється. Це розпізнавання може бути з утворенням суміші вірусних РНК. Реплікація грипозної інфекції в ретикулоцитах становить приблизно 15 кінцевих нуклеотидів, що генеруються з глобінової мРНК, а ефекти вимагають додаткової синхронізації клітини-господаря мРНК. Інгібітори трансляційних процесів вірусної мРНК дозволяють припустити, що інтерпретація різних мРНК у зародках пшениці обмежена 7-

метилгуанозин-5'-монофосфатом (m7-GMP). Однак гуанозинові нуклеотиди швидко вивільняються при попаданні в 7-метилового включення або інших металічних груп. Дивно, але недостатньо, щоб m7-GMP пригнічував інтерпретацію РНК сателітних інфекцій, що викликають псування тютюну, у діапазоні зародків пшениці. Це може бути частиною іншої ділянки розпізнавання верхнього сайту рестрикції. Додаткові дослідження з використанням реовірусу мРНК в зародках пшениці показали Adams et al. [50-52]. Вони додали, що інтерпретація мРНК у діапазоні ретикулоцитів менш важлива за будь-яких умов відповіді. Ранні вірусні поліпептидні ланцюги у вигляді парафторфенілаланіну (pFPhe) були вперше використані у 1951 році простим, неагресивним способом, і відповідно до цього було показано, що парафторфенілаланін має широкий спектр противірусної активності проти РНК- та ДНК-інфекцій. Принцип роботи полягає у заміні білка фенілаланіну, який погано стимулює противірусні пептиди. Інгібітори не вірусних ферментативних процесів, що беруть участь у синтезі ДНК можуть змінити пропорцію або обсяг сумішей ДНК, противірусні агенти в основному впливають на оцінки тимідилатсинтетази та дезоксинуклеозидтрифосфату або безпосередньо, або в обхід.

Численні дочірні дезоксиуридини виявляють неймовірні бар'єри для синтетичного ТМР. У моделі 5-йодоацетамідометилдезоксиуридин і 5-етилдезоксиуридин, а також 5-фтордезоксиуридин і 5-трифторметилдезоксиуридин 5'-монофосфат зв'язування забезпечують успішну реплікацію ДНК завдяки наявності різних речовин. Хоча було продемонстровано, що значна кількість цих речовин є динамічними противірусними агентами, ці ефекти також впливають на реплікацію клітинної ДНК. Мюллер досліджував ці речовини щодо їх противірусної дії. Крім того, дауноміцин взаємодіє тільки з адриаміцином, що по суті має ідентичність, як і в реальному житті при ДНК інфекціях, особливо з вірусом простого герпесу та вісповакциною, а також при канцерогенних РНК інфекціях, що імітують ДНК шлях. Обидва ці агенти вважаються

спеціальними імплантатами і зазвичай токсичні. Наприклад, інфекції грипу включають піки гемаглютиніну. Це важлива частина оболонкового глікопротеїну інфекції, що підходить для з'єднання інфекційних молекул з їх клітинними рецепторами. Іншою важливою частиною інфекційної плівки грипу є хімічна нейрамінідаза (глікогідролаза N-ацетилнейрамінової кислоти), яка знаходиться поза інфекцією і, мабуть, пов'язана з ліпідною мембраною інфекції, як гемаглютинін. Вплив суміші на нейраміндазу було досліджено у попередніх областях [53]. Інгібітори біосинтезу та складання вірусного глікопротеїну як ДНК, так і РНК інфекції включають мембрани з інтегрованими в інфекцію глікопептидами, така комбінація може бути рекомендована як перспективний напрям пошуку протівірусних препаратів.

## ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

1. Систематизовано, проаналізовано та узагальнено літературні дані щодо механізмів дії противірусних препаратів та характеристики лікарських засобів з противірусною дією.
2. Виявлено, що противірусні препарати, які існують на світових ринках, є малоактивними внаслідок мінливості або мутацій вірусних захворювань, у тому числі COVID-19.
3. В останні роки досягнуто величезного прогресу в розумінні генетичної основи та молекулярного механізму вірусних захворювань, що дає великий потенціал для пошуку нових молекул спрямованої дії.

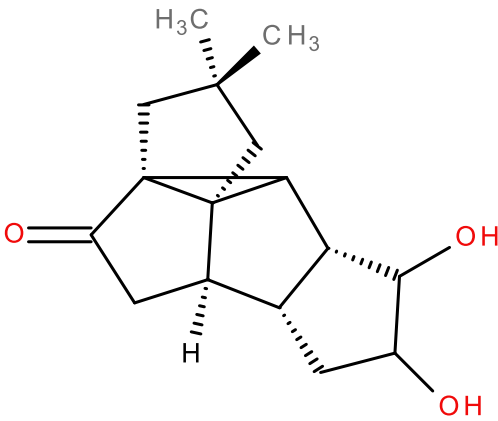
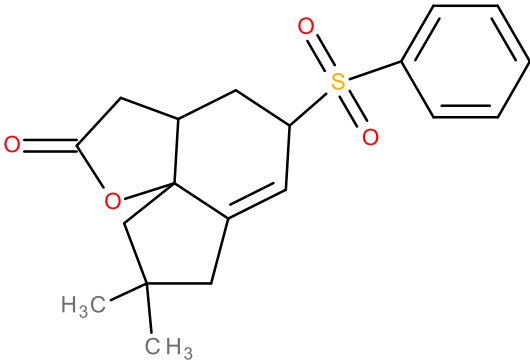


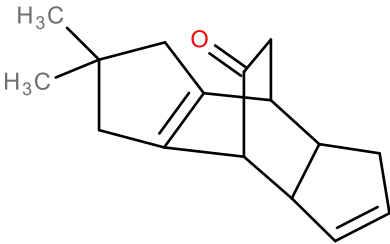
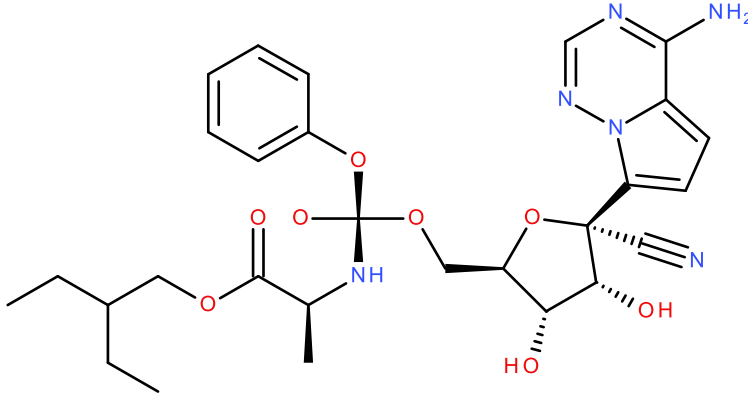
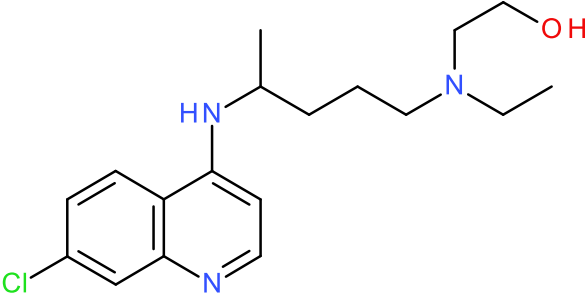
## РОЗДІЛ. 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ТА АРГУМЕНТАЦІЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ І МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.

### 2.1. Об'єкти досліджень, характеристика структур.

Об'єктами докінгових досліджень були обрані структури, які належать до класу конденсованих циклоalkanів та циклоалкенів, модифіковані карбонільними, сульфонільними, гідроксильними, арильними групами. Ці структури були отримані на базі Державного інженерного інституту, кафедри хімії, Кеонжар Одіша, Індія. Для докінгових досліджень на вірусну протеазу також було запропоновано лікарські препарати, які входили до формулярів лікування при COVID-19 та показали високу ефективність (Ремдесивір, гідроксихлорохін). Структури представлені у таблиці 2.1.

**Таблиця 2.1. Об'єкти досліджень**

	<p>4,5-Дигідрокси-2,2-диметилдекагідро-3а,7-етаноциклопента [2,3]циклопропа[1,2-а]пентален-9-он (1)</p>
	<p>8,8-диметил-5-(пентилсульфоніл)-3,3а,4,5,8,9-гексагідроіндено [3а,4-в]фуран-2(7Н)-он (2)</p>

	<p>2,2-Диметил- 1,2,3,4,4а,5,7а,8-октагідро- 4,8-етано-<i>s</i>-індацен-9-он (3)</p>
	<p>Ремдесивір</p>
	<p>Гідроксихлорохін</p>

## 2.2. Обґрунтування вибору молекулярного докінгу як сучасного методу *in silico* досліджень для прогнозування активності потенційних ліків

Метою методології зв'язування лікарських молекул із сайтами пептидів є прогнозування структури комплексу ліганд-рецептор за допомогою обчислювальних методів.

Таку методологію можна досягти за допомогою двох взаємозалежних етапів:

- відбір проб конформації ліганду у активному сайті пептиду;
- ранжування утворених конформацій за допомогою скорингової

функції.

Алгоритми вибірки мають мати можливість відтворювати експериментальний режим зв'язування, а функція оцінки повинна класифікувати його як найвищу серед усіх конформацій, які утворюються під час стиковки.

**Таблиця 2.2.** Деякі алгоритми вибірки

Назва алгоритму	Характеристики
Алгоритми узгодження	Засновані на основі геометрії, яка підходить для VS і поповнення бази даних завдяки високій швидкості
Інкрементна побудова	Заснована на основі фрагментів та послідовної стикування
Монте Карло	Стохастичний пошук
Генетичні алгоритми	Стохастичний пошук
Молекулярна динаміка	Подальша обробка після стикування
MCSS	Методи на основі фрагментів для дизайну de novo
LUDI	Методи на основі фрагментів для дизайну de novo

Для молекулярного докінгу планується використати програмний пакет Autodock 4.2. В основі роботи даного пакету закладені відповідні алгоритми, Монте-Карло та генетичні алгоритми.

Генетичні алгоритми (GA) – алгоритми, які відносяться до відомих стохастичних методів. Принцип генетичних алгоритмів GA виникає з теорії еволюції Дарвіна. Ступені свободи досліджуваної структури кодуються у вигляді двійкових рядків, що називаються генами. Такі гени є суб одиницями "хромосоми", яка допомагає визначити положення ліганду. Кроссовер і мутація – це два види генетичних операторів у ГА. Мутація вносить

випадкові зміни у гени, а кроссовер в свою чергу обмінюється генами між двома хромосомами. Якщо генетичні оператори мають вплив на гени, то результатом є нова досліджувана структура. Нові структури мають оцінювання, наприклад, за допомогою функції підрахунку балів, а ті, що вижили, можуть бути використані для наступного генерації [54-56].

Методи Монте-Карло (МС) генерують положення ліганду за допомогою обертання зв'язків, обертання або переведення твердого тіла. Конформація, яка одержана під час таких перетворень, перевіряється за критерієм відбору на основі визначеної енергії. Якщо є відповідність критерію, він буде збережений та додатково модифікований для подальшої конформації. Такі процедури продовжуватимуться поки не буде зібрано відповідну кількість конформацій. Основною перевагою цього є те, що зміна може бути досить великою, що дозволяє молекулі перетинати енергетичні бар'єри на поверхні потенційної енергії. Така операція є неможливою у випадку використання методів моделювання за допомогою молекулярної динаміки [57, 58].

Оцінку зв'язування ліганду з протеїном проводили з допомогою розрахованих емпіричних скорингових функцій. Енергія зв'язку розкладається на кілька енергетичних компонентів, таких як водневий зв'язок, іонна взаємодія, гідрофобний ефект та зв'язування ентропії. Кожен компонент множиться на коефіцієнт, а потім калькулюється. Коефіцієнти отримують при регресійному аналізі, який визначають на наборі тестів комплексів ліганд-білок з відомими спорідненими властивостями [59-62].

Призначення функції підрахунку полягає у розмежуванні правильних положень від неправильних чи сполучних речовин від неактивних сполук під час обчислень. Однак підрахунок функції передбачають оцінку, а не обчислення спорідненості зв'язування між білком та лігандом, а також за допомогою цих функцій, приймаючи різні припущення та спрощення. Функції підрахунку можна розділити на ті, що ґрунтуються на силових полях, емпіричні та засновані на знаннях функції підрахунку очок [63].

Для того, щоб максимально наблизити стикування ліганду з протеїном, був використаний рецепторно-орієнтований гнучкий докінг.

Використання молекулярного докінгу на клітинному та субклітинному рівнях з використанням методології оцінки зв'язування лігандів з ймовірними біологічними мішенями дозволить оптимізувати структури «сполук-лідерів»; провести віртуальний скринінг з метою визначення афінитету сполук до біологічної мішені; змодельовати зв'язування ліганд-мішень з урахуванням специфіки взаємодій.

Рухливість білків тісно пов'язана з поведінкою зв'язування лігандів. Включення гнучкості рецепторів є значним завданням у галузі стикування. В ідеалі за допомогою моделювання можна моделювати всі ступені свободи у комплексі ліганд-рецептор. Однією перешкодою є його великі обчислювальні витрати, що перешкоджає використанню цього методу при скринінгу великих хімічних баз даних. Але AutoDock 4 використовує метод вибірки боротьби з гнучкістю бічного ланцюга. Користувачі можуть вибрати кілька бічних ланцюгів рецептора і одночасно взяти проби з лігандом, використовуючи самі методи. Інші частини рецептора жорстко обробляють картою енергії сітки при відборі проб. Мапа енергії сітки, заснована Гудфордом має використання для зберігання енергетичної інформації рецептора та спрощення обчислення енергії взаємодії між лігандом та обраним пептидом [64].

Отримані результати в подальших дослідженнях можуть бути використані для обґрунтування доцільності проведення експериментального скринінгу, а також для рекомендацій щодо раціонального дизайну майбутніх молекул з відповідною дією.

## ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 2

1. Об'єктами докінгових досліджень були обрані структури, що належать до класу конденсованих циклоалканів та циклоалкенів, модифіковані карбонільними, сульфонільними, гідроксильними, арильними групами. Для порівняльної характеристики також були запропоновані Ремдесивір та Гідроксихлорохін, які входили до формулярів лікування при COVID-19 та показали високу ефективність.
2. Для докінгових досліджень нами був використаний програмний пакет Autodock 4.2, який дозволяє проведення гнучкого рецепторно-орієнтованого докінгу. Вибір даного програмного пакета обґрунтований тим, що віртуальні умови, що використовуються, дають можливість максимально наблизити утворення комплексу між досліджуваною молекулою і рецептором до умов, які існують у біологічних системах.

### **РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ ДЛЯ ПОШУКУ ПОТЕНЦІЙНИХ ПРОТИВІРУСНИХ МОЛЕКУЛ ЩОДО ВІРУСНОЇ ПРОТЕАЗИ (M<sup>PRO</sup>) SARS-COV-2**

#### **3.1. Органайзер кристалографічних мішеней вірусної протеази SARS-COV-2**

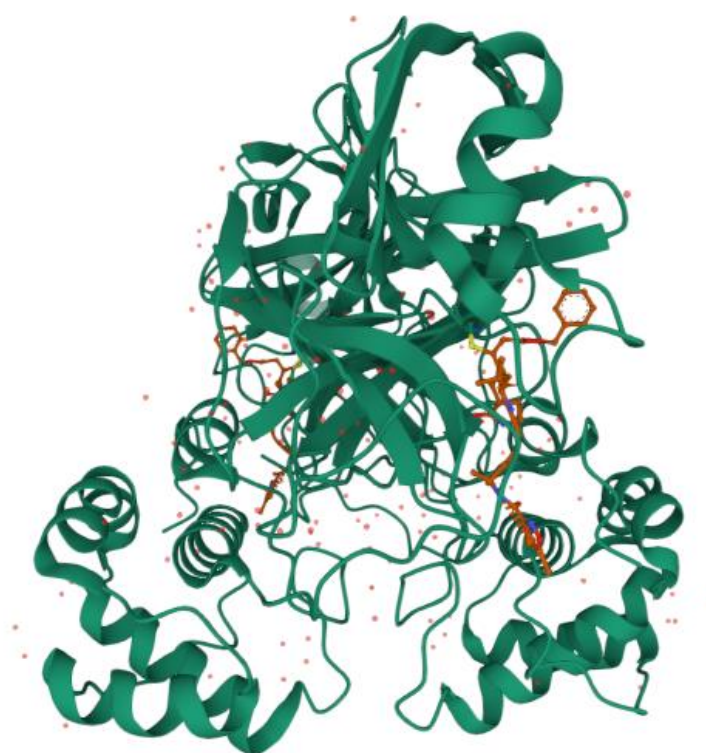
Новий корона вірус, відомий як корона вірус важкого гострого респіраторного синдрому 2 (SARS-CoV-2), є етіологічним агентом, відповідальним за спалах вірусної пневмонії 2019-2022 років, викликаний корона вірусною хворобою 2019 (COVID-19).

Нині немає таргетних терапевтичних засобів для лікування цього захворювання, а ефективні варіанти лікування залишаються дуже обмеженими. Обчислювальна стратегія є багатообіцяючим способом і відіграє важливу роль у фармацевтичній промисловості для створення нових потенційних лікарських молекул.

Для докінгової стикування із загальнодоступної бази Protein data bank були взяті білки мішеней щодо вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) COVID-19.

Тут описані результати програми, спрямованої на швидке виявлення сполук-лідерів для клінічного застосування шляхом поєднання структурно-орієнтованого дизайну ліків, віртуального скринінгу ліків та високопродуктивного скринінгу. Ця програма була зосереджена на виявленні потенційних лікарських засобів, які націлені на основну протеазу (M<sup>pro</sup>) SARS-CoV-2: M<sup>pro</sup> є ключовим ферментом корона вірусів і відіграє ключову роль у опосередкуванні реплікації та транскрипції вірусу, що робить його привабливою лікарською мішенню для SARS-CoV-2. Також було ідентифіковано інгібітор на основі механізму (N3) за допомогою комп'ютерної розробки ліків, а потім визначено кристалічну структуру M<sup>pro</sup> SARS-CoV-2 у комплексі з цією сполукою. Завдяки поєднанню структурно-орієнтованого віртуального та високопродуктивного скринінгу було проаналізовано понад 10 000 сполук, включаючи схвалені ліки, кандидати у

ліки у клінічних випробуваннях та інші активні сполуки як інгібітори M<sub>pro</sub>. Шість з цих сполук інгібували M<sub>pro</sub>, демонструючи напівмаксимальні значення інгібуючої концентрації в діапазоні від 0,67 до 21,4 мкМ. Одна з цих сполук також продемонструвала перспективну противірусну активність у клітинних аналізах. Отримані результати демонструють ефективність стратегії скринінгу, яка може призвести до швидкого виявлення потенційних ліків із клінічним потенціалом у відповідь на нові інфекційні захворювання, для яких немає конкретних ліків чи вакцин [65] (рис. 3.1).



**Рис. 3. 1. Кристалічна структура основної протеази SARS-CoV-2 у комплексі з інгібітором N3 (PDB ID: 6LU7).**

Майже через два роки після перших доказів пандемія COVID-19 продовжує вражати людей у всьому світі, що підкреслює необхідність застосування кількох противірусних стратегій. Основна протеаза SARS-CoV-2 (M<sub>pro</sub>/3CL<sub>pro</sub>) є визнаною перспективною мішенню розробки ефективних ліків. Оскільки пригнічення однієї мішені може бути недостатньо для блокування інфекції та реплікації SARS-CoV-2, терапія на основі



мультиферментів може забезпечити кращу стратегію. Тут представлено структурну та біохімічну характеристику способу зв'язування MG-132 як з основною протеазою SARS-CoV-2, так і з людським катепсином-L, припускаючи таким чином цікавий каркас для розробки подвійних інгібіторів. Дані рентгеноструктурного аналізу показують, що MG-132 добре вписується в активний центр Mpro, утворюючи ковалентний зв'язок із Cys145 незалежно від відновників та умов кристалізації.



**Рис. 3. 2. Кристалічна структура основної протеази (3CLpro/Mpro) SARS-CoV-2 при роздільній здатності 1,65Å (просторова група P2(1)) (PDB ID: 7ALI).**

Стикування MG-132 з катепсином-L добре відповідає ковалентному зв'язуванню з каталітичним цистеїном. Відповідно, MG-132 інгібує катепсин-L з наномолярною активністю та оборотно інгібує Mpro з мікромольною активністю, але з тривалим часом перебування. Було порівняно структури Mpro, вирішені у різних просторових групах, та виявили нову структуру, яка має кілька подібностей, що відкриває цікаві перспективи для майбутнього дизайну ліків та можливостей *in silico* [66] (рис. 3.2).

У пошуках ліків проти COVID-19 вчені провели високопродуктивний рентгенівський кристалографічний скринінг двох перепрофільованих бібліотек ліків проти основної протеази SARS-CoV-2 (Mpro), яка потрібна для реплікації вірусу. На відміну від традиційних експериментів зі скринінгу фрагментів рентгенівського випромінювання з молекулами низької складності, у нашому скринінгу тестувалися вже схвалені ліки і ліки, що пройшли клінічні випробування.

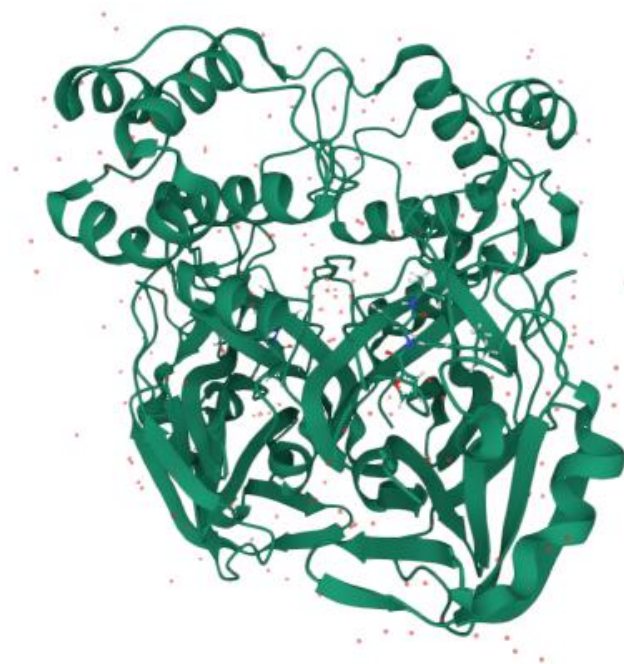


**Рис. 3. 3. Кристалічна структура основної протеази SARS-CoV-2 пов'язана з іфенпродилом (PDB ID: 7AQI).**

З тривимірних білкових структур ідентифікували 37 молекул, які зв'язуються з Mpro. У наступних аналізах зниження вірусів на клітинній основі одна пептидоміметична та шість не пептидних сполук показали протівірусну активність у нетоксичних концентраціях. Ми визначили два алостеричні сайти зв'язування, які являють собою привабливі мішені для розробки ліків проти SARS-CoV-2 [67] (рис. 3.3).

Вірусні протеази є критичними ферментами для дозрівання багатьох патогенних вірусів людини і таким чином є ключовими мішенями для протівірусних препаратів прямої дії (ПППД). Основна протеаза (Mpro)

знаходиться в центрі уваги великих можливостей з розробки ліків на основі структури, які в основному являють собою ковалентні інгібітори, націлені на каталітичний цистеїн. ML188 є не ковалентним інгібітором, призначеним для взаємодії з SARS-CoV-1 Mpro, і забезпечує початкову основу для створення ефективних корона вірусних інгібіторів [68] (рис. 3.4).



**Рис. 3. 4. Кристалічна структура основної протеази SARS-CoV-2 (Mpro) у комплексі з ML188 (PDB ID: 7L0D).**

### 3.1. Молекулярний докінг потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M<sup>Pro</sup>) SARS-COV-2.

Для молекулярного стикування було використано пакет програм Autodock 4.2. Підготовку лігандів проводили за допомогою програми MGL Tools 1.5.6. Оптимізація лігандів з формату mol в pdb проводилася за допомогою програмного додатку Avogadro. Для проведення стикування досліджуваних молекул та пептид у програмі Autodock 4.2. вихідні формати даних ферменту та лігандів конвертувалися у спеціальний формат PDBQT. Мапи рецептора готували у програмах MGL Tools та AutoGrid. З PDB файлу ID: 6LU7 були видалені молекули води, іони та ліганд.

Параметри докінгу наведені у таблиці 3.1

**Таблиця 3.1. Параметри молекулярного стикування програмного пакету Autodock 4.2.**

Параметр	Значення
крок поступального руху	2 Å
толерантність кластеру	2 Å
Коефіцієнт торсійної свободи	0,2983
зовнішня енергія решітки	1000
максимальна початкова енергія	0
максимальна кількість спроб	10000
кількість структур у популяції	150
максимальна кількість генерацій	27000
максимальна кількість етапів оцінки енергії	2500000
кількість структур, що переходять у наступне покоління	1
рівень кросовера	0.8
спосіб кросовера	арифметичний
$\beta$ -параметр розподілу Гауса	1
$\alpha$ -параметр розподілу Гауса	0
рівень генної мутації	0,02

Візуальний аналіз утворених комплексів цільових молекул в активних сайтах мішеней було проведено за допомогою програми Discovery Studio Visualizer.

З метою оцінки проведення молекулярної стикування досліджувані молекули з вірусною протеазою (Mpro) SARS-COV-2 було розраховано оціночні функції (скорингові функції). Ця функція враховує ентальпійну складову в утворенні вільної енергії зв'язування (Affinity DG) для кращих конформаційних положень. Також були обчислені величини вільної енергії зв'язування та константи зв'язування (EDoc kcal/mol) та Ki (mM/uM) для кращих конформаційних положень досліджуваних молекул. Це дозволяє оцінювати стійкість комплексів, утворених між лігандами та відповідним ферментом (табл. 3.2).

**Таблиця 3.2. Значення скорингових функцій, енергій та констант зв'язування для кращих конформаційних положень протестованих сполук у комплексі з вірусною протеазою (Mpro) SARS-COV-2**

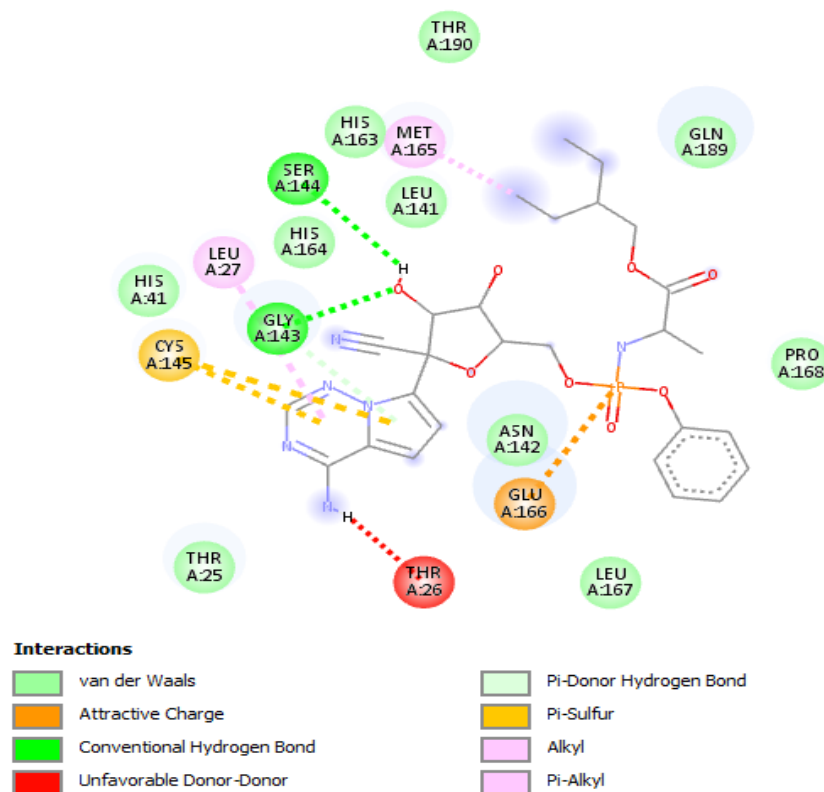
Сполуки	6LU7		
	Afinity DG, kcal/mol	EDoc kcal/mol	Ki uM micromolar
Молекула 1	-6.4	-5.39	112.79 uM
Молекула 2	-7.3	-6.25	26.20 uM
Молекула 3	-6.5	-6.22	27.69 uM
Гідроксихлорохін	-6.1	-3.55	2.49 uM
Ремдесивір	-6.5	-2.53	14.00 uM

Активність тест-молекул по відношенню до вірусної протеази (Mpro) SARS-COV-2 може виявлятися утворенням між ними комплексів, їх стійкість

забезпечується за рахунок енергетично вигідного геометричного розташування лігандів в активному центрі, утворення водневих зв'язків, міжмолекулярних електростатичних та гідрофобних контактів. Як наслідок, термодинамічна ймовірність цього зв'язування підтверджується негативними значеннями оціночної функції Affinity DG (ккал/моль), обчисленими значеннями вільної енергії зв'язування EDoc (ккал/моль) та констант зв'язування  $K_i$  (mM/uM) (табл. 3.2).

Наступним етапом молекулярного докінгу є аналіз геометричного розташування тестованих молекул в активному сайті вірусною протеазою (Mpro) SARS-COV-2.

Молекула Ремдесивіру з вірусною протеазою (PDB ID: 6LU7) утворює комплекс за рахунок водневих зв'язків між атомом кисню гідроксильної групи тетрагідрофуранового фрагмента та залишками амінокислот Ser144 та Gly143 (рис. 3.5, 3.6).



**Рис. 3.5** Діаграма міжмолекулярних взаємодій Ремдесивіру з вірусною протеазою (Mpro) SARS-COV-2 (PDB ID: 6LU7)

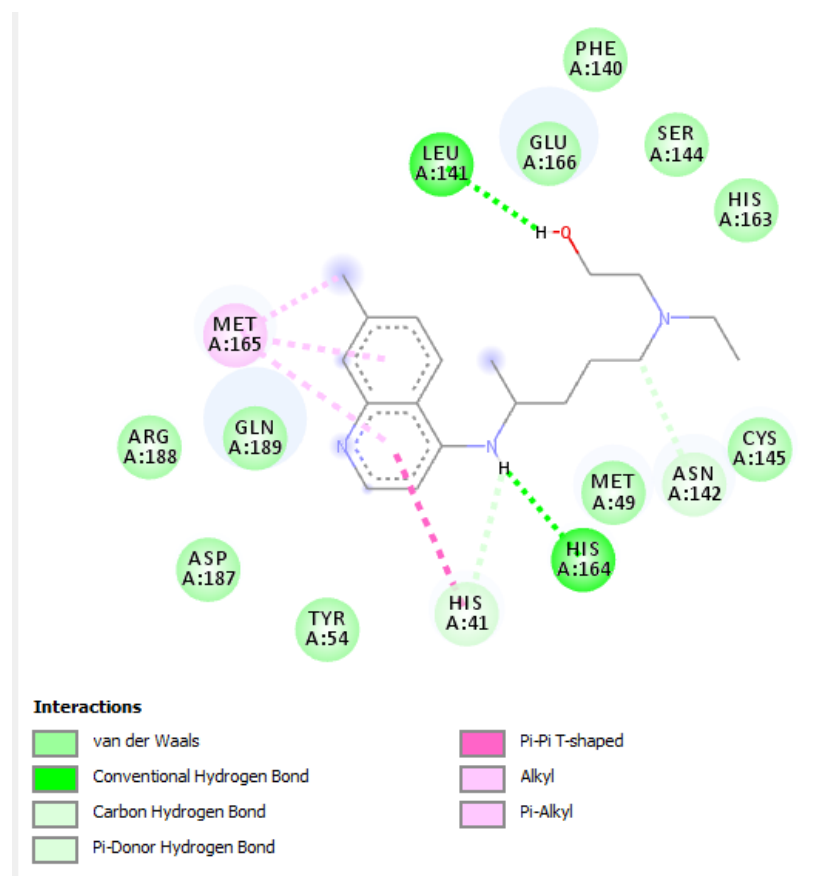


**Рис. 3.6. Суперпозиція Ремдесивіру в активному сайті вірусної протеази (Mpro) SARS-COV-2 (PDB ID: 6LU7)**

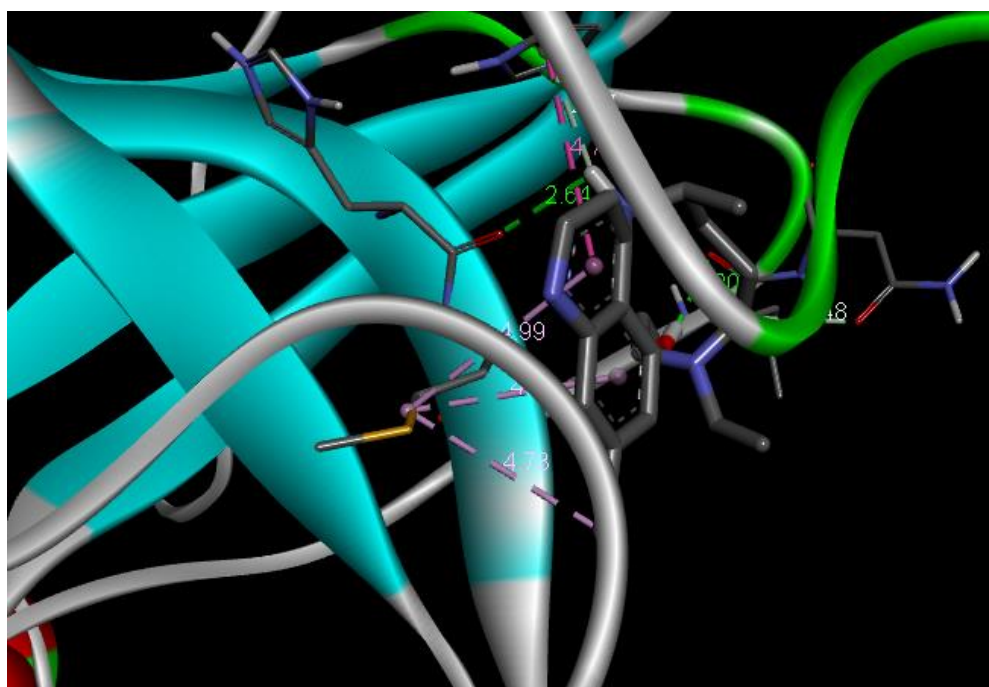
Сприятливий заряд виникає між атомом фосфору залишку ортофосфорної кислоти та залишком Glu166. Утворенню комплексу сприяє несприятлива донорно-донорна взаємодія, яка відбувається між протоном водню заміщеної аміногрупи піроло[2,1-f][1,2,4]тріазинового циклу із залишком амінокислоти Thr26. Взаємодія  $\pi$ -H,  $\pi$ -Сульфур відбувається між піроло[2,1-f][1,2,4]тріазиновим циклом та залишками Gly143 та Cys145 відповідно. Також стабілізації комплексу сприяють  $\pi$ -Alk та Alk взаємодії між тріазиновим, етильним фрагментами із залишками лейцину Leu27 та метіоніну Met165.

Молекула Гідроксихлорохіну з вірусною протеазою утворює комплекс за участю водневих зв'язків між водневими протонами гідроксильної, аміногрупи та залишками лейцину Leu141 та гістидину His164. Між водневим протоном аміно- та метильної груп із залишками амінокислот Asn142 і His41 виникають карбон-водневі взаємодії та  $\pi$ -H-зв'язок відповідно. Додатково стабілізується комплекс  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ -Alk та Alk взаємодій із залишками

амінокислот Met165, His41 (рис. 3.7, 3.8).



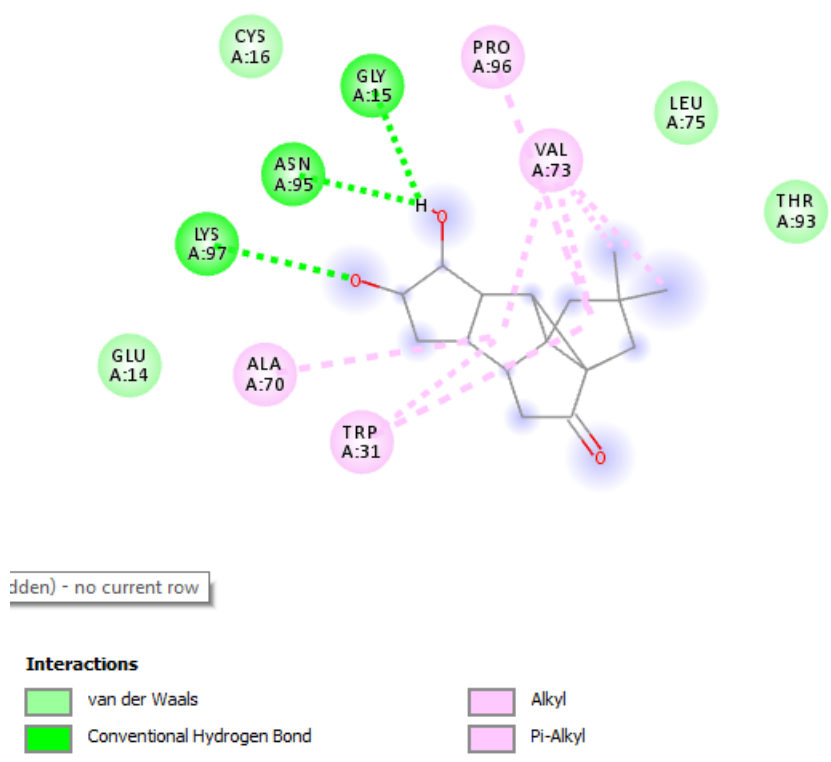
**Рис. 3.7.** Діаграма міжмолекулярних взаємодій Гідроксихлорохіну з вірусною протеазою (Mpro) SARS-COV-2 (PDB ID: 6LU7)



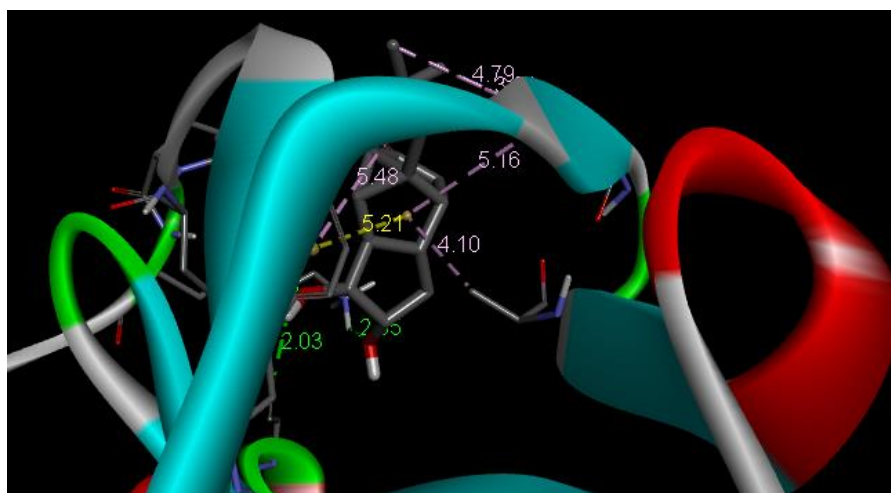
**Рис. 3.8.** Суперпозиція Гідроксихлорохіну в активному сайті вірусної протеази (Mpro) SARS-COV-2 (PDB ID: 6LU7)



Молекула 1 утворює комплекс з вірусною протеазою за рахунок водневих зв'язків, що виникають між атомами кисню та водню гідроксильних груп із залишками Lys97, Asn95 та Gly15. Взаємодії  $\pi$ -Alk та Alk із залишками амінокислот Val73, Pro96, Ala70 та Trp31 сприяють стабілізації комплексу (рис. 3.9, 3.10).

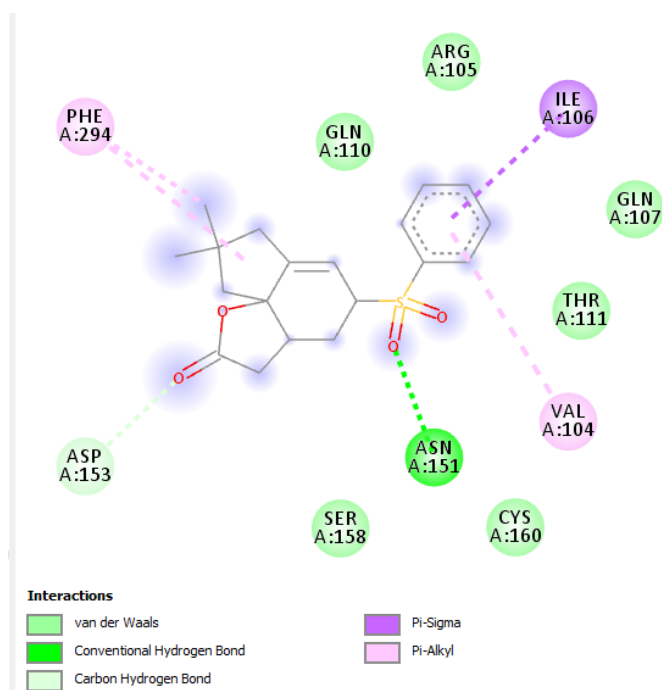


**Рис. 3.9.** Діаграма міжмолекулярних взаємодій молекули 1 з вірусною протеазою (Mpro) SARS-COV-2 (PDB ID: 6LU7)

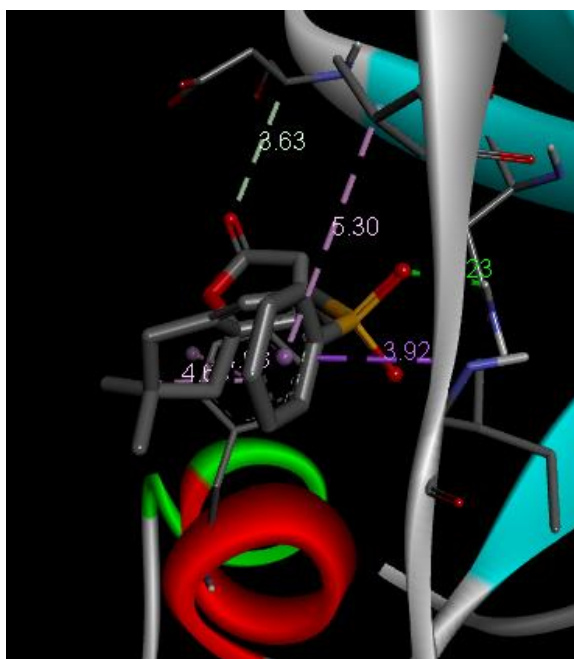


**Рис. 3.10.** Суперпозиція молекули 1 в активному сайті вірусної протеази (Mpro) SARS-COV-2 (PDB ID: 6LU7)

Утворенню комплексу молекули 2 з протеазою вірусу SARS-COV-2 (Mpro) сприяють водневі та карбон-водневі зв'язки, що виникають між атомами кисню сульфо- та кетогруп досліджуваної молекули із залишками Asp151 та Asp153.



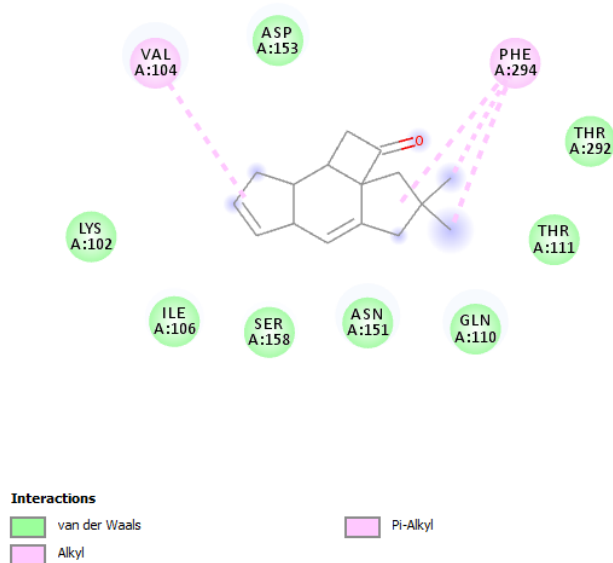
**Рис. 3.11.** Діаграма міжмолекулярних взаємодій молекули 2 з вірусною протеазою (Mpro) SARS-COV-2 (PDB ID: 6LU7)



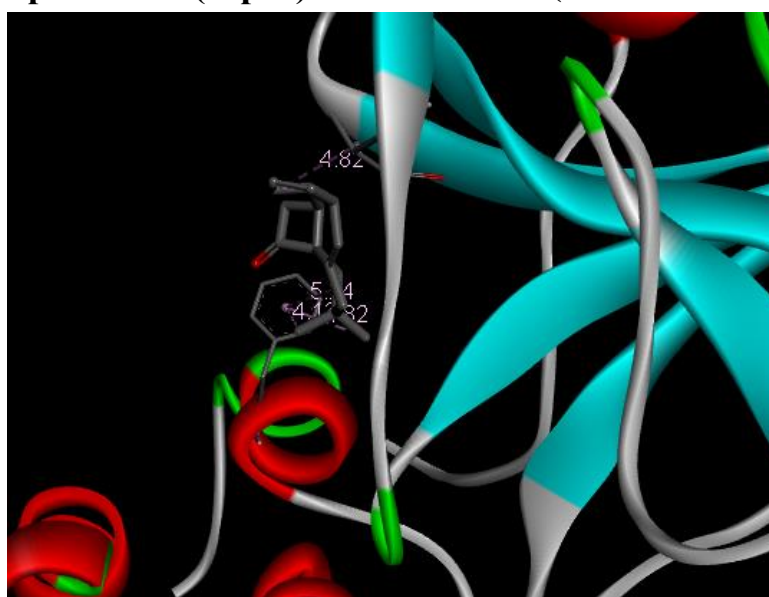
**Рис. 3.12.** Суперпозиція молекули 2 в активному сайті вірусної протеази (Mpro) SARS-COV-2 (PDB ID: 6LU7)

Зв'язок  $\pi$ - $\sigma$  утворюється між фенільним фрагментом та залишком ізолейцину Phe106. Комплекс  $\pi$ -Alk стабілізується взаємодіями метильного, циклопентанового та фенільного фрагментів молекули із залишками Phe294 та Val104 відповідно (рис. 3.11, 3.12).

Комплекс з вірусною протеазою молекули 3 утворюється за допомогою  $\pi$ -Alk і Alk взаємодій між метальними замісниками та конденсованою системою циклобута[d]s-індацен-2-ону з залишками амінокислот фенілаланіну Phe294 та валіну Val104 (рис. 3.13, 3.14).



**Рис. 3.13.** Діаграма міжмолекулярних взаємодій молекули 3 з вірусною протеазою (Mpro) SARS-COV-2 (PDB ID: 6LU7)



**Рис. 3.14.** Суперпозиція молекули 3 в активному сайті вірусної протеази (Mpro) SARS-COV-2 (PDB ID: 6LU7)

Враховуючи детальний аналіз розташування протестованих молекул в активному сайті фермента, утворення між ними цілого ряду міжмолекулярних взаємодій, негативних значень скорингових функцій і обчислених значень вільних енергій та констант зв'язування, можна зробити висновок, що тестовані сполуки мають високу спорідненість до вірусної протеази (M<sub>pro</sub>) SARS-COV-2.

Отримані результати молекулярного стикування можуть бути корисними для подальшого експериментального скринінгу.

### ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

1. Вірусні протеази є критичними ферментами для багатьох патогенних вірусів людини і таким чином є ключовими мішенями для противірусних препаратів прямої дії. Органайзер кристалографічних моделей вірусної протеази (M<sub>pro</sub>) SARS-COV-2 дозволив вибрати найбільш оптимальну модель для докінгу досліджуваних молекул.
2. Згідно з отриманими результатами молекулярного докінгу, а саме: негативними значеннями скорингової функції Affinity DG (ккал/моль), розрахунковими значеннями вільної енергії зв'язування E<sub>Dos</sub> (ккал/моль) та констант зв'язування K<sub>i</sub> встановлено, що досліджувані молекули мають високу спорідненість до вірусної протеази
3. Встановлено, що активність молекул, що тестуються по відношенню до вірусної протеази (M<sub>pro</sub>) SARS-COV-2, може проявлятися утворенням між ними комплексів, їх стійкість забезпечується в основному за рахунок енергетично вигідного геометричного розташування лігандів в активному сайті акцептора. Таке утворення можливе за рахунок водневих зв'язків, міжмолекулярних електростатичних та гідрофобних контактів
4. Отримані в результаті дослідження дані можуть бути використані для обґрунтування доцільності проведення експериментального скринінгу та рекомендацій для раціонального дизайну майбутніх ліків.

## ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Систематизовано, проаналізовано та узагальнено літературні дані щодо механізмів дії противірусних препаратів та характеристики лікарських засобів з противірусною дією. Досягнуто величезний прогрес у розумінні генетичної основи та молекулярного механізму вірусних захворювань, що дає великий потенціал для пошуку нових молекул спрямованої дії.
2. Об'єктами докінгових досліджень були обрані структури, що належать до класу конденсованих циклоalkanів та циклоалкенів, модифіковані карбонільними, сульфонільними, гідроксильними, арильними групами. Для порівняльної характеристики також були запропоновані Ремдесивір та Гідроксихлорохін, які входили до формулярів лікування при SARS-COV-2 та показали високу ефективність.
3. Для докінгових досліджень нами був використаний програмний пакет Autodock 4.2, який дозволяє проведення гнучкого рецепторно-орієнтованого докінгу. Вибір даного програмного пакета обґрунтований тим, що віртуальні умови, що використовуються, дають можливість максимально наблизити утворення комплексу між досліджуваною молекулою і рецептором до умов, які існують у біологічних системах.
4. Вірусні протеази є критичними ферментами для багатьох патогенних вірусів людини і таким чином є ключовими мішенями для противірусних препаратів прямої дії. Органайзер кристалографічних моделей вірусної протеази (Mpro) SARS-COV-2 дозволив вибрати найбільш оптимальну модель для докінгу досліджуваних молекул.
5. Згідно з отриманими результатами молекулярного докінгу, а саме: негативними значеннями скорингової функції Affinity DG (ккал/моль), розрахунковими значеннями вільної енергії зв'язування EDoc (ккал/моль) та констант зв'язування  $K_i$  встановлено, що досліджувані молекули мають високу спорідненість до вірусної протеази

6. Встановлено, що активність молекул, що тестуються по відношенню до вірусної протеази (M<sub>pro</sub>) SARS-COV-2, може проявлятися утворенням між ними комплексів, їх стійкість забезпечується в основному за рахунок енергетично вигідного геометричного розташування лігандів в активному сайті акцептора. Таке утворення можливе за рахунок водневих зв'язків, міжмолекулярних електростатичних та гідрофобних контактів
7. Отримані в результаті дослідження дані можуть бути використані для обґрунтування доцільності проведення експериментального скринінгу та рекомендацій для раціонального дизайну майбутніх ліків.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. . Balloux F. and van Dorp L. Q&A: What are pathogens, and what have they done to and for us? *BMC Biology*. 2017, 15, 1–6.
2. Champe HRAPC and Fisher BD (2007) Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
3. Saxena S.K, Saxena S., Saxena R., et al. Emerging trends, challenges and prospects in antiviral therapeutics and drug development for infectious diseases. *Electronic Journal of Biology*. 2010, 6, 26–31.
4. De Clercq E. and Li G. () Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016, 29, 695–747.
5. He H. Vaccines and antiviral agents. Current Issues in Molecular Virology: *Viral Genetics and Biotechnological Applications*. 2013, 2013, 239–250.
6. Parks J.M. and Smith J.C. How to discover antiviral drugs quickly. The New England Journal of Medicine. 2020, 382(23), 2261–2264.
7. Shin W.J. and Seong B.L. Novel antiviral drug discovery strategies to tackle drug-resistant mutants of influenza virus strains. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2019, 14, 153–168.
8. Asiri Y.I., Alsayari A., Muhsinah A.B., et al. Benzothiazoles as potential antiviral agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020, 72, 1459–1480.
9. Ryu W.S. Virus life cycle. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. 2017, 2017, 31–45.
10. Connolly S.A., Jackson J.O., Jardetzky T.S., et al. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nature Reviews Microbiology*. 2011, 9, 369–381.
11. Balfour J.R. HH. Resistance of herpes simplex to acyclovir. *Annals of Internal Medicine*. 2003, 98, 404–406.
12. Fyfe J., Keller P., Furman P., et al. Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-



- hydroxyethoxymethyl) guanine. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, 253, 8721–8727.
13. Derse D., Cheng Y, Furman P., et al. Inhibition of purified human and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine triphosphate. Effects on primer-template function. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001, 56, 11447–11451.
  14. Furman P.A., St Clair M. and Spector T. Acyclovir triphosphate is a suicide inactivator of the herpes simplex virus DNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, 259, 9575–9579.
  15. de Miranda P. and Blum M.R. () Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1993, 12, 29–37.
  16. Balfour H.H Jr., Chace B.A., Stapleton J.T., et al. A randomized, placebo-controlled trial of oral acyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in recipients of renal allografts. *The New England Journal of Medicine*. 1999, 320, 1381–1387.
  17. Fletcher C., Englund J., Edelman C., et al. Pharmacologic basis for high-dose oral acyclovir prophylaxis of cytomegalovirus disease in renal allograft recipients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, 35, 938–943.
  18. Meyers J.D., Wade J.C., Mitchell C.D., et al. Multicenter collaborative trial of intravenous acyclovir for treatment of mucocutaneous herpes simplex virus infection in the immunocompromised host. *The American Journal of Medicine*. 1982, 73, 229–235.
  19. Soul-Lawton J., Seaber E., On N, et al. Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005, 39, 2759–2764.
  20. Erice A., Jordan M.C., Chace B.A., et al. Ganciclovir treatment of cytomegalovirus disease in transplant recipients and other immunocompromised hosts. *JAMA*. 1997, 257, 3082–3087.

21. Anderson R.D., Griffy K.G., Jung D., et al. () Ganciclovir absolute bioavailability and steady-state pharmacokinetics after oral administration of two 3000-mg/d dosing regimens in human immunodeficiency virus—and cytomegalovirus-seropositive patients. *Clinical Therapeutics*. 2005, 17, 425–432.
22. Boyd M.R., Bacon T.H., Sutton D., et al. Antiherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine (BRL 39123) in cell culture. *Antimicrobial Agents Chemotherapeutics* 1997, 31, 1238– 1242.
23. Tying S., Barbarash R.A., Nahlik J.E, et al. Famciclovir for the treatment of acute herpes zoster: effects on acute disease and postherpetic neuralgia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of Internal Medicine*. 1995, 123, 89–96.
24. Safrin S, Crumpacker C, Chatis P, et al. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 1991, 325, 551–555.
25. Huggins J.W., Hsiang C.M., Cosgriff T.M., et al. Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*. 1991, 164, 1119–1127.
26. Taylor K., Fritz K. and Parmar M. (2020) Lamivudine. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
27. Dolin R., Reichman R.C., Madore H.P., et al. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *The New England Journal of Medicine*. 1982, 307, 580–584.
28. Frediansyah A., Tiwari R., Sharun K., et al. () Antivirals for COVID-19: A critical review. *Clinical Epidemiology and Global Health*. 2020, 9, 90–98.
29. Jomah S., Asdaq S.M.B. and Al-Yamani M.J. Clinical efficacy of antivirals against novel coronavirus (COVID-19): A review. *Journal of Infection and Public Health* 2020, 13(9), 1187–1195.

30. Saha A., Sharma A.R., Bhattacharya M., et al. () Probable molecular mechanism of Remdesivir for the treatment of COVID-19: Need to know more. *Archives of Medical Research*. 2020. 51(6), 585–586.
31. Yavuz S. and Ünal S. Antiviral treatment of COVID-19. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2020, 50, 611–619.
32. Guan W-j, Ni Z-y, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *The New England Journal of Medicine*. 2020, 382, 1708–1720.
33. Grein J., Ohmagari N. and Shin D. Original: Compassionate use of remdesivir for patients with severe covid-19. *The New England Journal of Medicine*. 2020, 382, 2327–2336.
34. McCreary E.K. and Pogue J.M. Coronavirus disease 2019 treatment: A review of early and emerging options. *Open Forum Infectious Diseases*. 2020, 7(4), ofaa105.
35. Rossignol J.F. Nitazoxanide, a new drug candidate for the treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Infection and Public Health*. 2016, 9, 227–230.
36. Jasenosky L.D., Cadena C., Mire C.E., et al. The FDA-approved oral drug nitazoxanide amplifies host antiviral responses and inhibits Ebola virus. *IScience*. 2019, 19, 1279–1290.
37. Choy K.T., Wong AY. L., Kaewpreedee P., et al. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antiviral Research*. 2020, 178, 104786.
38. Bell WR, Chulay JD and Feinberg JE () Manifestations resembling thrombotic microangiopathy in patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV) disease in a cytomegalovirus prophylaxis trial (ACTG 204). *Medicine*. 1997, 76, 369–380.
39. Renis H.E. In vitro antiviral activity of calcium elenolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999, 9, 167.

40. Stark J., Heath R., Oswald N., et al. A trial of chemoprophylaxis of natural influenza infection with UK 2371. *Thorax*. 1970, 25, 649–655.
41. Takemoto K. and Liebhaber H. Viruspolysaccharide interactions: I. An agar polysaccharide determining plaque morphology of EMC virus. *Virology*. 1991, 14, 456–462.
42. Leinbach S.S., Reno J.M., Lee L.F., et al. Mechanism of phosphonoacetate inhibition of herpesvirus-induced DNA polymerase. *Biochemistry*. 1976, 15, 426–430.
43. Overby L., Duff R. and Mao J.H. Antiviral potential of phosphonoacetic acid. *Annals of New York Academy of Sciences*. 1977, 284, 310.
44. Jamieson A., Gentry G. and Subak-Sharpe J. Induction of both thymidine and deoxycytidine kinase activity by herpes viruses. *The Journal of General Virology*. 1974, 24, 465–480.
45. Kit S., Leung W.C., Trkula D., et al. Gel electrophoresis and isoelectric focusing of mitochondrial and viral-induced thymidine kinases. *International Journal of Cancer*. 1974, 13, 203–218.
46. Cheng Y.C., Domin B.A., Sharma R.A., et al. Antiviral action and cellular toxicity of four thymidine analogues: 5-Ethyl-, 5-vinyl-, 5-propyl-, and 5-allyl-2'-deoxyuridine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1976. 10, 119–122.
47. Declercq Et. and Torrence P. ( ) Nucleoside analogs with selective anti-viral activity. *Journal of Carbohydrates-Nucleosides-Nucleotides*. 1978, 5, 187–224.
48. Cheng Y.C. A rational approach to the development of antiviral chemotherapy: Alternative substrates of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) thymidine kinase (TK). *Annals of New York Academy of Sciences*. 1977, 284, 594–598.
49. Goswami B.B., Borek E., Sharma O.K., et al. The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 1979, 89, 830–836.

50. Adams B., Morgan M., Muthukrishnan S., et al. The effect of “cap” analogs on reovirus mRNA binding to wheat germ ribosomes. Evidence for enhancement of ribosomal binding via a preferred cap conformation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1978, 253, 2589–2595.
51. Lodish H.F. and Rose J. Relative importance of 7-methylguanosine in ribosome binding and translation of vesicular stomatitis virus mRNA in wheat germ and reticulocyte cell-free systems. *The Journal of Biological Chemistry*. 1977, 252, 1181–1188.
52. Bergmann J. and Lodish H. Translation of capped and uncapped vesicular stomatitis virus and reovirus mRNA'S. Sensitivity to m7GpppAm and ionic conditions. *The Journal of Biological Chemistry*. 1979, 254, 459–468.
53. Contreras A. and Carrasco L. Selective inhibition of protein synthesis in virus-infected mammalian cells. *Journal of Virology*. 1979, 29, 114–122.
54. Kitchen D.B., Decornez H., Furr J.R., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov*. 2004, 3(11), 935-949.
55. Bohm H.J. Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. *J Comput Aided Mol Des*. 1998, 12(4), 309-323.
56. Gehlhaar D.K., Verkhivker G.M., Rejto P.A., Sherman C.J., Fogel D.B., Fogel L.J., Freer S.T. Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. *Chem Biol*. 1995, 2(5), 317-24.
57. Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*. 1997, 267(3), 727-748.
58. Oshiro C.M., Kuntz I.D., Dixon J.S. Flexible ligand docking using a genetic algorithm. *J Comput Aided Mol Des*. 1995, 9(2), 113-130.

59. Jain A.N. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: a continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *J Comput Aided Mol Des.* 1996, 10(5), 427-440.
60. Head R.D., Smythe M.L., Oprea T.I., Waller C.L., Green S.M., Marshall G.R. VALIDATE: A New Method for the Receptor-Based Prediction of Binding Affinities of Novel Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 3959-3969.
61. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 200, 30(16), 2785-2791.
62. Kitchen D.B., Decornez H., Furr J.R., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2004, 3(11), 935-949.
63. Verkhivker G.M., Bouzida D., Gehlhaar D.K., Rejto P.A., Arthurs S., Colson A.B., Freer S.T., Larson V., Luty B.A., Marrone T., Rose P.W. Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. *J Comput Aided Mol Des.* 2000, 14(8), 731-751.
64. Park J.H., Liu Y., Lemmon M.A., Radhakrishnan R. Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain. *Biochem J.* 2012, 448, 417-423.
65. 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 Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020, 582, 289-293.
66. Costanzi, E., Kuzikov, M., Esposito, F., Albani, S., Demitri, N., Giabbai, B., Camasta, M., Tramontano, E., Rossetti, G., Zaliani, A., Storici, P. Structural and Biochemical Analysis of the Dual Inhibition of MG-132 against SARS-

- CoV-2 Main Protease (Mpro/3CLpro) and Human Cathepsin-L. *Int J Mol Sci.* 2021, 22.
67. Gunther, S., Reinke, P.Y.A., Fernandez-Garcia, Y., Lieske, J., Lane, T.J., Ginn, H.M., Koua, F.H.M. X-ray screening identifies active site and allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *Science.* 2021, 372: 642-646.
68. 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.

**Національний фармацевтичний університет**

Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту

Кафедра медичної хімії

Ступінь вищої освіти магістр

Спеціальність 226 Фармація, промислова фармація

Освітня програма Фармація

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
**Завідувачка кафедри**  
**медичної хімії**

---

**Ліна ПЕРЕХОДА**

«22» серпня 2022 року

**ЗАВДАННЯ**  
**НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ**

**Катерини СИДОРЕНКО**

1. Тема кваліфікаційної роботи: *«In silico»* дослідження потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) SARS-COV-2»  
керівник кваліфікаційної роботи: Маргарита СУЛЕЙМАН, к.фарм.н., доцент  
затверджений наказом НФаУ від «14» жовтня 2022 року № 227.
2. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи: грудень 2022 р.
3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: використання молекулярного докінгу, як сучасного методу *in silico* досліджень, для пошуку потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) SARS-COV-2.
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1) створити необхідний органайзер мішеней кристалографічних моделей вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) SARS-COV-2 з метою вибору оптимальної докінгової стиковки; 2) провести молекулярний докінг нових молекул для виявлення противірусної активності та дослідити характер зв'язування Ремдесивіру та Гідроксихлорохіну з вірусною протеазою; 3) дати оцінку отриманим обчислювальним результатам докінгу та провести докладний аналіз геометричного розташування досліджуваних лігандів в активному сайті вірусної протеази.
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): таблиць – 4, рисунків – 22.



6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Ім'я, ПРІЗВИЩЕ, посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Маргарита СУЛЕЙМАН, доцент кафедри медичної хімії	22.08.2022	23.08.2022
2	Маргарита СУЛЕЙМАН, доцент кафедри медичної хімії	29.10.2022	29.10.2022
3	Маргарита СУЛЕЙМАН, доцент кафедри медичної хімії	28.11.2022	29.11.2022

7. Дата видачі завдання: «22» серпня 2022 року.

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1	Характеристика механізмів дії противірусних препаратів. огляд лікарських засобів з противірусною активністю (огляд літератури) Написання розділу 1	серпень - вересень 2022 р.	<b>виконано</b>
2	Характеристика та аргументація вибору об'єктів і методів дослідження. Написання розділу 2	вересень 2022 р.	<b>виконано</b>
3	Створення органайзеру кристалографічних мішеней вірусної протеази SARS-COV-2.	жовтень 2022 р.	<b>виконано</b>
4	Проведення молекулярного докінгу потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M <sup>pro</sup> ) SARS-COV-2.	листопад-грудень 2022 р	<b>виконано</b>
5	Написання розділу 3. Оформлення кваліфікаційної роботи	грудень 2022 р.	<b>виконано</b>

Здобувач вищої освіти \_\_\_\_\_

Катерина СИДОРЕНКО

Керівник кваліфікаційної роботи \_\_\_\_\_

Маргарита СУЛЕЙМАН

**ВИТЯГ З НАКАЗУ № 227**  
по Національному фармацевтичному університету  
від 14 жовтня 2022 року

**Про затвердження тем кваліфікаційних робіт**

Затвердити теми кваліфікаційних робіт, керівників-консультантів та рецензентів здобувачам вищої освіти **5 курсу**, спеціальність – **226 Фармація, промислова фармація**, освітня програма – **Фармація** (для осіб, що мають ОКР «молодший спеціаліст» за напрямом «Медицина»), ступінь вищої освіти – **магістр**, термін навчання – **4 р. 6 міс.**, **заочна** форма.

Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	Тема кваліфікаційної роботи (українською мовою)	Тема кваліфікаційної роботи (англійською мовою)	Керівник кваліфікаційної роботи	Рецензент кваліфікаційної роботи
Сидоренко Катерина Олегівна	<i>In silico</i> дослідження потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M <sup>pro</sup> ) SARS-CoV-2	<i>In silico</i> study of potential antiviral molecules against SARS-CoV-2 viral protease (M <sup>pro</sup> )	к.фарм.н., доцент закладу вищої освіти кафедри медичної хімії Сулейман М.М.	к.фарм.н., доцент закладу вищої освіти кафедри фармацевтичної хімії Северіна Г.І.

**Ректор**

**Алла КОТВИЦЬКА**

Вірно:  
Декан факультету фармацевтичних технологій та менеджменту



**Наталія ЖИВОРА**

**ВИСНОВОК**

**Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу  
щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі  
здобувача вищої освіти**

№ 110276 від «20» грудня 2022 р.

Проаналізувавши випускню кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти заочної форми навчання Сидоренко Катерини Олегівни, 5 курсу, \_\_\_\_\_ групи, спеціальності 226 Фармація, промислова фармація, на тему: «*In silico* дослідження потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) SARS-CoV-2 / *In silico* study of potential antiviral molecules against SARS-CoV-2 viral protease (M<sup>pro</sup>).», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (компіляції).

**Голова комісії,  
професор**



**Інна ВЛАДИМИРОВА**

**3%**

**21%**

**ВІДГУК**

наукового керівника на кваліфікаційну роботу ступеня вищої освіти  
магістр, спеціальності 226 Фармація, промислова фармація

**Катерини СИДОРЕНКО**

на тему: «*In silico* дослідження потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) SARS-COV-2».

**Актуальність теми.** Велику допомогу в розробці нових ліків з противірусною активністю надають знання про віруси, методи та інструменти, що швидко розвиваються. Найкраще розуміння вірусів дозволить встановити корисні заходи для боротьби з вірусними захворюваннями, і дослідники всього світу докладають усіх можливих зусиль, щоб контролювати поширення вірусних захворювань. Початковим етапом розробки нових молекул та пошук потенційних засобів спрямованої дії серед існуючих – є методологія зв'язування ліганд-мішень в активному сайті обраного ферменту чи рецептора. Отримані результати даного дослідження дозволять скоротити витрати, як матеріальні так і технологічні, на етапах синтетичних і скринінгових досліджень.

**Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість.**

Відповідно до отриманих результатів молекулярного докінгу, а саме: негативними значеннями скорингової функції Affinity DG (ккал/моль), розрахунковими значеннями вільної енергії зв'язування EDoc (ккал/моль) та констант зв'язування K<sub>i</sub> встановлено, що досліджувані молекули мають велику спорідненість до вірусної протеази. Інгібуюча активність молекул, що тестуються по відношенню до вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) SARS-COV-2, може проявлятися утворенням між ними комплексів, їх стійкість забезпечується за рахунок енергетично вигідного геометричного розташування лігандів в активному сайті акцептора за рахунок наявності водневих зв'язків, міжмолекулярних електростатичних та донорно-акцепторних взаємодій між

ними. Отримані результати молекулярного стикування можуть бути корисними для подальшого експериментального скринінгу.

**Оцінка роботи.** Робота виконана на високому рівні, одержані результати надійні, висновки логічні та обґрунтовані. Загальна оцінка роботи є позитивною.

**Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту.** Робота виконана на високому рівні з науковою новизною і практичною значущістю отриманих результатів. Робота по тематиці, рівню виконання, обґрунтованістю висновків відповідає вимогам, що висуваються до випускних робіт і може бути представлена до захисту в Екзаменаційній комісії.

Науковий керівник

\_\_\_\_\_

Маргарита СУЛЕЙМАН

07 грудня 2022 р.

**РЕЦЕНЗІЯ**

**на кваліфікаційну роботу ступеня вищої освіти магістр, спеціальності  
226 Фармація, промислова фармація**

**Катерини СИДОРЕНКО**

**на тему: «*In silico* дослідження потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) SARS-COV-2».**

**Актуальність теми.** В останні роки досягнуто величезного прогресу в розумінні генетичної основи та молекулярного механізму хвороб. Було розроблено різні нові ліки, і в даний час ведеться розробка багатьох інших. Проте, нові інфекційні захворювання, викликані вірусами, наприклад, SARS-COV-2, залишаються проблемою. Велику допомогу в розробці нових ліків з противірусною активністю надають знання про віруси, методи та інструменти, що швидко розвиваються. Найкраще розуміння вірусів дозволить встановити корисні заходи для боротьби з вірусними захворюваннями, і дослідники всього світу докладають усіх можливих зусиль, щоб контролювати поширення вірусних захворювань. Етапом розробки нових молекул та пошук потенційних засобів спрямованої дії серед існуючих – є молекулярний докінг. Отримані результати дозволять скоротити витрати, як матеріальні так і технологічні, на етапах синтетичних і скринінгових досліджень.

**Теоретичний рівень роботи.** Кваліфікаційна робота складається зі вступної частини, огляду літератури, розділу експериментальних досліджень. Мета і завдання дослідження сформовані чітко і спрямовані на комплексне вирішення досліджуваної проблеми. У роботі чітко інтерпретовані результати дослідження і сформульовані відповідні висновки.

**Пропозиції автора з теми дослідження.** Отримані результати молекулярного стикування можуть бути корисними для подальшого експериментального скринінгу.

**Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість.**

Відповідно до отриманих результатів молекулярного докінгу, а саме: негативними значеннями скорингової функції Affinity DG (ккал/моль), розрахунковими значеннями вільної енергії зв'язування EDoc (ккал/моль) та констант зв'язування  $K_i$  встановлено, що досліджувані молекули мають велику спорідненість до вірусної протеази. Інгібуюча активність молекул, що тестуються по відношенню до вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) SARS-COV-2, може проявлятися утворенням між ними комплексів, їх стійкість забезпечується за рахунок енергетично вигідного геометричного розташування лігандів в активному сайті акцептора. Таке утворення можливе за рахунок наявності водневих зв'язків, міжмолекулярних електростатичних та донорно-акцепторних взаємодій між ними.

**Недоліки роботи.** У роботі зустрічаються невелика кількість граматичних помилок. Представлені зауваження не принципові і суттєво не впливають на наукову і практичну цінність кваліфікаційної роботи..

**Загальний висновок і оцінка роботи.** Кваліфікаційна робота Катерини СИДОРЕНКО на тему: «*In silico* дослідження потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) SARS-COV-2» може бути рекомендована до офіційного захисту у Екзаменаційній комісії Національного фармацевтичного університету а її автор заслуговує на високу оцінку.

Рецензент \_\_\_\_\_

доц. Ганна СЕВЕРІНА

«16» грудня 2022 р.

## ВИТЯГ

з протоколу засідання кафедри медичної хімії

№ 5 від 23 грудня 2022 р.

### ПРИСУТНІ:

проф. Ліна ПЕРЕХОДА, доц. Вадим ЗУБКОВ, доц. Ірина СИЧ, доц. Віталій ЯРЕМЕНКО, доц. Ілля ПОДОЛЬСЬКИЙ, доц. Наталія КОБЗАР, доц. Марина РАХІМОВА, доц. Маргарита СУЛЕЙМАН, ас. Олена БЕВЗ, ас. Ольга ВІСЛОУС.

### ПОРЯДОК ДЕННИЙ:

Звіт про стан виконання кваліфікаційної роботи здобувача вищої освіти факультету фармацевтичних технологій та менеджменту Фс18(4,5з)мед-01б (226 Фармація, промислова фармація освітньої програми Фармація) Катерини СИДОРЕНКО на тему: «*In silico* дослідження потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M<sup>Pro</sup>) SARS-COV-2».

**СЛУХАЛИ:** доповідь здобувача вищої освіти факультету фармацевтичних технологій та менеджменту Фс18(4,5з)мед-01б Катерини СИДОРЕНКО на тему: «*In silico* дослідження потенційних противірусних молекул щодо вірусної протеази (M<sup>Pro</sup>) SARS-COV-2», керівник доцент каф. медичної хімії, к.фарм.н., Маргарита СУЛЕЙМАН

**УХВАЛИЛИ:** рекомендувати кваліфікаційну роботу Катерини СИДОРЕНКО до офіційного захисту в Екзаменаційній комісії.

**Зав. кафедри медичної хімії,**

**професор**

**Ліна ПЕРЕХОДА**

**Секретар кафедри медичної хімії,**

**доцент**

**Марина РАХІМОВА**



**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**ПОДАННЯ  
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ  
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Направляється здобувачка вищої освіти Катерина СИДОРЕНКО до захисту кваліфікаційної роботи за галуззю знань 22 Охорона здоров'я спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація освітньою програмою Фармація на тему: «*In silico* дослідження потенційних протівірусних молекул щодо вірусної протеази (M<sup>pro</sup>) SARS-COV-2».

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету \_\_\_\_\_ / Наталія ЖИВОРА /

**Висновок керівника кваліфікаційної роботи**

Здобувачка вищої освіти Катерина СИДОРЕНКО за час виконання експерименту і узагальнення отриманих результатів проявила себе кваліфікованим спеціалістом. Роботу виконала вчасно, має добру практичну та теоретичну підготовку. Кваліфікаційна робота може бути рекомендована до захисту в Екзаменаційній комісії.

Керівник кваліфікаційної роботи

\_\_\_\_\_

Маргарита СУЛЕЙМАН

«07» грудня 2022 р.

**Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу**

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувачка вищої освіти Катерина СИДОРЕНКО допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри  
медичної хімії

\_\_\_\_\_

Ліна ПЕРЕХОДА

« 23 » грудня 2022 року

Кваліфікаційну роботу захищено

у Екзаменаційній комісії

«07» лютого 2023 р.

З оцінкою \_\_\_\_\_

Голова Екзаменаційної комісії,

доктор фармацевтичних наук, професор

\_\_\_\_\_ / Володимир ЯКОВЕНКО /