

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
ННІ «Фізико-технічний факультет»
Кафедра медичної фізики та біомедичних нанотехнологій

Пояснювальна записка

До дипломної роботи магістра

на тему (укр. мова) Комп'ютерне моделювання взаємодії тилорону та
молнупіравіру з модельними мембранами та рецептор-зв'язуючим доменом
спайк-білка SARS-CoV-2

на тему (англ. мова) Computer modeling of interactions of tilorone and
molnupiravir with model membranes and receptor-binding domain of SARS-
CoV-2 spike protein

Виконала: студентка 6 курсу, групи ТЛ-61

Напрямок підготовки 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»

Єлизавета БРЮХОВЕЦЬКА

(підпис, прізвище та ініціали)

Науковий керівник:

Галина ГОРБЕНКО

(підпис, прізвище та ініціали)

Рецензент:

Анна ЛАГУТА

Харків – 2022 року

АНОТАЦІЯ

Брюховецька Є. О. – Комп'ютерне моделювання взаємодії тілорону та молнупіравіру з модельними мембранами та рецептор-зв'язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2. – Рукопис.

Дипломна робота магістра за спеціальністю 105 «Прикладна фізика та наноматеріали» – Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Харків, 2022.

53 с., 22 рис., 9 табл., 40 джерел.

Пандемія COVID-19, яка спричинена важким гострим респіраторним синдромом, вірусом (SARS-CoV-2), новим коронавірусом із групи CoV, стала серйозною загрозою для громадського здоров'я. На момент написання цієї роботи навесні 2022 року в усьому світі було інфіковано понад 498 мільйонів людей, і, на жаль, майже 6.2 мільйона людей померли. Три нових коронавіруси з'явилися як збудники інфекційних захворювань людини протягом останніх двадцяти років. Як свідчить поява SARS-CoV-2 і SARS-CoV, коронавіруси групи 2b залишатимуться загрозою здоров'ю людей і в майбутньому. Сімейство SARS-подібних CoV від кажанів є зоонозними вірусами, здатними розмножуватись в клітинах дихальних шляхів людини, розпізнаючи рецептори ангіотензин-перетворюючого ферменту 2 (ACE2), і демонструють варіації в послідовності генів вакцини, а також терапевтичні цілі. Тому, щоб подолати нинішню глобальну надзвичайну ситуацію в галузі охорони здоров'я і підвищити готовність до майбутніх пандемій, потрібна розробка ліків і вакцин, які є більш ефективними проти РНК-вірусів високого ризику.

Противірусні низькомолекулярні агенти можуть діяти кількома шляхами, наприклад, впливати на процес реплікації вірусу, пригнічувати виробництво нових вірусних частинок, інгібувати кодований вірусом фермент або блокувати проникнення вірусу в клітини хазяїна. Зараз багато противірусних

препаратів оцінюються в ході клінічних випробувань на людях для лікування COVID-19, включаючи препарати, активними агентами яких є молнупіравір та тілорон, які ми будемо розглядати в цій роботі.

Ключові слова: SARS-CoV-2, противірусні препарати, тілорон, молнупіравір

ABSTRACT

Briukhovetska Y. O. – Computer modeling of interactions of tilorone and molnupiravir with model membranes and receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein. – Manuscript.

Masters thesis in speciality 105 "Applied Physics and Nanomaterials" – V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2022.

53 pages, 22 pictures, 9 tables, 40 sources.

The COVID-19 pandemic, which is caused by severe acute respiratory syndrome, coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the new coronavirus (CoV), has become a serious threat to public health. At the time of writing this thesis in the spring of 2022, more than 498 million people have been infected worldwide, and unfortunately nearly 6.2 million people have died. Three new coronaviruses have emerged as causative agents of human infectious diseases over the past twenty years. As evidenced by the emergence of SARS-CoV-2 and SARS-CoV, group 2b coronaviruses will remain a threat to human health in the future. The SARS-like CoV family of bats are zoonotic viruses that can grow in human airway cells, recognizing the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptors, and exhibit variations in the vaccine gene sequence as well as therapeutic targets. Therefore, in order to overcome the current global health emergency COVID-19 and increase preparedness for future pandemics, it is necessary to open medicines and vaccines that are more effective against high-risk RNA viruses.

Low-molecule antiviral drugs can act in several ways, such as interfering with host factor associated with replication, inhibiting the production of new viral particles, suppressing a virus-coded enzyme, or blocking the virus from entering host cells. Now many antiviral drugs are evaluated in human clinical trials to treat COVID-19, including drugs containing such active agents as molnupiravir or tilorone, which are considered in this thesis.

Key words: SARS-CoV-2, antiviral drugs, molnupiravir, tilorone

ЗМІСТ

ВСТУП.....	
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	
1.1 Тілорон	
1.1.1 Індукція інтерферону.....	
1.1.2 Протівірусна активність	
1.1.3 Імунотропна активність.....	
1.1.4 Протипухлинна активність	
1.1.5 Протизапальна активність.....	
1.1.6 Ефективність	
1.2. Молнупіравір.....	
1.2.1 Метаболізм молнупіравіру	
1.2.2 Протівірусна активність	
1.2.3 Резистентність.....	
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	
2.1. Параметризація лікарських препаратів та розрахунок їх взаємодії з модельними мембранами методом молекулярної динаміки	
2.1.1. Підготування вхідних файлів ліганду	
2.1.2. Створення системи мембрана – ліганд.....	
2.1.3. Етапи молекулярно-динамічного розрахунку.....	
2.2. Метод молекулярного докінгу	
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	
3.1. Комплекси лікарських препаратів з рецептор-зв’язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2, отримані за допомогою молекулярного докінгу	
3.1.1 Молекулярний докінг в програмах PatchDock та FireDock.....	

3.1.2 Молекулярний докінг у SwissDock.....	
3.2. Дослідження взаємодії тілорону та молнупіравіру з модельними мембранами методом молекулярної динаміки	
ВИСНОВКИ	
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

RBD	рецептор-зв'язуючий домен спайк-білка SARS-CoV-2
ACE2	ангіотензин-перетворювальний ензим 2
PLIP	сервер, для аналізу результатів докінгу (Protein-Ligand Interaction Profiler)
МД	молекулярна динаміка

ВСТУП

На момент написання роботи ми знаходимось у розпалі глобальної кризи в галузі охорони здоров'я, спричиненої новим вірусом, що виник у китайському місті Ухань наприкінці 2019 р., та який вже створив значні економічні та соціальні труднощі. Новий коронавірус, який називається важким гострим респіраторним коронавірусом 2 (SARS-CoV-2), поділяє аспекти патології та патогенезу з тісно пов'язаною SARS-CoV та коронавірусом на Близькосхідному респіраторному синдромі (MERS-CoV), які також належать до сім'ї бетакоронавірусу. Ці віруси викликають дуже патогенну респіраторну інфекцію, що може призвести до значної захворюваності, смертності та широкого спектру клінічних проявів, пов'язаних із SARS-CoV-2, який спільно називається «коронавірусна хвороба» (COVID-19). Інфекція SARS-CoV-2 може спричинити кашель, втрату нюху та смаку, респіраторний дистрес, пневмонію та позалегеневі події, що характеризуються сепсисоподібною хворобою, що потребує госпіталізації, і може призвести до смерті. Подібно до SARS-CoV, SARS-CoV-2 безпосередньо взаємодіє з рецептором ангіотензинперетворюючого ферменту 2 (ACE2) у типах клітин-господарів.

Дійсно, SARS-CoV-2 швидко поширився по всьому світу, що спонукало Всесвітню організацію охорони здоров'я оголосити спалах пандемією, більш ніж 1,5 млн випадків захворювання було підтверджено менш ніж за 100 днів. На момент написання цієї статті понад 498 мільйонів. Спалахи епідемічних та пандемічних захворювань останнім часом посилилися, і це вимагатиме розробки різних терапевтичних втручань.

У всьому світі було зроблено багато зусиль щодо скринінгу та ідентифікації ліків від SARS CoV-2, і наразі проводяться клінічні випробування з використанням існуючих препаратів, які перепрофілюються.

З огляду на актуальність дослідження мета роботи полягала у з'ясуванні механізмів взаємодії тілорону та молнупіравіру з такими компонентами вірусу як рецептор-зв'язуючий домен спайк-білка SARS-CoV-2 та модельною мембраною, а також рецептором ангіотензин-перетворювальним ензимом 2 методами комп'ютерного моделювання. Для досягнення даної мети були поставлені та вирішені наступні завдання:

- Створення моделей молекул лікарських препаратів в програмі MarvinSketch, оптимізація їх структури та редагування зарядів за допомогою програм Avogadro та R.E.D. Server, відповідно;
- Параметризація лігандів (тілорону та молнупіравіру) в модулі Ligand Reader & Modeler графічного інтерфейсу CHARMM-GUI;
- Створення системи ліганд-бішар в модулі Membrane Builder на сервері CHARMM-GUI;
- Проведення етапів мінімізації та врівноваження в програмному пакеті GROMACS, розрахунок 100 нс молекулярно-динамічних траєкторій;
- Проведення розрахунків молекулярного докінгу за допомогою алгоритмів PatchDock та FireDock, а також в SwissDock для визначення мод зв'язування лікарських препаратів з рецептор-зв'язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2 та ангіотензин-перетворювальним ензимом 2;
- Аналіз результатів молекулярного докінгу в програмах VMD, UCSF Chimera та Protein-Ligand Interaction Profiler.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Кандидати для комп'ютерного моделювання взаємодії з модельними мембранами та рецептор-зв'язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2

Пошук ліків від SARS-CoV-2 важлива справа сьогодення, адже тисячі людей інфікуються щодня. В цій роботі розглянемо 2 кандидати які можуть бути використані для лікування хворих на SARS-CoV-2 [2]. На мою думку тилорон та монуплавір є найбільш підходящими препаратами, адже вони вже використовуються як противірусні лікарські засоби [1].

1.1 Тилорон

Тилорон-синтетичне низкомолекулярное з'єднання, що володіє противірусними властивостями і здатністю індукувати інтерферон при пероральному введенні. Також є повідомлення про його протипухлинних та протизапальних властивості [1]. В лікарських формах використовується у вигляді дигідрохлориду.

Використовується в Україні в якості противірусного і імуномодуючої лікарського препарату.

Хімічна сполука: ПЮПАК 2,7-біс (2 діетиламіноетокси) флуорен-9-он

Брутто- формула: C₂₅H₃₄N₂O₃

Молекулярна маса : 410,54906 г / моль

Фармакологічна група: імуномодулятори, противірусні засоби

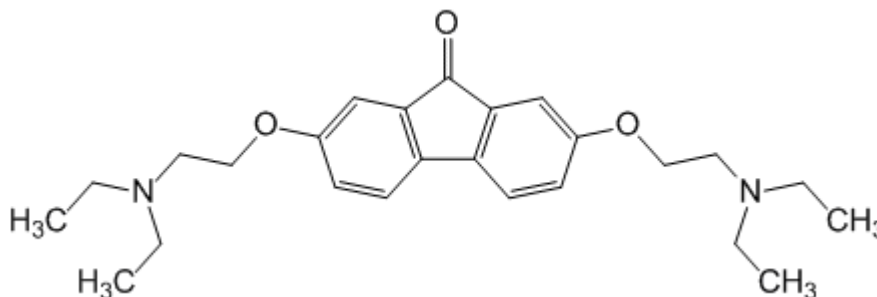


Рис.1.1 Хімічна сполука тилорону

Перша згадка про 2,7-біс- [2 - (діетиламіно) етокси] флуоренонов-9 зустрічається в заявці на патент США № 788,038 від 30 грудня 1968 року (патент США № 3592819), де описується отримання (в числі інших з'єднань, що згодом отримали загальну назву «Аналоги тілорону» - Tilorone Analogs) і противірусні властивості цієї речовини [3]. Першими ж публікаціями в науковому журналі стали статті Gerald D. Mayer і Russell F. Krueger в журналі Science - одному з найбільш авторитетних наукових видань (імпакт-фактор для 1981 р перевищує 138). Перші випробування безпеки і індукції інтерферону на людях датуються 1971 р. У 1973 в журналі Антибіотики була опублікована стаття Зінаїди Віссаріонівни Ермольєвой зі співавторами, присвячена Інтерфероногенним властивостями тілорону. Ця стаття викликала цікавість до тілорону у радянських вчених. У 1975 р в Фізико-хімічному інституті АН УРСР (Одеса) Литвинова Л. А. з співробітниками вперше в СРСР синтезувала тілорон.

1.1.1 Індукція інтерферону

Тілорон є першим з описаних пероральних ефективним низькомолекулярним індуктором інтерферону. Щодо індукції інтерферону у людей є суперечливі відомості. Так, в ряді оглядових робіт згадується, що тілорон НЕ індукує інтерферон у приматів, в тому числі і людей [4]. З іншого боку, було показано, що тілорон призводить до помітного і достовірного збільшення титрів інтерферону, проте у осіб з низькими фоновими його значеннями [5]. Можливо, відмінність результатів, отриманих в різних країнах в різний час, пояснюється різницею застосовуваних дозувань. Тілорону, як і іншим індукторам інтерферону, властиво явище гіпореактивності - зниження рівня синтезу інтерферону у відповідь на повторне введення індуктора через короткий інтервал часу. Гіпореактивність долається введенням простагландинів, зокрема E2.

Противірусна активність тілорону не завжди корелює зі стимуляцією вироблення інтерферону. При пероральному введенні мишам в дозах 50 і 125 мг / кг тілорон забезпечує 80-90-відсотковий захист тварин від 10-100 LD₅₀ вірусу лихоманки Ріфт-Валлі при 100% смертності тварин у контролі; титри індукціруемого інтерферону при цьому досягають 640. При внутрішньом'язовому введенні виживаність тварин становить всього 20%, а титри інтерферону мало відрізняються від контролю (кореляція рівня індукції і противірусної дії). У ліпосомальній же формі при пероральному введенні і титри інтерферону і ступінь противірусного захисту низькі. Внутрішньом'язове введення ліпосомальної форми тілорону забезпечує високий рівень захисту (90%) при низьких (до 20) титрах інтерферону, причому гостра токсичність препарату знижується практично в 3 рази. Ці закономірності в індукції інтерферону і рівнях противірусного захисту вказують на наявність декількох незв'язаних між собою механізмів реалізації противірусної дії.

1.1.2 Противірусна активність

Противірусна активність тілорону *in vitro* (в культурі клітин) вивчалася мало. Причина полягає, ймовірно, в тому, що в 70-і роки (тобто саме тоді, коли тілорон вивчався найбільш детально і інтенсивно) цей вид тестування не придбав ще такого значення і поширення, як в наступні десятиліття. Коли ж ці тести увійшли в практику експериментальної вірусології як обов'язкові, були вже детальні результати досліджень на тваринах, що значно знижувало ентузіазм в тестуванні препарату на клітинах.

1.1.3 Імунотропна активність

Тілорон пригнічує клітинний імунітет і стимулює гуморальний. Застосування тілорону призводить до вичерпання запасу лімфоцитів в селезінці щурів, і, як реакція на це - подальша проліферація В-лімфоцитів, до

тих пір, поки кількість лімфоцитів що не відновиться. Таким чином, тілорон призводить до зміщення рівноваги між Т- і В-лімфоцитами. Це може бути використано в підтримуючій терапії при трансплантації.

1.1.4 Протипухлинна активність

Тілорон (30 - 60 мг / кг, ір, щодня, оптимальна доза (оптим.) - 30 мг / кг) в 8 разів збільшував середню тривалість життя тварин (СПР) з прищепленої асцитної карциносаркомою 256 (ascitic Walker 256 carcinosarcoma), при тому, що рифампіцин (10 - 100 мг/кг, оптим. 100 мг/кг) і polyI-polyC (індуктор інтерферону , 5 - 20 мг/кг, оптим. 10 мг/кг) забезпечували лише 2.25 і 2-кратне збільшення СПЖ, відповідно.

1.1.5 Протизапальна активність

Тілорон має протизапальну активність , по мабуть, не пов'язаної зі стимуляцією вироблення інтерферону. Протизапальна активність тілорону може бути опосередкована холинергическим протизапальну каскадом (ГПК) , оскільки показано , що тілорон є виборчим частковим агоністом $\alpha 7$ нікотинових ацетилхолінових рецепторів .Як індуктор ГПК тілорон здатний пригнічувати синтез прозапальних цитокінів , що грають визначальну роль у розвитку пневмонії (внаслідок некрозу, масового пошкодження альвеол і геморагії) у осіб інфікованих свинячим грипом (H1N1).

1.1.6 Ефективність

В експериментах на тваринах, введення тілорону викликає збільшення вироблення клітинами організму інтерферонів - білків, що грають важливу роль у формуванні противірусного і протипухлинного імунітету, що визначило головний спектр терапевтичної активності препарату.

Однак доза тілорону, при якій у щурів спостерігалось збільшення продукції інтерферону, становила не менше 150 мг / кг ваги в день.

Еквівалентна ефективна доза для людини, в такому випадку, може скласти близько 1,7 грам в день, що приблизно в 10-30 разів більша за ту, яка рекомендується виробником [1].

Згідно з висновком російських вчених, які займалися вивченням клінічної ефективності застосування аміксину для профілактики і лікування грипу та інших ГРВІ, аміксин рекомендується для впровадження в медичну практику при плануванні і реалізації профілактичних програм проти грипу та інших ГРВІ.

1.2. Молнупіравір

Молнупіравір є противірусним препаратом, активним при пероральному прийомі. Пригнічує реплікацію деяких РНК-вірусів. Він використовується для лікування COVID-19 у осіб, інфікованих SARS-CoV-2. Цей продрук на основі синтетичного нуклеозидного похідного N4-гідроксицитидину (також відомий як EIDD-1931) надає свій противірусний ефект, вводячи помилки копіювання під час реплікації вірусної РНК [6].

Препарат був розроблений для лікування грипу в Університеті Еморі університетською фармацевтичною компанією Drug Innovation Ventures в Еморі (DRIVE). Потім він був придбаний компанією Ridgeback Biotherapeutics з Майамі, яка пізніше уклала угоду з Merck & Co. для подальшої розробки препарату [7].

Брутто- формула: $C_{13}H_{19}N_3O_7$

Молекулярна маса : 329.31 г / моль

Фармакологічна група: імуномодулятори, противірусні засоби

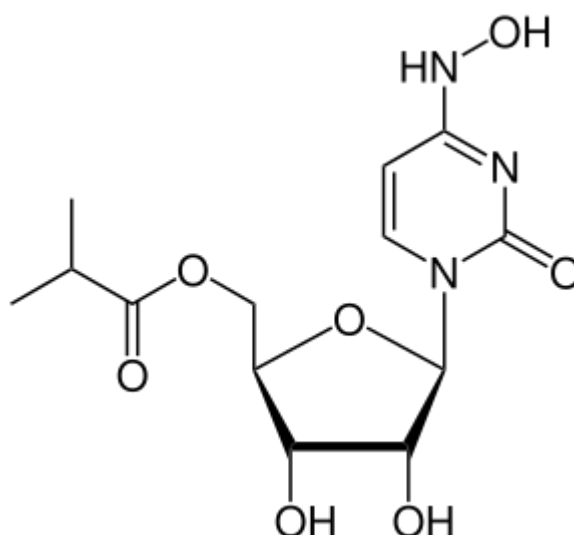


Рис.1.2 Молнупіравір

1.2.1 Метаболізм молнупіравіру

Молнупіравір є пероральним проліком N6-гідроксицитидину, який планували проти грипу в 2019 році. З появою SARS-CoV-2 молнупіравір продемонстрував сильну анти-SARS-CoV-2 активність (на тваринних моделях та *in vitro*) Серед нуклеозидів та аналогових нуклеотидів з широким спектром противірусної активності відомі потужні та вибіркові противірусні інгібітори коронавірусів, що містять SARS-CoV-2, деякі з яких швидко просунулися у клінічних випробуваннях для лікування COVID-19 [8].

На відміну від інших ліків від COVID-19 з дозволом на екстрене використання (EUA), молнупіравір можна виробляти у більших масштабах. Для введення цього препарату не потрібні стаціонарні умови та холодне транспортування. Докази показали, що молнупіравір краще переноситься і безпечніше в клінічних дослідженнях фази 1, 2 і 3, принаймні в короткостроковому періоді, без будь-яких значущих побічних ефектів

Механізм дії NHC-TP працює через механізм, відомий як "катастрофа помилок" під час процесу реплікації вірусу. Вбудовування NHC-TP у вірусну РНК з використанням ферменту РНК-полімерази призводить до накопичення помилок в геномі вірусу, що призводить до придушення реплікації.

1.2.2 Противірусна активність

NHC в експерименті клітинної культури показав активність проти SARS-CoV-2 з ефективною концентрацією 50% (EC50) в діапазоні від 0,67 до 2,66 мкмоля в клітинах A-549 і від 0,32 до 2,03 мкмоля в клітинах Vero E6. NHC мала аналогічну активність проти варіантів SARS-CoV-2 B.1.1.7 (альфа), B.1.351 (бета), P.1 (гамма) та B.1.617.2 (дельта) зі значеннями EC50 1,59; 1,77; 1,32 і 1,68 мкмоля відповідно.

Коли NHC тестували в поєднанні з іншими противірусними препаратами (абакавір, емтрицитабін, гідроксихлорохін, ламівудин,

нелфінавір, ремдесбір, рибавір, софосбувір, тенофовір), ніякого впливу на протівірусну активність NHC проти SARS-CoV-2 *in vitro* не спостерігалось.

Результати клінічних досліджень показали, що застосування молнупіравіру на 6-7-й день терапії призводить до виведення вірусу з організму [9].

1.2.3 Резистентність

Клінічні дослідження молнупіравіру при лікуванні COVID-19 не виявили заміщення амінокислот у структурі SARS-CoV-2, які були пов'язані зі стійкістю NHC. Дослідження, що вивчають вибір мутацій опору NHC при SARS-CoV-2 в клітинній культурі, не були завершені. Було показано дослідження *in vitro* з відбору мутацій резистентності до SARS-CoV-2 з іншими коронавірусами (вірусом гепатиту миші та MERS-CoV), низька ймовірність розвитку резистентності до NHC [10]. Після 30 проходів в клітинній культурі спостерігалось лише 2-кратне зниження сприйнятливості, і не було виявлено замін амінокислот, які були пов'язані зі стійкістю NHC. NHC залишався активним у дослідженнях *in vitro* для SARS-CoV-2 та рекомбінантного вірусу гепатиту миші з замінами полімеразних методів полімераз (наприклад, F480L, V557L та E802D), пов'язаних зі зниженою чутливістю до ремдесівіру, що вказує на відсутність перехресної резистентності [11].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Параметризація лікарських препаратів та розрахунок їх взаємодії з модельними мембранами методом молекулярної динаміки

2.1.1. Підготування вхідних файлів ліганду

Хімічні структури тілорону та молнупіравіру (Рис. 2.1) були побудовані та первісно оптимізовані в програмі MarvinSketch (версія 18.10.0) [13]. Подальшу оптимізацію структур проводили в програмі Avogadro (версія 1.1.0) [14].

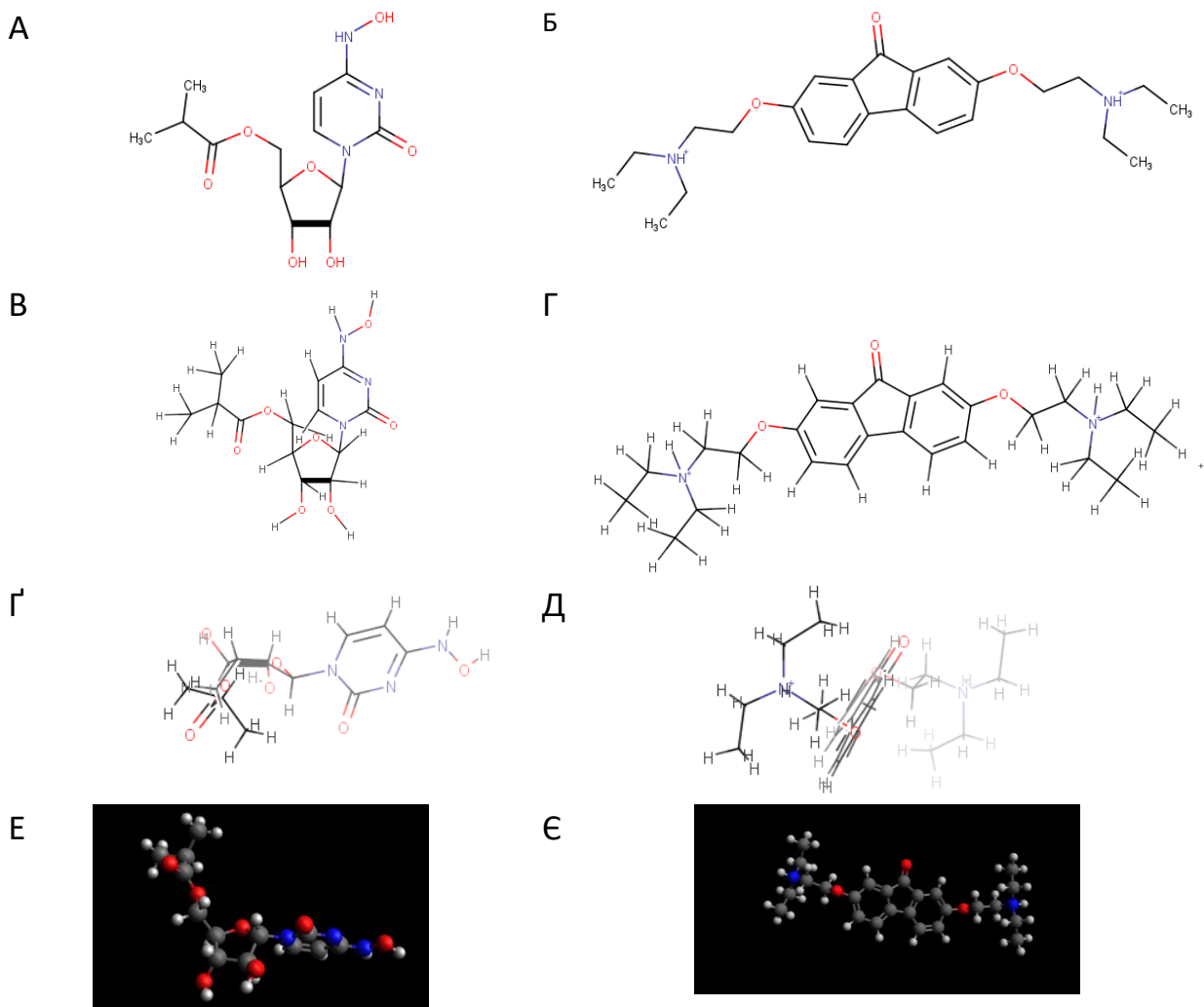


Рис. 2.1 Побудова молнупіравіру (А) та тілорону (Б) в програмі MarvinSketch. Структури після відображення всіх атомів водню (В, Г) та оптимізації їх 3D

структур (Г, Д). Вигляд препаратів після оптимізації в Avogadro (Е, Є)

Після оптимізації структур були уточнені заряди на атомах за допомогою онлайн серверу R.E.D. Server (<http://upjv.q4md-forcefieldtools.org/REDServer-Development/>) [15], що рахує їх за допомогою квантово-механічної програми Gaussian (Рис. 2.2). Тип зарядів був обраний ESP-C1, що відповідає силовому полю CHARMM.

R.E.D. Server Development: Input submission - Google Chrome

upjv.q4md-forcefieldtools.org/REDServer-Development/upload1.php

REDs

SUBMISSION OF DATA 3/5

I/ General information

Project name

II/ Force field generation by using the PyRED program

The number of molecules involved in a PyRED job is defined in the [archive](#) file.

The [charge model](#) determining the charge derivation procedure executed by PyRED is defined in the [System.config](#) file.

The [force field set](#) used in force field parameter generation carried out by PyRED is defined in the [System.config](#) file.

Quantum mechanics program interfaced by PyRED

Gaussian is available, when using a private account and if one has certified being an academic user.

Université de Picardie Jules Verne, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute.
© 2009-2022. All rights reserved.

W3C XHTML 1.0 W3C CSS

Рис. 2.2 Загальний вигляд онлайн серверу для розрахунку зарядів. Вибір квантово-механічної програми.

Для того, щоб створити систему мембрана – лікарський препарат, необхідно параметризувати ліганд, тобто згенерувати необхідні файли топології. Для цього було використано модуль Ligand Reader & Modeler (Рис. 2.3) графічного інтерфейсу CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/?doc=input/ligandrm>) [16].

А

Б

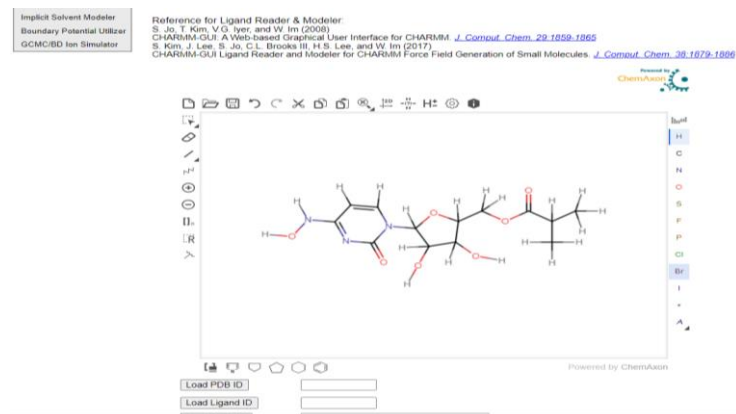


Рис. 2.3 Завантаження молекули молнупіравіру в Ligand Reader & Modeler (А) та вихідне відображення ліганду (Б).

2.1.2. Створення системи мембрана – ліганд

Після того, як були підготовлені файли топології лікарських препаратів, моделювались системи бішар–лікарський препарат за допомогою модуля Membrane Builder (<http://www.charmm-gui.org/?doc=input/membrane.bilayer>) графічного інтерфейсу CHARMM-GUI.

На першому кроці утворення системи обирається взаємне розташування ліганду відносно площин бішару (Рис. 2.4). Обидва лікарські препарати орієнтували перпендикулярно до бішару (вздовж осі Z), відстань між центрами мас бішару та ліганду була обрана 30 Å для тілорону (препарат знаходиться поза межами бішару) та 15 Å для молнупіравіру (ліганд частково занурений в полярну область бішару).

Б

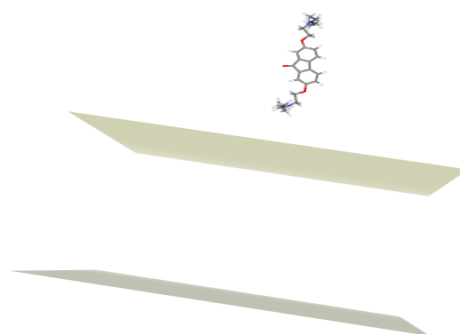


Рис. 2.4 Розташування молнупіравіру (А) та тілорону (Б) відносно бішару. Сірою площиною позначена межа розподілу між полярною та неполярною областю ліпідного шару.

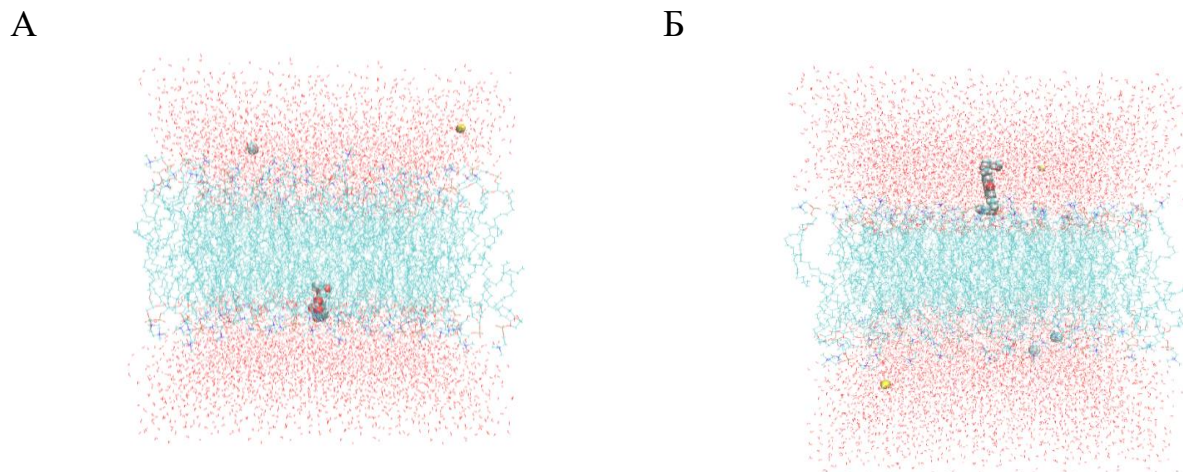


Рис. 2.5 Системи молнупіравір-бішар (А) та тілорон-бішар (Б), підготовані для молекулярно-динамічного моделювання за допомогою серверу CHARMM-GUI. Ліганди та іони побудовані ван-дер-ваальсовими радіусами, бішар – блакитними лініями, червоним позначено молекули води.

На наступному кроці обираються лінійні розміри (80 Å) та склад модельної мембрани. У роботі досліджувались бішари утворені виключно з 1-пальмітоїл-2-олеоїл-sn-гліцеро-3-фосфохоліну 16:0–18:1 (ФХ), що найбільш близько відтворює вміст жирних кислот в яєчному фосфатидилхоліні. За таких умов верхній та нижній ліпідні шари містили по 94 молекули ліпиду. В системи було також додано 0.01 М NaCl, щоб нейтралізувати можливий заряд, але оскільки мембрана з фосфатидилхоліну та ліганди (молнупіравір та тілорон в протонуваних формі) незаряджені, то в систему було поміщена парна кількість позитивних та негативних іонів. CHARMM-GUI також дозволяє вибрати температуру, при якій буде проводитись моделювання (310 К) та тип ансамблю (NTP). На Рис. 2.5 продемонстровано отримані системи.

2.1.3. Етапи молекулярно-динамічного розрахунку

Молекулярно-динамічне моделювання проводилось в програмному пакеті GROMACS 5.1 [17] та силовому полі CHARMM36 [18] з кроком симуляції в 2 фс.

```

user@supergena: /media/user/DATA/Uliana/BA_parametrization_2021/AM16_POPC - + x
Reading file step6.1_equilibration.tpr, VERSION 2020.2 (single precision)
Changing nstlist from 20 to 100, rlist from 1.2 to 1.26

1 GPU selected for this run.
Mapping of GPU IDs to the 2 GPU tasks in the 1 rank on this node:
  PP:0,PME:0
PP tasks will do (non-perturbed) short-ranged interactions on the GPU
PP task will update and constrain coordinates on the CPU
PME tasks will do all aspects on the GPU
Using 1 MPI thread
Using 8 OpenMP threads

starting mdrun 'Title'
125000 steps, 125.0 ps.
step 2700: timed with pme grid 72 72 80, coulomb cutoff 1.200: 742.8 M-cycles
step 2900: timed with pme grid 64 64 72, coulomb cutoff 1.307: 818.2 M-cycles
step 3100: timed with pme grid 56 56 64, coulomb cutoff 1.470: 923.4 M-cycles
step 3300: timed with pme grid 56 56 72, coulomb cutoff 1.430: 936.2 M-cycles
step 3500: timed with pme grid 60 60 72, coulomb cutoff 1.335: 849.0 M-cycles
step 3700: timed with pme grid 64 64 72, coulomb cutoff 1.307: 867.1 M-cycles
step 3900: timed with pme grid 64 64 80, coulomb cutoff 1.251: 743.8 M-cycles
step 4100: timed with pme grid 72 72 80, coulomb cutoff 1.200: 753.3 M-cycles
          optimal pme grid 72 72 80, coulomb cutoff 1.200
step 7800, remaining wall clock time: 283 s

```

Рис. 2.6 Вікно терміналу при першому кроці еквілібрації системи.

Термостат Берендсена був використаний для контролю температури та тиску [19]. На першому етапі відбувалась мінімізація системи в 50000 кроків, в той час як врівноваження системи проходило в 6 етапів (Рис. 2.6), загальною тривалістю 12500000 кроків. Після успішного завершення підготовчих кроків був здійснений розрахунок траєкторій атомів системи (власне, молекулярно-динамічне моделювання) тривалістю в 100 нс. Для визначення ступеню розподілу щільності маси різних компонентів ліпідного бішару та лігандів було використано команду `gmx density`, тоді як для аналізу товщини мембрани та площі на ліпід застосовувався програмний пакет FATSLiM [20]. Візуалізація часових траєкторій була проведена в програмі VMD (Visual Molecular Dynamics) [21].

2.2. Метод молекулярного докінгу

Структури тілорону та молнупіравіру були побудовані та оптимізовані як описано раніше. Для моделювання взаємодії лікарських препаратів з рецептор-зв'язуючим доменом (RBD) спайк-білка SARS-CoV-2 був обраний комплекс RBD (частина вірусу) з ангіотензин-перетворювальним ензимом 2 (скорочено ACE2, білок мембрани інфікованої клітини). PDB код обраної макромолекули – 6M0J.

А

Б

Рис. 2.7 Кристалічна структура комплексу RBD+ACE2 (PDB ID: 6M0J), візуалізована відразу після завантаження з Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) (А) та після збереження координат виключно білка (Б). Зеленим кольором позначено RBD, тоді як ангіотензин-перетворювальний ензим 2 – синім, червоним та ціановим – додаткові ліганди та молекули води

Оскільки кристалічна структура під даним кодом містила додаткові ліганди та іони, то за допомогою програми VMD було збережено виключно білок, а саме комплекс RBD+ACE2 (Рис. 2.7).

The screenshot displays the SwissDock web interface. At the top, there are navigation tabs: Home, Target Database, Submit Docking, Command Line Access, Help Forum, and Contact. A message at the top left states: "You might be unable to find PDB native structures but only S3DB prepared structures, via a search by PDB ID or protein name. We are working to fix this issue. In the meantime, you can search protein structural files directly on the PDB web site, and upload the selected ones on SwissDock. We are sorry for the inconvenience." The main content area is divided into three sections: "Target selection", "Ligand selection", and "Description". In the "Target selection" section, a file "6m0j_protein.pdb" is selected, and a "Successful setup" message is displayed. In the "Ligand selection" section, a file "tilorone_wit...tCL_3D.mol2" is selected, and another "Successful setup" message is displayed. The "Description" section contains input fields for "Job name (required)" and "E-mail address (optional)". On the right side, there is a "Help" section titled "Upload a file" which provides information about the success rate and the supported file formats (MOL2, CHARMM, ZIP).

Рис. 2.8 Завантаження структур макромолекули та ліганду в SwissDock.

Молекулярний докінг проводився за допомогою двох програм: 1) серверу SwissDock (<http://www.swissdock.ch/docking>) [22], у якому реалізований алгоритм EADock dihedral space sampling [23] на основі силового поля CHARMM; 2) алгоритмів PatchDock та FireDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) [24]. SwissDock (Рис. 2.8), видає 256 моделей, що розбиті на кластери, залежно від сайту зв'язування ліганду, та дозволяє знаходити найбільш енергетично вигідні

комплекси. Зручний в користуванні сервер з алгоритмом PatchDock (Рис. 2.9), реалізований у припущенні, що макромолекула і ліганд взаємодіють як жорсткі структури, таким чином знаходячи максимальну комплементарність їх поверхонь. Далі проводиться уточнення 10 найбільш вигідних комплексів за допомогою алгоритму FireDock [25], що прораховує зміни положення амінокислотних залишків та ліганду в сайті зв'язування.



А

Б

Рис. 2.9 Завантаження докованих молекул в PatchDock (А) та таблиця з енергіями 10 найбільш енергетично вигідних комплексів після FireDock (Б).

Доковані комплекси були візуалізовані в програмі VMD та програмі UCSF Chimera 1.14, що дозволяє зручно та швидко аналізувати отримані моделі після SwissDock [26]. Найбільш енергетично вигідні комплекси були проаналізовані в Protein-Ligand Interaction Profiler (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>), з метою визначити характерні типи взаємодій лікарських препаратів з рецептор-зв'язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2 та ACE2 [27].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Комплекси лікарських препаратів з рецептор-зв'язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2, отримані за допомогою молекулярного докінгу

Ангіотензин-перетворювальний ензим (ACE) – це екзофермент, що знаходиться переважно в легенях [28]. ACE2 – інтегральний мембранний білок типу I, що складається із 805 амінокислотних залишків з одним іоном Zn^{2+} , що необхідний для активності ферменту [29]. ACE2 є мультифункціональним ферментом, що пов'язаний з регулюванням функції серця, проявляє захисні функції, такі як відгук на запалення та контролювання стабільності тіла [30, 31], а також привертає увагу як функціональний клітинний рецептор для коронавірусів, в тому числі і для нового коронавірусу SARSCoV-2, що викликав серйозну пандемію COVID-19 [32]. Відомо, що зв'язування 2019-nCoV з рецептором ACE2 людини відбувається через спайк-білок (spike, S) і є початковим кроком механізму проникнення до клітини людини [33]. Проникнення вірусу залежить від його зв'язування з клітинними поверхневими одиницями в сайті зв'язування 1 та сайті 2, що містять Zn^{2+} – важливий кофактор для багатьох вірусних білків [34].

Таблиця 3.1

Амінокислотні залишки, що утворюють сайти зв'язування комплексу
RBD+ACE2 (PDB ID: 6M0J). Джерело [29].

Сайт	Залишки
Сайт 1	(Tyr127, Asn149, Asp269, Trp271, Arg273, Phe274, Thr276, Tyr279, Lys288, Pro289, Asn290, Ile291, Asp292, Thr294, His345, Pro346, Thr365, Met366, Asp367, Leu370, Thr371, His374, Glu375, Glu402, Glu406, Ser409, Leu410, Ala413, Thr414, Pro415, Leu418, Phe428, Glu430, Asp431, Thr434, Glu435, Asn437, Phe438, Lys441, Gln442, Thr445, Ile446, Thr449, Leu503, Phe504, His505, Tyr515, Arg518, Thr519, Gln522, Phe523, His540)
Сайт 2	(His345, Pro346, Thr347, Ala348, Glu375, His378, Asp382, His401, Glu402)

Бокування активного сайту ACE2 відповідними фармацевтичними сполуками може перешкоджати прониканню вірусу до клітини людини, тому в даній роботі досліджували зв'язування тілорону та молнупіравіру з ангіотензин-перетворювальним ензимом 2 та рецептор-зв'язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2. Метод молекулярного докінгу відіграє ключову роль в розумінні мод зв'язування малих молекул з білком-мішенню [35, 36].

У роботі [29] для білка RBD+ACE2 під кодом 6M0J, було виділено два сайти, зв'язування в яких вказувало на ефективність досліджуваного препарату як інгібітору механізму проникнення вірусу в клітину людини. Амінокислотні залишки, що утворюють два даних сайти зв'язування наведені в таблиці 3.1 та позначені жовтим та червоним кольором на Рис. 3.1.

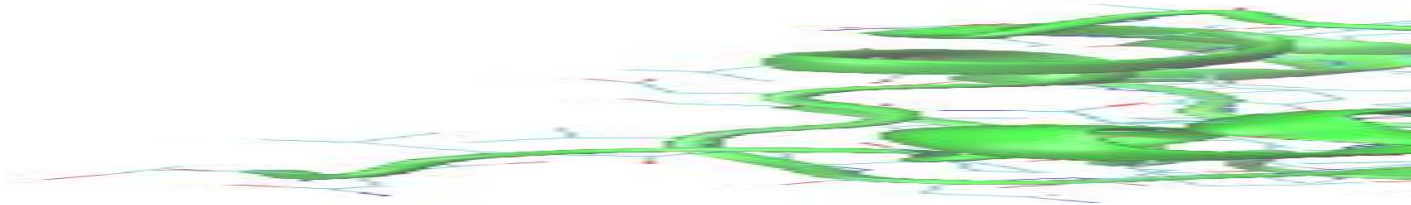
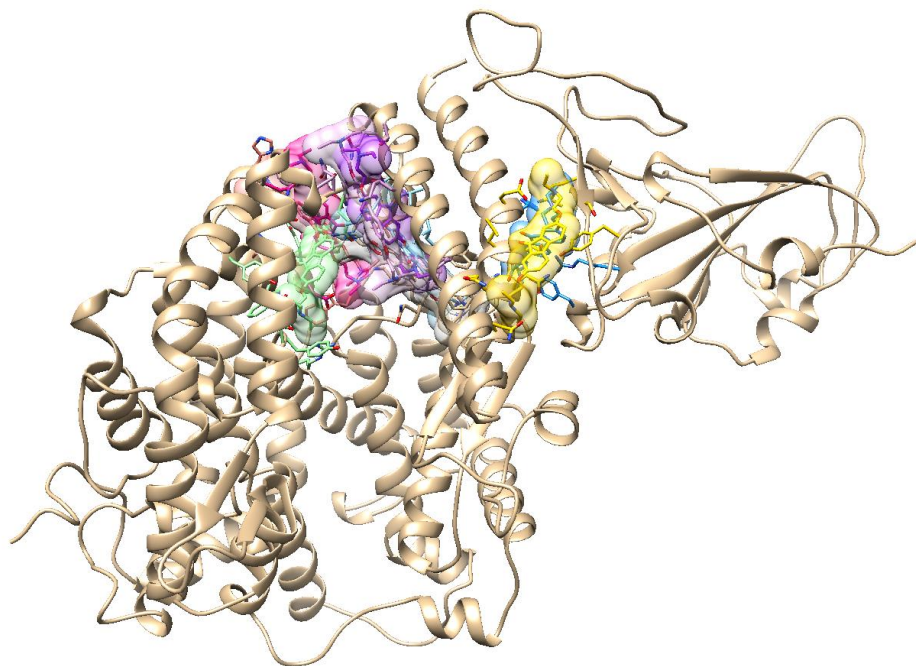


Рис. 3.1. Сайти зв'язування ангіотензин-перетворювального ензиму 2. Жовтим виділені залишки, що утворюють сайт зв'язування 1, червоним – сайт зв'язування 2, відповідно до класифікації наведеної в роботі [29]

3.1.1 Молекулярний докінг в програмах PatchDock та FireDock

На першому етапі роботи було досліджено зв'язування тілорону та молнупіравіру з комплексом RBD+ACE2 за допомогою програм PatchDock та FireDock.

А



Б

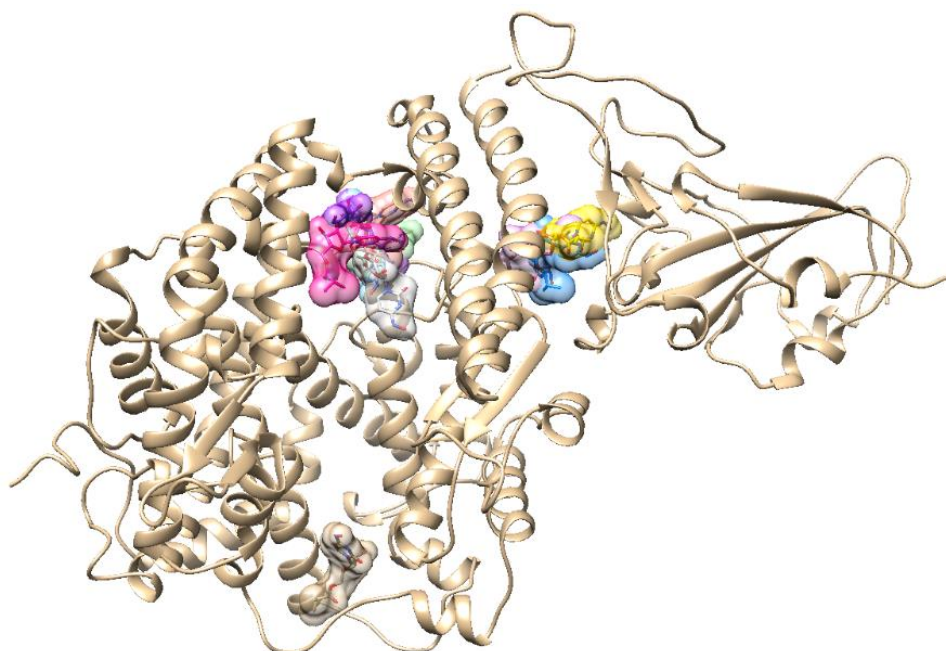


Рис. 3.2. 10 результатів з найменшою енергією зв'язування тілорону (А) та молнупіравіру (Б) з комплексом RBD+ACE2, отриманих після уточнення структури в FireDock. Візуалізовано в програмі UCSF Chimera

Як можна бачити з Рис. 3.2, обидва препарати зв'язуються переважно із ангіотензин-перетворювальним ензимом 2 та в області інтерфейсу між ACE2 та з рецептор-зв'язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2. Результати розрахунку енергії зв'язування препаратів з комплексом наведено в таблиці 3.2, де використано такі позначення:

№ – це номер моделі, відповідно до нумерування серверами PatchDock та FireDock;

glob – загальна енергія, тобто енергія зв'язування для даної моделі;

aVdW, rVdW – енергія слабких ван-дер-ваальсових взаємодій притягання та відштовхування, відповідно;

ACE – енергія контактів між атомами (atomic contact energy).

Таблиця 3.2.

Енергія та типи взаємодій тілорону та молнупіравіру з комплексом RBD+ACE2, отриманих після уточнення структури в FireDock

№	glob, ккал/моль	aVdW, ккал/моль	rVdW, ккал/моль	ACE, ккал/моль
Тілорон				
5	-50.32	-21.81	6.09	-14.84
4	-40.77	-22.7	5.81	-7.97
9	-40.14	-24.38	8.22	-8.65
3	-38.4	-22.66	11.61	-9.26
1	-32.62	-17.53	5.47	-7.18
2	-32.51	-16.59	2.38	-6.15
8	-26	-17.96	5.42	-4.2
10	-17.81	-18.76	29.9	-11.16
7	-12.89	-15.55	26.84	-8.29
Молнупіравір				
2	-43.27	-20.55	2.19	-9.77

Продовження таблиці 3.2

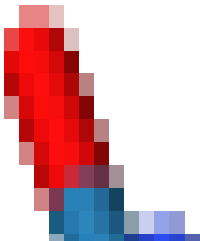
№	glob, ккал/моль	aVdW, ккал/моль	rVdW, ккал/моль	ACE, ккал/моль
6	-36.39	-17.35	2.77	-8.21
8	-35.45	-15.81	6.45	-10.78
7	-27.87	-18.23	12.99	-7.26
9	-26.47	-16.02	3.64	-4.87
10	-26.09	-15.48	4.12	-4.14
1	-25.17	-17.52	1.29	-0.2
4	-24.78	-18	2.18	-0.92
3	-24.12	-13.84	3.88	-4.43
5	-21.86	-17.16	4.53	-0.65

Загальна енергія взаємодіючих молекул, отримана за допомогою даних програм, пов'язана з вільною енергією зв'язування, що більш негативне її значення, то більша вірогідність зв'язування [35, 37].

Згідно з результатами, отриманими з серверу FireDock, вклад електростатичних, водневих та гідрофобних взаємодій в розраховану загальну енергію незначний, порівняно з енергією ван-дер-ваальсових взаємодій та ACE, тому в таблиці не приводиться. В роботі [30] досліджувались білок-білкові взаємодії між ACE2 та RBD за допомогою програми PatchDock, з подальшим уточненням в FireDock. Автори поділили отримані комплекси на 5 груп в залежності від загальної енергії: дуже слабкі комплекси (від -3.93 до -18.43 ккал/моль), слабкі (від -18.42 до -32.94 ккал/моль), середні (від -32.94 до -47.44 ккал/моль), сильні (від -47.44 до -61.95 ккал/моль) та дуже сильні (від -61.95 до -76.46 ккал/моль). За такої класифікації модель 5 для тілорону можна віднести до класу сильних комплексів, тоді як три його наступні моделі, а також перші три найбільш енергетично вигідні комплекси молнупіравіру належать до середньої групи.

A

Б



B

Г

Рис. 3.3. 3 моделі тілорону, зв'язаного з комплексом RBD+ACE2, з найменшою загальною енергією зв'язування, візуалізовані в програмі VMD (А). Червоним позначена модель з номером 5, жовтим – з номером 4, яскраво-рожевим – з номером 9. Взаємодія ліганда з амінокислотними залишками ангіотензин-перетворювального ензиму 2 після PLIP для моделі з загальною енергією - 50.32 ккал/моль (Б), -40.77 ккал/моль (В) та -40.14 ккал/моль (Г)

Слід зазначити, що, на перший погляд, обидва препарати зв'язуються із залишками ACE2, що були виділені в роботі [29] як сайт зв'язування 1 та сайт зв'язування 2. Таким чином дані препарати можуть блокувати проникнення проникнення вірусу до клітини хазяїна, проявляючи себе як інгібітори. Для більш детального аналізу та порівняння ефективності тілоронSARS-CoV-2у та молнупіравіру було обрано три найбільш енергетично вигідних комплекси для обох препаратів та проведено аналіз в Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP).

А

Б



B

Г

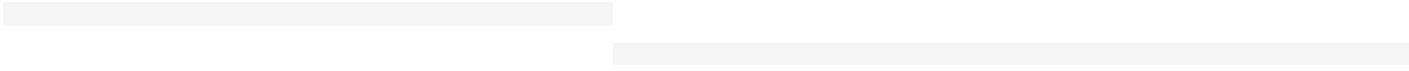


Рис. 3.4. 3 моделі молнупіравіру, зв'язаного з комплексом RBD+ACE2, з найменшою загальною енергією зв'язування, візуалізовані в програмі VMD (А). Червоним позначена модель з номером 2, жовтим – з номером 6, яскраво-рожевим – з номером 8. Взаємодія ліганда з амінокислотними залишками ангіотензин-перетворювального ензиму 2 та RBD після PLIP для моделі з загальною енергією -43.27 ккал/моль (Б), -36.39 ккал/моль (В) та -35.45 ккал/моль (Г)

Для тілорону – це комплекси під номерами 5, 4 та 9 (Рис.3.3), загальна енергія яких становила - 50.32, -40.77 та -40.14 ккал/моль, відповідно. Для молнупіравіру енергія вибраних комплексів (під номерами 2, 6, 8) становила -43.27, -36.39 та -35.45 ккал/моль (Рис. 3.4), відповідно, що на 14, 11 та 12 % менше, ніж для тілорону. В Таблиці 3.3 наведені амінокислотні залишки ангіотензин-перетворювального ензиму 2 та рецептор-зв'язуючого домену, що проявляли гідрофобні взаємодії з тілороном та молнупіравіром. В таблиці використовувались такі позначення:

Номер залишку – порядковий номер амінокислотного залишку білка;

АА – тип амінокислотного залишку;

Ланцюг – номер поліпептидного ланцюга, для досліджуваного білка.

Ланцюг А – це ангіотензин-перетворювальний ензим 2, ланцюг Е – рецептор-зв'язуючий домен спайк-білка SARS-CoV-2;

Відстань – відстань в Å між атомом амінокислотного залишку та атомом ліганду.

Таблиця 3.3.

Гідрофобні взаємодії між комплексом (RBD+ACE2) та препаратами, виявлені за допомогою програм FireDock та PLIP

Номер залишку	АА	Ланцюг	Відстань, Å
Тілорон			
Модель 5, загальна енергія -50.32 ккал/моль			
40	PHE	А	2.86

98	GLN	A	2.91
99	ALA	A	2.73
350	ASP	A	3.72
390	PHE	A	2.89
390	PHE	A	3.39
391	LEU	A	3.87
562	LYS	A	3.16
Модель 4, загальна енергія -40.77 ккал/моль			
98	GLN	A	2.95
350	ASP	A	2.83
390	PHE	A	3.82
391	LEU	A	3.7
393	ARG	A	3.77
394	ASN	A	3.33
Модель 9, загальна енергія -40.14 ккал/моль			
40	PHE	A	3.9

Продовження таблиці 3.3

Номер залишку	AA	Ланцюг	Відстань, Å
69	TRP	A	3.32
73	LEU	A	3.39
73	LEU	A	2.78
73	LEU	A	3.49
74	LYS	A	2.75
74	LYS	A	3.94
100	LEU	A	3.3
103	ASN	A	3.97
390	PHE	A	3.17
Молнупіравір			
Модель 2, загальна енергія -43.27 ккал/моль			
288	LYS	A	2.9
290	ASN	A	3.41
434	THR	A	2.94
437	ASN	A	3.34
438	PHE	A	3.61
441	LYS	A	3.14
Модель 6, загальна енергія -36.39 ккал/моль			
206	ASP	A	3.7
Модель 8, загальна енергія -35.45 ккал/моль			
37	GLU	A	3.51
387	ALA	A	3.48
505	TYR	E	3.2
505	TYR	E	3.27

З таблиці 3.3 можна бачити, що три найбільш енергетично вигідні моделі тілорону зв'язуються з ACE2 (амінокислотні залишки ланцюга А) та стабілізуються 8, 6 та 10 гідрофобними контактами, відповідно, тоді як молнупіравір має значно менше гідрофобних взаємодій (6, 1 та 4), і модель 8, що знаходиться на інтерфейсі двох білків, має контакти також і з рецептор-зв'язуючим доменом (ланцюг Е). Слід зазначити, що модель 2 молнупіравіру, незважаючи на нижчу енергію комплексу, ніж для тілорону, взаємодіє з амінокислотними залишками Thr434, Asn437, Phe438 та Lys441 ACE2, що відносяться до сайту зв'язування 1 [29]. З цієї точки зору, молнупіравір видається більш ефективним противірусним агентом, ніж тілорон.

Таблиця 3.4.

Водневі зв'язки між комплексом (RBD+ACE2) та препаратами, виявлені за допомогою програм FireDock та PLIP

Номер залишку	АА	Ланцюг	Відстань Н-А	Відстань D-А	Кут донору	Блок донор?	Бічний ланцюг
Тілорон							
Модель 5, загальна енергія -50.32 ккал/моль							
394	ASN	A	2.65	3.5	145.15	Так	Так
Модель 4, загальна енергія -40.77 ккал/моль							
394	ASN	A	2.87	3.53	125.42	Так	Так
562	LYS	A	2.46	3.1	120.33	Так	Так
Модель 9, загальна енергія -40.14 ккал/моль							
74	LYS	A	2.12	2.92	133.53	Так	Так
106	SER	A	2.94	3.66	131.86	Так	Так
Молнупіравір							
Модель 2, загальна енергія -43.27 ккал/моль							
291	ILE	A	3.02	3.95	158.59	Так	Ні
441	LYS	A	3.32	3.82	111.91	Так	Так
Модель 6, загальна енергія -36.39 ккал/моль							
196	TYR	A	2.13	2.92	140.55	Так	Так
196	TYR	A	1.96	2.92	168.48	Ні	Так
202	TYR	A	1.37	2.23	144.18	Ні	Ні
205	GLY	A	3.49	3.94	109.85	Так	Ні
206	ASP	A	2.69	3.36	125.36	Так	Ні
206	ASP	A	3.7	3.98	100.69	Так	Так
562	LYS	A	1.81	2.78	158.02	Так	Так

Модель 8, загальна енергія -35.45 ккал/моль							
33	ASN	A	2.27	3.12	144.84	Ні	Ні
37	GLU	A	3.08	3.44	105.09	Так	Так
353	LYS	A	2.69	3.5	136.19	Так	Так
353	LYS	A	2.6	3.5	150.66	Ні	Так
403	ARG	E	2.57	3.45	148.07	Так	Так
453	TYR	E	3.51	4.09	122.91	Так	Так
496	GLY	E	2.94	3.91	170.84	Так	Ні
505	TYR	E	3.65	4.05	108.87	Так	Так

В таблицях 3.4 та 3.5 наведені амінокислотні залишки ангіотензин-перетворювального ензиму 2 та рецептор-зв'язуючого домену, що утворюють водневі зв'язки та сольові містки з противірусними препаратами. Наявність таких типів взаємодій вказує на високу стабільність досліджуваних комплексів. Варто зазначити, що для моделі молнупіравіру з загальною енергією -43.27 ккал/моль виявлено водневі зв'язки із залишками Ile291 та Lys441 сайту 1 ангіотензин-перетворювального ензиму 2.

Таблиця 3.5.

Сольові містки між комплексом (RBD+ACE2) та препаратами, виявлені за допомогою програм FireDock та PLIP

Номер залишку	AA	Ланцюг	Відстань, Å	Блок позитивний?	Група ліганду
Тілорон					
Модель 5, загальна енергія -50.32 ккал/моль					
350	ASP	A	4.08	Ні	Tertamine
Модель 4, загальна енергія -40.77 ккал/моль					
350	ASP	A	2.66	Ні	Tertamine
Молнупіравір					
Модель 8, загальна енергія -35.45 ккал/моль					
393	ARG	A	4.79	Так	Carboxylate
403	ARG	E	5.38	Так	Carboxylate

3.1.2 Молекулярний докінг у SwissDock

А

Б

Рис. 3.5. 256 моделей зв'язування тилорону (А) та молнупіравіру (Б) з комплексом RBD+ACE2, отриманих за допомогою програми SwissDock. Ліганди позначені в синьо-біло-червоній гамі в залежності від індексу моделі.

Також для моделі номер 8 молнупіравіру було виявлено Рі-катионні взаємодії між ароматичною групою препарату та амінокислотним залишком Arg403 RBD, що знаходяться на відстані 4.4 Å.

Таблиця 3.6.

Вільна енергія зв'язування та вклади в неї різних типів взаємодій тилорону та молнупіравіру з комплексом RBD+ACE2, отриманих за допомогою серверу SwissDock

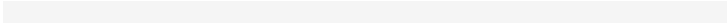
Номер моделі	Тилорон			Молнупіравір		
	№1.9	№1.25	№1.135	№1.1	№1.86	№1.59
ΔG , ккал/моль	-10.79457	-10.0474	-9.9598	-7.52015	-7.43935	-7.4094
ΔG_{elec} , ккал/моль	0	0	0	0	0	0
ΔG_{vdw} , ккал/моль	-124.313	-104.546	-110.143	-42.083	-40.2492	-41.4551
$\Delta G_{ligsolvnopol}$, ккал/моль	9.74011	9.71946	9.99797	8.53591	8.28185	8.46573
$\Delta G_{ligsolvpol}$, ккал/моль	-56.9458	-55.859	-55.6976	-19.6235	-16.1127	-17.5552
$\Delta G_{protsolvnopol}$, ккал/моль	530.054	530.054	530.054	530.054	530.054	530.054
$\Delta G_{protsolvpol}$, ккал/моль	-3919.29	-3919.29	-3919.29	-3919.29	-3919.29	-3919.29
$\Delta G_{compsolvnopol}$, ккал/моль	527.396	528.139	526.803	529.102	530.366	530.557
$\Delta G_{compsolvpol}$, ккал/моль	-3876.1	-3894.54	-3881.8	-3916.88	-3917.23	-3916.33
extraFull	0	0	0	0	0	0
surfFull	527.396	528.139	526.803	529.102	530.366	530.557
solvFull	-3876.1	-3894.54	-3881.8	-3916.88	-3917.23	-3916.33
IntraFull	98.212	100.706	103.127	45.4848	46.2643	44.6994
InterFull	-124.313	-104.546	-110.143	-42.083	-40.2492	-41.4551

FullFitness	- 3374.805 2	- 3370.241 2	- 3362.013 2	- 3384.37 6	- 3380.848 9	- 3382.528 8
SimpleFitness	18.7345	26.1691	29.897	19.1017	22.1799	19.1196
Energy	18.7345	26.1691	29.897	19.1017	22.1799	19.1196

Наступним кроком було дослідження взаємодії даних препаратів з рецептор-зв'язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2 та ангіотензин-перетворювальним ензимом 2 за допомогою серверу SwissDock. Слід зазначити, що, незважаючи на те, що основні базові підходи методу молекулярного докінгу, такі як подібність алгоритмів, характерні для всіх програм, однак технічні особливості змінюються в залежності від програми. З огляду на це, вибір двох серверів для молекулярного докінгу дозволяє проводити валідацію результатів моделювання та розуміти шаблон взаємодії досліджуваної молекули з білком-мішенню [38].

А

Б



B

Г

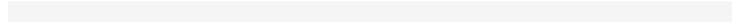


Рис. 3.6. 3 моделі тілорону, зв'язаного з комплексом RBD+ACE2, з найменшою вільною енергією зв'язування, візуалізовані в програмі VMD (А), після серверу SwissDock. Червоним позначена модель №1.9, жовтим – №1.25, яскраво-рожевим – №1.135. Взаємодія ліганда з амінокислотними залишками ангіотензин-перетворювального ензиму 2 після PLIP для моделі з $\Delta G = -10.79$ ккал/моль (Б), -10.05 ккал/моль (В) та -9.96 ккал/моль (Г)

На Рис. 3.5 наведено результати моделювання зв'язування тілорону та молнупіравіру з комплексом RBD+ACE2, отриманих за допомогою програми SwissDock. Як можна бачити з рисунку, тілорон переважно утворює комплекси з ангіотензин-перетворювальним ензимом 2, тоді як для молнупіравіру набагато більше моделей препарату, зв'язаного з рецептор-зв'язуючим доменом спайк-

А

Б

B

Г

Рис. 3.7. 3 моделі молнупіравіру, зв'язаного з комплексом RBD+ACE2, з найменшою загальною енергією зв'язування, візуалізовані в програмі VMD (А), після серверу SwissDock. Червоним позначена модель №1.1, жовтим – №1.86, яскраво-рожевим – №1.59. Взаємодія ліганда з амінокислотними залишками ангіотензин-перетворювального ензиму 2 та RBD після PLIP для моделі з $\Delta G = -7.52$ ккал/моль (Б), -7.44 ккал/моль (В) та -7.41 ккал/моль (Г)

білка SARS-CoV-2. За аналогією до результатів моделювання в PatchDock та FireDock, було виділено по три найбільш стабільних комплекси на кожен препарат. Вибір комплексів проводився з огляду на вільну енергію зв'язування (ΔG), результати занесені до таблиці 3.6.

На рисунках 3.6 та 3.7 наведені найбільш енергетично вигідні моделі зв'язування тілорону та молнупіравіру з комплексом RBD+ACE2, а також результати їх аналізу в Protein-Ligand Interaction Profiler.

Гідрофобні взаємодії, водневі зв'язки та сольові містки, які були виявлені за допомогою програми PLIP між препаратами та ланцюгами А та Е, комплексу білкових молекул наведені в таблицях 3.7, 3.8 та 3.9, відповідно.

Таблиця 3.7.

Гідрофобні взаємодії між комплексом (RBD+ACE2) та препаратами, виявлені за допомогою програм SwissDock та PLIP

Номер залишку	АА	Ланцюг	Відстань, Å
Тілорон			
Модель №1.9			
370	LEU	А	3.77
371	THR	А	3.65
413	ALA	А	3.68
Модель №1.25			
367	ASP	А	3.63
Молнупіравір			
Модель №1.1			
367	VAL	Е	3.83
Модель №1.59			

354	ASN	E	3.68
-----	-----	---	------

Як можна бачити з Рис. 3.6, три найбільш енергетично вигідні моделі тілорону демонструють зв'язування лікарського препарату з мембранним рецептором клітини (ACE2), тоді як для молнупіравіру (Рис. 3.7) характерно зв'язування переважно з RBD, що узгоджується з результатами молекулярного докінгу, отриманими за допомогою програм PatchDock та FireDock.

Вільна енергія зв'язування для трьох найкращих комплексів ACE2 з тілоронем знаходиться в межах від -10.79 до -9.96 ккал/моль, тоді як для моделей молнупіравіру з RBD з рецептором – від -7.52 до -7.41 ккал/моль (Табл. 3.6.). Таким чином, різниця в вільних енергіях $\sim 30\%$ вказує на значно вищу вірогідність утворення комплексів тілорону з ACE2, ніж вірогідність утворення комплексів молнупіравіру з рецептор-зв'язуючим доменом чи рецептором. Дана особливість зв'язування тілорону та молнупіравіру з комплексом RBD+ACE2 простежувалась також при моделюванні в PatchDock та FireDock.

Таблиця 3.8.

Водневі зв'язки між комплексом (RBD+ACE2) та препаратами, виявлені за допомогою програм SwissDock та PLIP

Номер залишку	АА	Ланцюг	Відстань Н-А	Відстань D-А	Кут донору	Блок донор?	Бічний ланцюг
Молнупіравір							
Модель №1.1							
336	CYS	E	3.07	3.69	121.47	True	True
338	PHE	E	3.14	4.03	148.76	True	True
339	GLY	E	2.35	3	122.17	True	True
364	ASP	E	2.56	3.49	155.03	True	True
Модель №1.86							
489	GLU	A	2.35	2.88	114.16	Так	Так
613	TYR	A	3.48	3.93	110.9	Так	Так
Модель №1.59							
340	GLU	E	3.25	3.95	129.51	Так	Ні
349	SER	E	3.16	4.04	148.06	Так	Так

Важливо зазначити, що для всіх трьох найбільш енергетично вигідних моделей тілорону з рецептором були виявлені гідрофобні зв'язки та/або сольові містки з амінокислотними залишками Leu370, Thr371, Ala413, Asp367, Glu375 та Asp269 ACE2, що входять до активного сайту ферменту та можуть перешкоджати проникненню вірусу в клітину [29]. Дане спостереження вказує на те, що, за результатами моделювання в SwissDock, тілорон може проявляти високу противірусну активність та може рекомендуватись для подальших експериментальних досліджень.

Вважається, що для успішного проведення молекулярного докінгу необхідною умовою є висока роздільна здатність білкової структури (між 1.5 та 2.5 Å), тоді як значення середньоквадратичного відхилення близько 2 Å та енергії менше чи рівно -7 ккал/моль – є критеріями для валідації результатів молекулярного докінгу [29]. Зв'язування молнупіравіру з RBD характеризується вільною енергією зв'язування менше -7 ккал/моль, що свідчить про високу стабільність комплексу. Наявність водневих зв'язків (Табл. 3.8) між молнупіравіром та RBD вказує на можливість сильної дестабілізації 3D-структури рецептор-зв'язуючого домену спайк-білка SARS-CoV-2 [35].

Таблиця 3.9.

Сольові містки між комплексом (RBD+ACE2) та препаратами, виявлені за допомогою програм SwissDock та PLIP

Номер залишку	АА	Ланцюг	Відстань, Å	Блок позитивний?	Група ліганду
Тілорон					
Модель №1.9					
375	GLU	A	5.39	Ні	Tertamine
Модель №1.25					
368	ASP	A	4.11	Ні	Tertamine
Модель №1.135					
269	ASP	A	5.1	Ні	Tertamine

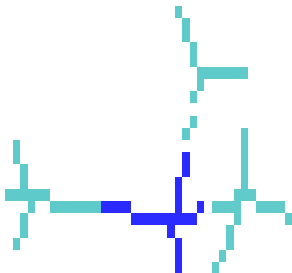
3.2. Дослідження взаємодії тілорону та молнупіравіру з модельними мембранами методом молекулярної динаміки

На другому етапі роботи було досліджено взаємодію лікарських препаратів з ліпідним бішаром методом молекулярної динаміки. Етапи життєвого циклу вірусу слугують потенційними мішенями для терапії препаратами. Більшість лікарських препаратів інгібують ключові компоненти життєвого циклу, такі як проникнення вірусу в клітину господаря, реплікацію вірусу та синтез РНК. Дані мішені знаходяться всередині клітини, тому дослідження проникнення

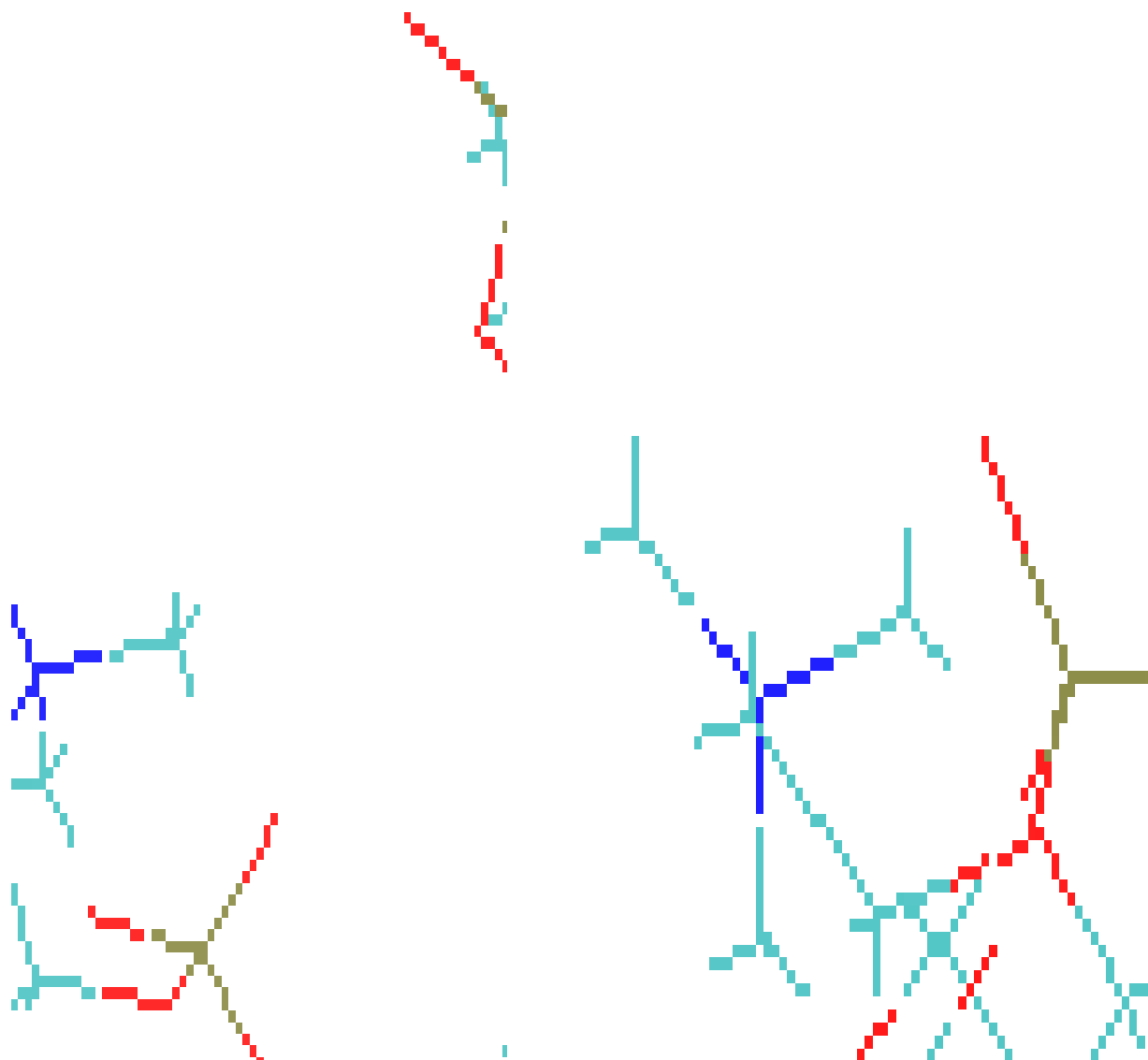
Молнупіравір

Тілорон

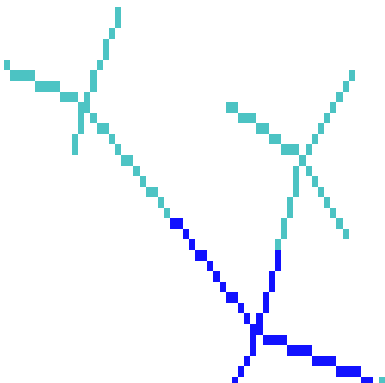
0.1 нс



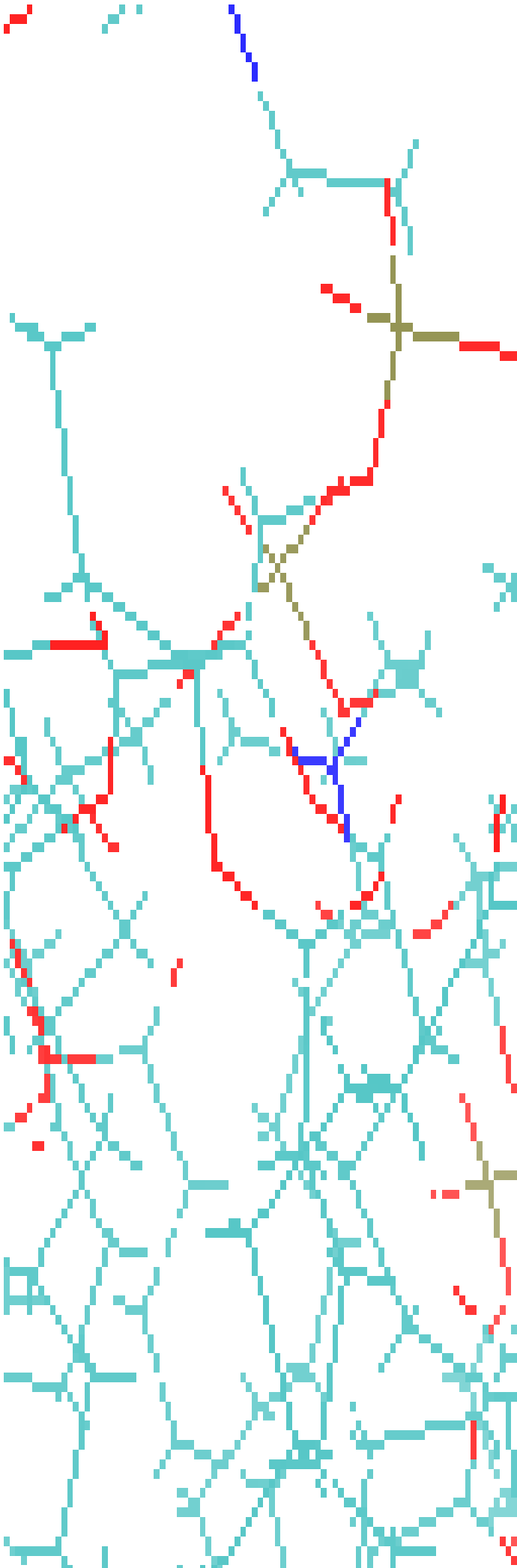
20 нс



50 нс



80 нс



100 нс

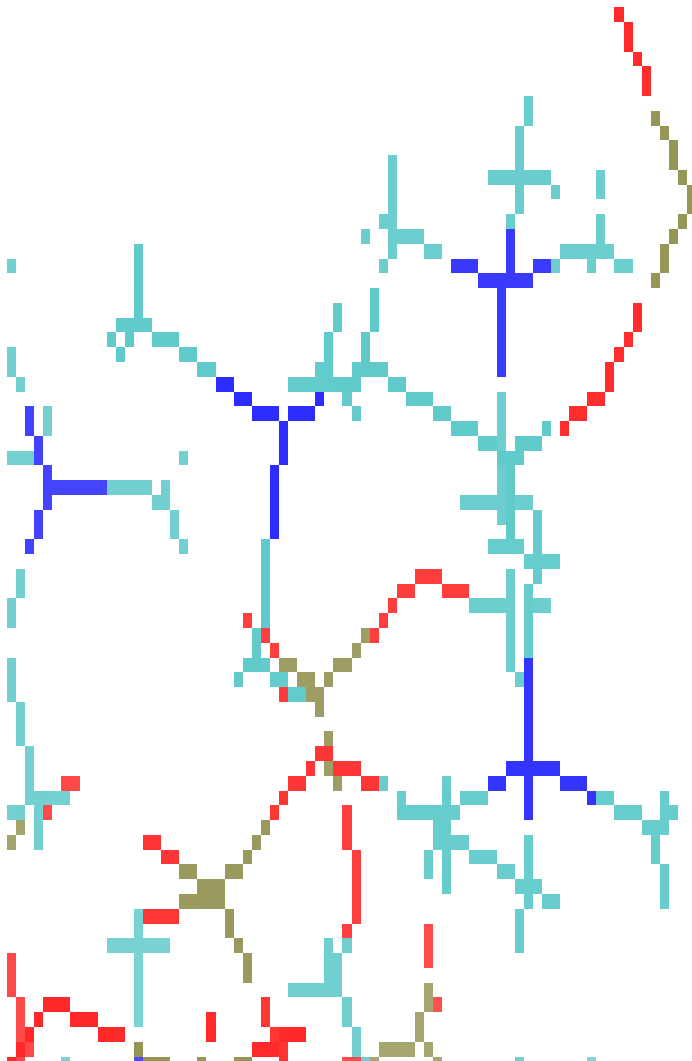


Рис. 3.8 Моментальні знімки розташування молнупіравіру та тілорону відносно ліпідного бішару в різних часових точках МД симуляції.

протівірусних препаратів крізь мембрану, як вірусну, так і клітини господаря, є важливим для фармакокінетики та дизайну препаратів [39].

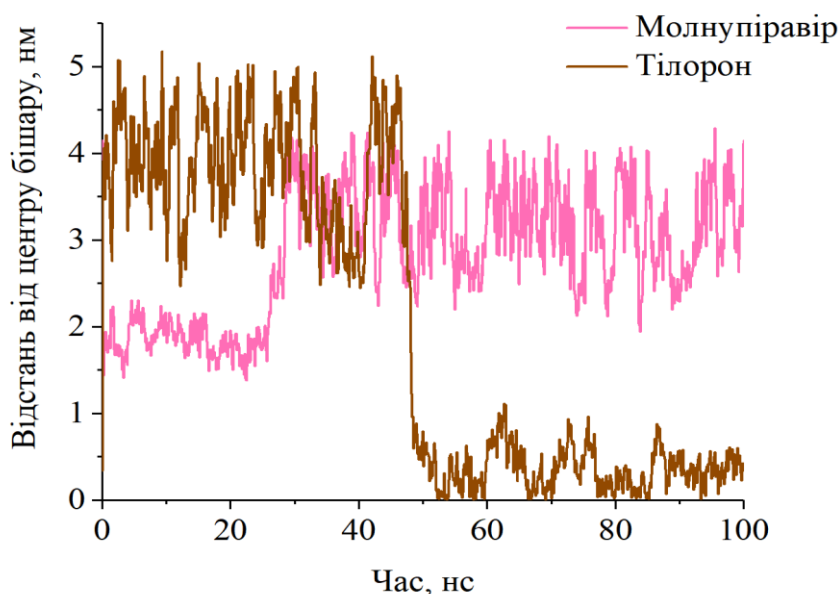


Рис. 3.9 Часова еволюція відстані між лікарським препаратом (тілорон позначено коричневою лінією, молнупіравір – малиноюю) та центром бішару

Як можна бачити із Рис. 3.8, молекула молнупіравіру, що спочатку була розміщена на відстані 15 Å від центру мас бішару, не пізніше, ніж після половини часового перебігу симуляції, покидає ліпідний бішар та виходить у полярне середовище, тоді як тілорон після 50 нс занурюється в мембрану та змінює свою орієнтацію з перпендикулярної до мембрани на паралельну. Більш детально, взаємодію препаратів з бішаром протягом симуляції можна бачити на Рис. 3.9. Для молнупіравіру можна бачити, що флуктуації відстані від центру бішару навколо значення 2 нм (препарат знаходиться в області полярних голівок) на 30 нс різко збільшуються до 2.5 – 4 нм, що свідчить про переміщення молнупіравіру в водному середовищі над мембраною. Короткочасні зменшення

відстані до 2 нм можуть вказувати на можливість контактів лікарського препарату з полярними голівками ліпідів, однак слабкість взаємодії є причиною того, що ліганд не затримується біля ліпідного бішару. Для тілорону, навпаки, сильні флуктуації від 3 до 5 нм близько 50 нс різко спадають до значень 0-1 нм, що вказує на проникнення препарату в гідрофобну область. Така поведінка корелює із значеннями ліпофільності даних препаратів. Так, за даним банку даних для малих молекул (<https://zinc15.docking.org/substances/ZINC000000538461/>) $\log P=4.339$ для тілорону, тоді як для молнупіравіру розраховані в програмі MarvinSketch значення $\log P$ варіювалось від -1.05 (отримане методом Consensus) до -0.44 (ChemAxon).

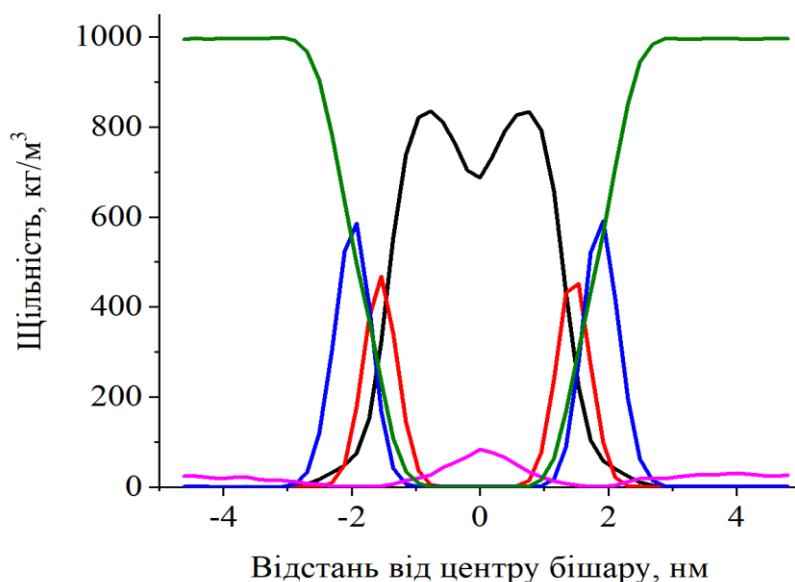


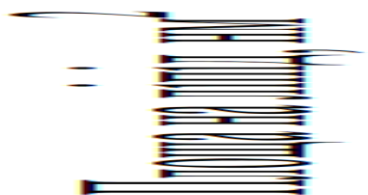
Рис. 3.10 Профілі щільності маси тілорону (рожева лінія), води (зелена), ацильних ланцюгів (чорна), гліцеролів (червона) та полярних голівок (синя) по відношенню до центру мас бішару. Для кращої візуалізації профіль тілорону був масштабований в 20 разів.

На Рис. 3.10 зображені профілі щільності маси таких компонентів ліпідного бішару як ацильні ланцюги, гліцероли та полярні голівки, а також води та ліганду. Максимум піку щільності припадає на -0.00221 нм, що означає, що

під кінець симуляції тілорон розміщується в області гідрофобних хвостів (0-8 Å від центру мембрани) [40].

Для того, щоб знайти як впливає молекула препарату на структуру ліпідного бішару, було досліджені зміни середньої площі, що приходить на одну ліпідну голівку, та зміни товщини мембрани в присутності та відсутності лікарського препарату (Рис. 3.11). Як можна бачити з рисунку, для обох параметрів помітні сильні флуктуації на одному рівні, зразок і контроль відрізняються мало, з чого можна зробити висновок, що молекула тілорону майже не впливає на структуру ліпідного бішару, що також раніше спостерігалось для молекули TDV [40].

А



Б

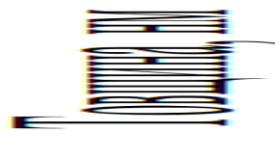


Рис. 3.11 Структурні параметри ліпідного бішару в присутності тілорону та контролі: середня площа на ліпід (А) та товщина мембрани (Б)

ВИСНОВКИ

У даній роботі методом молекулярного докінгу було досліджено взаємодію тілорону та молнупіравіру з рецептор-зв'язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2 та ангіотензин-перетворювальним ензимом 2, а також методом молекулярної динаміки проведено оцінку зв'язування даних препаратів з модельними мембранами із фосфатидилхоліна.

1. Для тілорону найбільш енергетично вигідні комплекси були виявлені з ангіотензин-перетворювальним ензимом 2, тоді як молнупіравір з високою вірогідністю взаємодіє також з рецептор-зв'язуючим доменом спайк-білка SARS-CoV-2, що підтверджується як серверами PatchDock/FireDock, так і SwissDock.
2. Отримано високі значення загальної енергії (від - 50.32 до -40.14 ккал/моль та від -43.27 ккал/моль до - 35.45 ккал/моль для трьох найбільш енергетично вигідних комплексів тілорону та молнупіравіру, відповідно) за допомогою серверу FireDock, а також високі значення вільної енергії зв'язування (для трьох найкращих комплексів з тілороном в межах від -10.79 до - 9.96 ккал/моль, тоді як для молнупіравіру – від - 7.52 до -7.41 ккал/моль) після SwissDock, що вказує на: а) суттєву афінність тілорону до рецептору та молнупіравіру як до ACE2, так і до рецептор-зв'язуючого домену; б) вищу вірогідність утворення комплексів тілорону з ACE2, ніж молнупіравіру з RBD та рецептором.
3. Для найбільш енергетично вигідного комплексу молнупіравіру виявлено гідрофобні та водневі зв'язки з амінокислотними залишками Thr434, Asn437, Phe438, Lys441, Ile291, Lys441 рецептора (алгоритм FireDock), а також для комплексів з тілороном були виявлені гідрофобні зв'язки та сольові містки з Leu370, Thr371, Ala413, Asp367, Glu375 та Asp269 ангіотензин-перетворювального ензиму 2 (сервер SwissDock), що вказує на блокування активного сайту ферменту, перешкоджання проникненню вірусу до клітини людини та протівірусну активність обох препаратів.

4. Зв'язування молнупіравіру з RBD характеризується вільною енергією зв'язування -7.52 ккал/моль, що свідчить про високу стабільність комплексу та, разом із фактом наявності водневих зв'язків, вказує на можливість сильної дестабілізації 3D-структури рецептор-зв'язуючого домену спайк-білка SARS-CoV-2.
5. Методом молекулярної динаміки виявлено, що протонована форма тілорону зв'язується з ліпідним бішаром в області гідрофобних хвостів, тоді як молнупіравір, за результатами 100-нс симуляції, не взаємодіє з мембраною, а віддає перевагу полярному середовищу, що можна пояснити низьким значенням ліпофільності даного препарату.
6. Узагальнюючи результати комп'ютерного моделювання, можна зробити висновок, що обидва препарати проявляють протівірусну активність та можуть бути рекомендовані для подальших експериментальних досліджень та ефективного лікування SARS-CoV2, чи використання в комбінованій терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Krueger RE, Mayer GD. Tilorone hydrochloride: an orally active antiviral agent. *Science*. 1970;169(3951):1213–1214.
2. Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The nonstructural proteins directing coronavirus RNA synthesis and processing. *Adv. Virus Res.* 2016;96:59–126.
3. Katz E, Margalith E, Winer B. The effect of tilorone hydrochloride on the growth of several animal viruses in tissue cultures. *The Journal of general virology*. 1976;31(1):125–129.
4. Vicenti I, Zazzi M, Saladini F. SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase as a therapeutic target for COVID-19. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2021;31:325–337.
5. Katz E, Margalith E, Winer B. Inhibition of herpesvirus deoxyribonucleic acid and protein synthesis by tilorone hydrochloride. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976;9(1):189–195. doi: 10.1128/AAC.9.1.189.
6. Cross R. Merck & Co. joins race for COVID-19 vaccines and therapies. *Chemical & Engineering News*. 2020;98:12.
7. Fischer WA, Eron JJ, Holman W, Cohen MS, Fang L, Szewczyk LJ, et al. Molnupiravir an Oral Antiviral Treatment for COVID-19. *medRxiv*. 2021.
8. Paymode DJ, Vasudevan N, Ahmad S, Kadam AL, Cardoso FS, Burns J, et al. Toward a practical, two-step process for molnupiravir from cytidine. 2021.
9. Gopalsamuthiram V, Kadam AL, Noble J, Snead D, Williams C, Jamison TF, et al. Towards a practical, non-enzymatic process for molnupiravir from cytidine. 2021.
10. Kabinger F, Stiller C, Schmitzová J, Dienemann C, Kokic G, Hillen HS, et al. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2021:1–7.
11. Khoo SH, Fitzgerald R, Fletcher T, Ewings S, Jaki T, Lyon R, et al. Optimal dose and safety of molnupiravir in patients with early SARS-CoV-2: a Phase I, open-label, dose-escalating, randomized controlled study. *J Antimicrob Chemother.* 2021.

12. Zarenezhad E, Behrouz S, Farjam M, Rad MS. A mini review on discovery and synthesis of remdesivir as an effective and promising drug against COVID-19. *Russian J Bioorg Chem.* 2021;47:609–21.
13. P. Csizmadia, MarvinSketch and MarvinView: molecule applets for the WorldWide Web, *Proceedings of ECSOC-3, the third international electronic conference on synthetic organic chemistry* 1999, pp. 367–369, <https://doi.org/10.3390/ecsoc-3-01775>.
14. M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminform.* 4 (2012) 17, <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
15. E. Vanqualef, S. Simon, G. Marquant, E. Garcia, G. Klimerak, J. C. Delepine, P. Cieplak & F.-Y. Dupradeau, R.E.D. Server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments, *Nucl. Acids Res. (Web server issue)* 2011, 39, W511-W517.
16. Lee J., Cheng X., Swails J. M., Yeom M. S., Eastman P. K., Lemkul J. A., Wei S., Buckner J., Jeong J. C., Qi Y., Jo S., Pande V. S., Case D. A., Brooks III C. L., MacKerell A. D. J., Klauda J. B., Im W. CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field // *J. Chem. Theory Comput.* 2016. Vol. 12. P. 405–413.
17. Spoel D. Gromacs: fast, flexible and free / D. Spoel, E. Lindahl, B. Hess et al. // *J. Comp. Chem.* – 2005. – V. 26. – P. 1701-1718.
18. Huang J. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data / J. Huang, A. MacKerell // *J. Comput. Chem.* – 2013. – V. 34. – P. 2135-2145.
19. H. Berendsen, J. Postma, W. van Gunsteren, A. DINola, J. Haak, *J.Chem. Phys.* 81, 3684-3690 (1984). <https://doi.org/10.1063/1.448118>.

20. S. Buchoux, FATSLiM/fatslim: FATSLiM v 0.2.1 (2016).
<http://doi.org/10.5281/zenodo.158942>.
21. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // J. Mol. Graph. 1996. Vol. 14. P. 33–38.
22. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock // DSS Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39. P. W270–W277.
23. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. EADock: Docking of small molecules into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization // Proteins. 2007. Vol. 67. Article number 1010.
24. Duhovny D., Nussinov R., Wolfson H. J. Efficient unbound docking of rigid molecules // Lect. Notes. Comput. Sci. Eng. 2002. Vol. 2452. P. 185–200.
25. Mashiach E., Schneidman-Duhovny D., Andrusier N., Nussinov R., Wolfson H. J. Fire Dock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking // Nucleic Acids Res. 2008. Vol. 36. P. 229–232.
26. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis // J. Comput. Chem. 2004. Vol. 25. P. 1605–1612.
27. Salentin S., Schreiber S., Haupt V. J., Adasme M. F., Schroeder M. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43. P. W443–W447.
28. Skeggs, L. T., Kahn, J. R., & Shumway, N. P. (1956). The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *The Journal of Experimental Medicine*, 103(3), 295–299. <https://doi.org/10.1084/jem.103.3.295>
29. H. Khelfaoui, D. Harkati, B.A. Saleh. Molecular docking, molecular dynamics simulations and reactivity, studies on approved drugs library targeting ACE2 and SARS-CoV-2 binding with ACE2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39:18, 7246-7262, DOI: 10.1080/07391102.2020.1803967

30. Norah Ali AlGhamdi, Hind Saleh Alsuwat, J. Francis Borgio, and Sayed AbdulAzeez. Emerging of composition variations of SARS-CoV-2 spike protein and human ACE2 contribute to the level of infection: in silico approaches //J Biomol Struct Dyn. 2020 : 1–12. doi: 10.1080/07391102.2020.1841032
31. Offringa, A., Montijn, R., Singh, S., Paul, M., Pinto, Y. M., & Pinto-Sietsma, * S.-J. (2020). The mechanistic overview of SARS-CoV-2 using angiotensin-converting enzyme 2 to enter the cell for replication: Possible treatment options related to the renin–angiotensin system. *European Heart Journal - Cardiovasc Pharmacotherapy*, 6(5), 1–9. 10.1093/ehjcvp/pvaa053
32. Hasan, A., Paray, B. A., Hussain, A., Qadir, F. A., Attar, F., Aziz, F. M., Sharifi, M., Derakhshankhah, H., Rasti, B., Mehrabi, M., Shahpasand, K., Saboury, A. A., & Falahati, M. (2020). A review on the cleavage priming of the spike protein on coronavirus by angiotensin-converting enzyme-2 and furin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1754293>
33. Basit, A., Ali, T., & Rehman, S. U. (2020). Truncated human angiotensin converting enzyme 2; a potential inhibitor of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and potent COVID-19 therapeutic agent. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1768150>
34. Te Velthuis, A. J. W., van den Worm, S. H. E., Sims, A. C., Baric, R. S., Snijder, E. J., & van Hemert, M. J. (2010). Zn(2p) inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture. *PLoS Pathogens*, 6(11), e1001176 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001176>
35. Srivastava AK, Singh D. Destabilizing the structural integrity of SARS-CoV2 receptor proteins by curcumin along with hydroxychloroquine: an in silico approach for a combination therapy. *ChemRxiv*. 2020 <https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/60c749c2567dfe7c3cec4c4b>

36. Thangavel M, Chandramohan V, Shankaraiah LH, et al (2020) Design and Molecular dynamic Investigations of 7,8-Dihydroxyflavone Derivatives as Potential Neuroprotective Agents Against Alpha-synuclein. Sci Rep. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57417-9>
37. Srivastava AK, Singh D, Roy BK (2017) Structural Interactions of Curcumin Biotransformed Molecules with the N-Terminal Residues of Cytotoxic-Associated Gene A Protein Provide Insights into Suppression of Oncogenic Activities. Interdiscip Sci Comput Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s12539-016-0142-2>
38. Karolina Jagiello, Anita Sosnowska, Supratik Kar, Sebastian Demkowicz, Mateusz Daśko, Jerzy Leszczynski, Janusz Rachon, Tomasz Puzyn. Geometry optimization of steroid sulfatase inhibitors -the influence on the free binding energy with STS // Struct Chem (2017) 28:1017–1032. DOI 10.1007/s11224-016-0903-x
39. Liu C., Elvati P., Violi A. On Drug-Membrane Permeability of Antivirals for SARS-CoV-2 // J. Phys. Chem. Lett. 2021. Vol. 12. P. 1384–1389.
40. Zhytniakivska O. Interaction of novel phosphonium dye with lipid bilayers: a molecular dynamic study // East. Eur. J. Phys. 2022. Vol. 1. P. 77-84.