

Ispitivanje inhibitornog učinka derivata futalozina na SARS-CoV-2 3CLpro metodom molekuskog sidrenja

Nucak, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:920415>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Antonija Nucak

**Ispitivanje inhibitornog učinka derivata
fotalozina na SARS-CoV-2 3CLpro metodom
molekulskog sidrenja**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc.

Hrvoja Rimca.

Veliko hvala mentoru doc. dr. sc. Hrvoju Rimcu na pomoći, strpljenju, prenesenom znanju i stručnom vodstvu prilikom izrade ovog rada.

SADRŽAJ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Kratki kronološki pregled izbijanja globalne pandemije COVID-19 | 1 |
| 1.2. Strukturne i molekularne značajke SARS-CoV-2..... | 2 |
| 1.3. Životni ciklus SARS-CoV-2 | 5 |
| 1.4. Put prijenosa i klinička slika | 6 |
| 1.5. Cjepiva i varijante SARS-CoV-2 | 8 |
| 1.6. Odobreni lijekovi..... | 10 |
| 1.7. SARS-CoV-2 3CLpro kao potencijalna meta lijekova | 10 |
| 1.8. Antivirusno djelovanje spojeva iz prirode | 12 |
| 1.9. Inhibicijski potencijal fitalozina | 15 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 16 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 17 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 19 |
| 4.1. Rezultati molekuskog sidrenja fitalozina | 19 |
| 4.2. Modificiranje molekule fitalozina | 21 |
| 4.3. Rezultati prvog kruga molekuskog sidrenja..... | 22 |
| 4.4. Modificiranje molekule F41 | 24 |
| 4.5. Rezultati drugog kruga molekuskog sidrenja..... | 26 |
| 4.6. Molekula F41.17 | 28 |
| 4.6.1. Struktura i smještaj..... | 28 |
| 4.6.2. Ligand-protein interakcije | 29 |
| 4.6.3. Mogućnosti daljnje modifikacije..... | 31 |
| 4.6.4. Farmakokinetička predviđanja | 32 |
| 5. ZAKLJUČAK | 33 |
| 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA | 34 |
| 7. LITERATURA | 36 |
| 8. SAŽETAK | 42 |
| 8. SUMMARY | 43 |
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA | |

1. UVOD

Humani koronavirusi prvi put su otkriveni 60-ih godina 20. stoljeća te su ime dobili zahvaljujući strukturi koju proteini šiljka tvore na površini virusa, a koja nalikuje kruni. Ustanovljeno je da svi humani koronavirusi koji su do sada poznati potječu od životinjskih koronavirusa (Chung i sur., 2021). Tijekom povijesti, niz koronavirusa uspjelo je „preskočiti barijeru“ i prijeći sa životinjske vrste na čovjeka, a u posljednja dva desetljeća zabilježene su tri nove transmisije. Godine 2003. u Kini, SARS-CoV (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*), odnosno 2012. u Saudijskoj Arabiji, MERS-CoV (engl. *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) izazvali su epidemiju životno ugrožavajuće upale pluća, posebice u djece, starijih i imunokompromitiranih pacijenata (Chen i sur., 2020; Lebeau i sur., 2020; Chung i sur., 2021). Trenutno se svijet suočava s probojem novog koronavirusa SARS-CoV-2, koji je u samo nekoliko mjeseci izazvao stanje globalne pandemije uzrokujući tako i globalnu krizu (Wu i sur., 2020; Jukič i sur., 2021).

1.1. Kratki kronološki pregled izbijanja globalne pandemije COVID-19

U prosincu 2019. godine u nekoliko bolnica u gradu Wuhanu, pokrajini Hubei u Kini, prijavljeno je više slučajeva neobjašnjive upale pluća. Utvrđeno je da su slučajevi povezani s posjetima velikoj tržnici morskih plodova i životinja u Wuhanu (Wu i sur., 2020). Ponukani trenutnim zbivanjima, Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centre for Disease Control and Prevention*, CDC) i kineske zdravstvene vlasti poduzimaju brze mjere dezinfekcije i sanitacije (Tahir ul Qamar i sur., 2020; Xu i sur., 2020). Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) novi patogen privremeno naziva „2019 novi koronavirus“ (engl. *2019 novel CoronaVirus*, 2019-nCoV) (Chen i sur., 2020). Već 10. siječnja 2020. godine znanstvenici objavljuju prvi sekvencirani genom 2019-nCoV pomoću kojeg se ubrzo omogućuje identifikacija virusa u pacijenata metodom lančane reakcije polimeraze pomoću reverzne transkriptaze (engl. *Reverse transcription polimerase chain reaction*, RT-PCR) (Tahir ul Qamar i sur., 2020).

Xu i suradnici (2020) 21. siječnja 2020. objavljuju prvi znanstveni članak u kojem otkrivaju da 2019-nCoV pripada rodu betakoronavirusa i dijeli isto podrijetlo s koronavirusom šišmiša HKU9-1 te pokazuje sličnosti sa SARS-om i koronavirusima nalik SARS-u. Iako je

slijed aminokiselina proteina šiljka (engl. *spike protein*) 2019-nCoV različit od slijeda aminokiselina proteina šiljka SARS virusa, 2019-nCoV također ostvaruje snažnu interakciju s humanim ACE2 (angiotenzin konvertirajući enzim 2, engl. *Angiotensin-Converting Enzyme 2*) receptorom. Od 15. siječnja 2020. laboratorijski je potvrđeno više od četrdeset slučajeva infekcije novim koronavirusom te jedan smrtni slučaj, a iako transmisija s čovjeka na čovjeka još uvijek nije bila potvrđena, prijavljeni su slučajevi infekcije u Hong Kongu, Japanu i na Tajlandu. Svjetska zdravstvena organizacija 30. siječnja proglašava 2019-nCoV javnozdravstvenom prijetnjom od međunarodnog značenja (engl. *Public Health Emergency of International Concern*, PHEIC) te se ubrzo potvrđuje i prijenos virusa s čovjeka na čovjeka, a 12. veljače preimenuje patogen 2019-nCoV u SARS-CoV-2 koji uzrokuje infekciju COVID-19 (engl. *Coronavirus Disease 2019*) (Tahir ul Qamar i sur., 2020).

Prema podacima Sveučilišta John Hopkins (<https://coronavirus.jhu.edu>) do dana 11. ožujka 2020. zabilježeno je 782 365 slučajeva infekcije u 178 zemalja i regija te 37 582 potvrđenih smrtnih slučajeva, što navodi Svjetsku zdravstvenu organizaciju da proglasi stanje globalne pandemije COVID-19 (Cucinotta i Vanelli, 2020). Danas, nakon više od dvije godine od proglašenja pandemije, zabilježeno je više od pola milijarde slučajeva infekcije COVID-19 te više od 6 200 000 smrtnih slučajeva (<https://coronavirus.jhu.edu>).

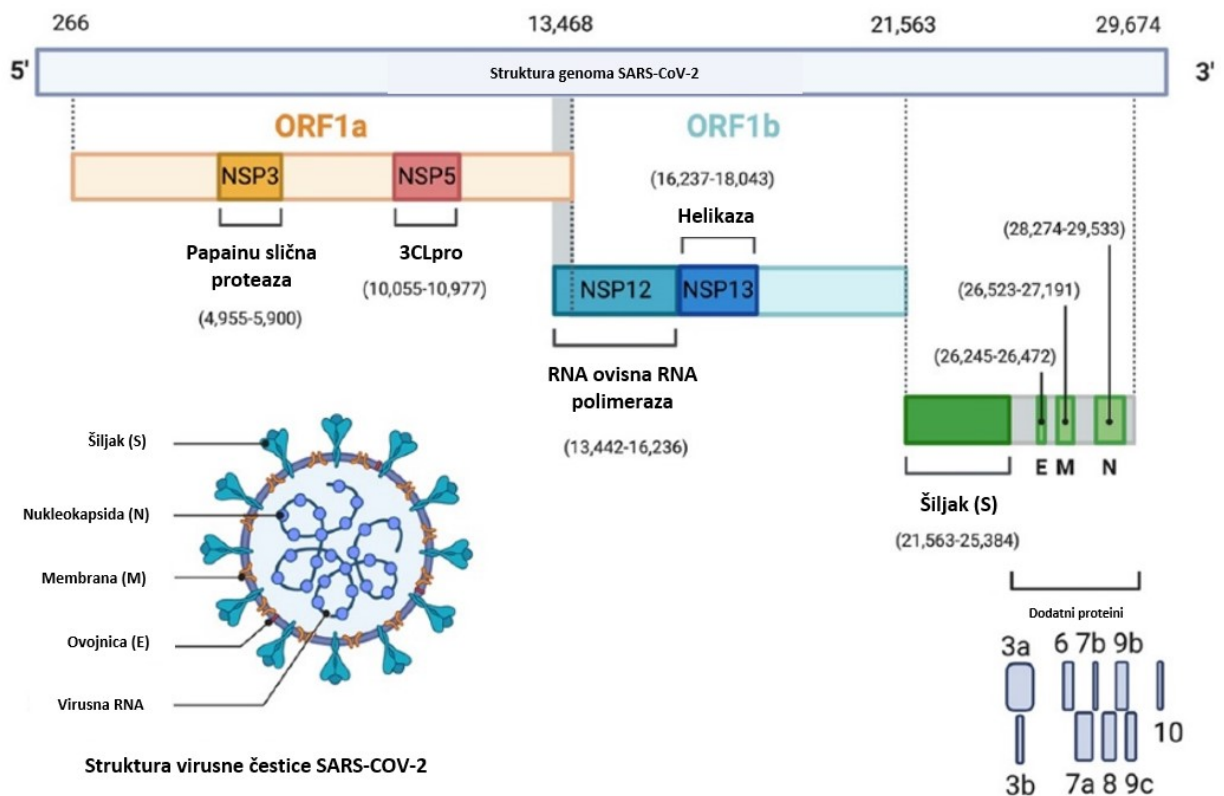
1.2. Strukturne i molekularne značajke SARS-CoV-2

Koronavirusi su dio potporodice *Coronavirinae* koji pripadaju porodici *Coronaviridae* i redu *Nidovirales* (Rahman i sur., 2021). Potporodica *Coronavirinae* uključuje četiri roda: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus*. Prva dva roda uglavnom inficiraju sisavce, dok druga dva inficiraju ptice, od kojih neki mogu prijeći i na sisavce. SARS-CoV-2 pripada rodu betakoronavirusa (Chen i sur., 2020). Riječ je o jednolančanom pozitivno-smislenom RNA virusu ((+)ssRNA) s velikim genomom, veličine oko 125 nm, obavijenim ovojnicom te izraženim proteinima šiljka na površini koji tvore strukturu nalik kruni (Lebeau i sur., 2020; Chung i sur., 2021; Novak i sur., 2021). Filogenetskom usporedbom SARS-CoV-2 s ostalim koronavirusima utvrđeno je da su prvotni domaćini ovog virusa bili šišmiši, međutim nije još sasvim poznato koja je točno vrsta poslužila kao posrednik omogućivši tako prijenos virusa na čovjeka. Smatra se da bi mogući posrednik mogao biti luskavac pangolin jer genom koronavirusa nađenog kod te vrste dijeli 99%

homologije s genomom SARS-CoV-2 (Yi i sur., 2020). Novi koronavirus pokazuje 82% sličnosti u genomu s prethodno istraženim SARS-CoV te 90% sličnosti s MERS-CoV, a s njima dijeli i zajednički mehanizam patogeneze (Jukić i sur., 2021).

Genom SARS-CoV-2 duljine je oko 30 kilobaza (kb). Prve 2/3 genoma kodiraju za replikacijsko-transkripcijski kompleks, dok zadnja trećina sadrži informaciju za sintezu četiri najbitnija strukturna proteina (Slika 1). Replikacijsko-transkripcijski kompleks jedini je dio koji se translacija izravno s RNA virusa. Geni ORF1a i ORF1b kodiraju za dva poliproteina koji se autoproteolitički cijepaju i tvore 16 nestrukturnih proteina bitnih za replikaciju i transkripciju virusa (Lebeau i sur., 2020).

Strukturne proteine čine: protein šiljak (engl. *spike*, S), protein ovojnice (engl. *envelope*, E), protein membrane (engl. *membrane*, M) te protein nukleokapside (engl. *nucleocapside*, N). Protein S odgovoran je za vezanje virusa za stanicu domaćina, stapanje s membranom te ulazak unutar stanice, protein M čini sastavni dio strukturnog identiteta membrane virusa; N protein obavija RNA virusa formirajući nukleokapsidu te pomaže pri pupanju virusa i replikaciji. Protein E najmanje je istražen, ali izgledno je da ima ulogu u sastavljanju virusne čestice, otpuštanju iz stanice i patogenezi (Chung i sur., 2021; Rahman i sur., 2021).

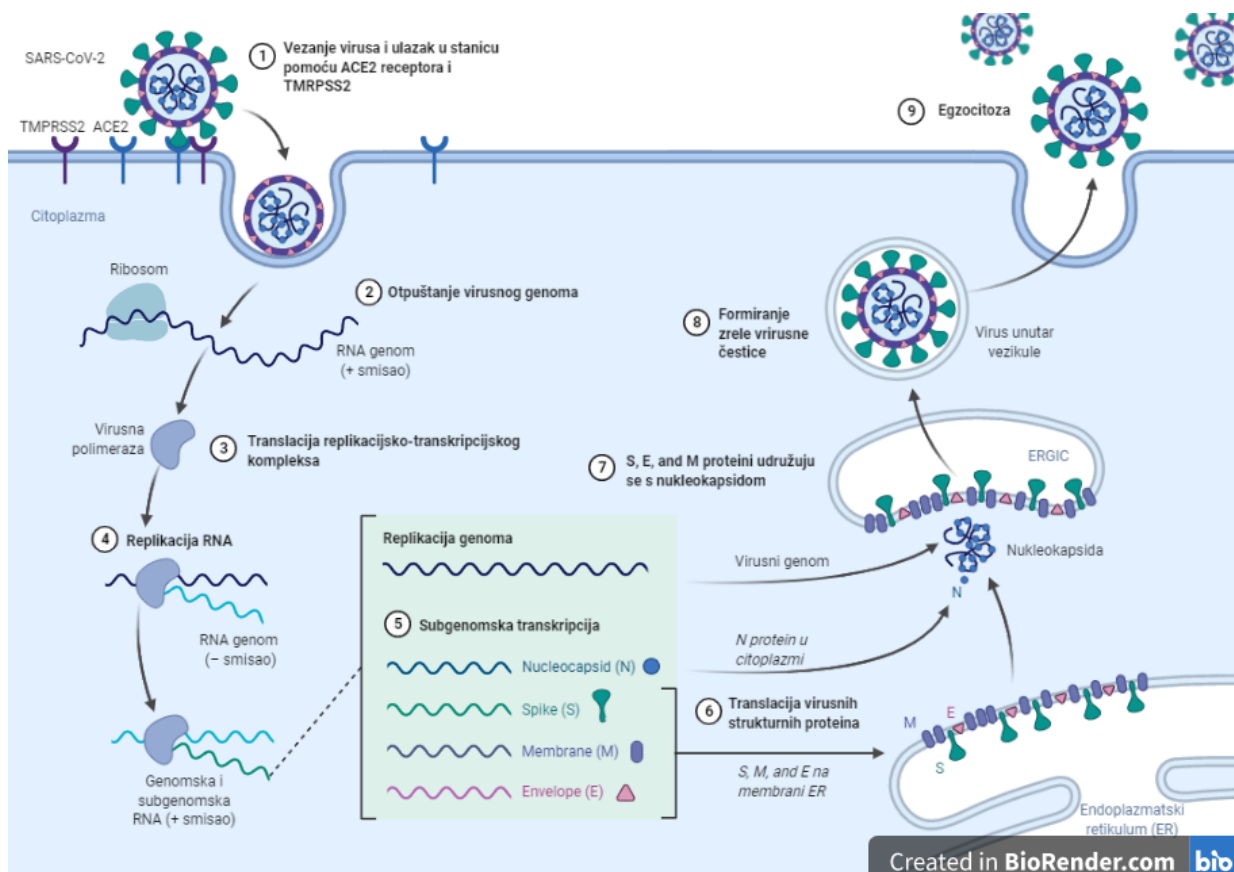


Slika 1. Organizacija genoma SARS-CoV-2. Genom sadrži dva velika gena ORF1a (žuto) i ORF1b (plavo) koji kodiraju za 16 nestrukturnih proteina (NSP1-NSP16). Nestrukturni proteini tvore replikacijsko-transkripcijski kompleks (RTC). Najvažnije nestrukturane proteine kodiraju geni NSP3, 5, 12 i 15. NSP3 i NSP5 kodiraju za papainu sličnu proteazu (engl. papain-like protease, PLpro) odnosno 3CL-proteazu (engl. 3-chymotrypsin-like protease, 3CL-pro) koje imaju ulogu u cijepanju polipeptida i sprječavanju urođenog imunskog odgovora. NSP12 kodira za RNA ovisnu RNA polimerazu (engl. RNA dependent RNA polimerase, RdRp), a NSP15 helikazu. Geni za strukturne proteine (S, E, M, N) označeni su zelenom bojom, a sivo označeni susjedni proteini jedinstveni su za SARS-CoV-2 s obzirom na broj, redoslijed u genomu i funkciju (preuzeto i prilagođeno prema Lebeau i sur., (2020) uz dopuštenje izdavača).

1.3. Životni ciklus SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 primarno inficira cilijarne bronhijalne epitelne stanice i pneumocite tipa II, gdje se pomoću S proteina veže na površinski ACE2 receptor (Slika 2A) (Alanagreh i sur., 2020). S protein je veoma glikozilirani trimer cilindričnog oblika koji sadrži dvije domene, S1 i S2, bitne za vezanje odnosno fuziju virusa (Rahman i sur., 2021). S1 podjedinica S proteina određuje raspon domaćina i tropizam virusa te je zaslužna za vezanje virusa za ciljnu stanicu, dok S2 podjedinica omogućuje stapanje virusne i stanične membrane pri čemu virus ulazi u stanicu domaćina endocitozom. Afinitet između površinskih proteina virusa i receptora stanica domaćina predstavlja kritični uvjet za ulazak virusa u stanicu, a veća sposobnost zaraze SARS-CoV-2 u odnosu na SARS-CoV mogla bi se objasniti 10 do 20 puta većom učinkovitošću vezanja SARS-CoV-2 za ACE2 receptor (Alanagreh i sur., 2020), zbog zamjene nekoliko ostataka u receptor-vezujućoj domeni (engl. *Receptor Binding Domain*, RBD) koji stabiliziraju podjedinice za vezanje (Tran i sur., 2022).

Cijepanje S proteina od strane transmembranske serinske proteaze 2 (engl. *Transmembrane Serine Protease 2*, TMPRSS2) s površine stanica domaćina nužno je za prevođenje S proteina u fuzogeno stanje koje neposredno pokreće stapanje virusne i stanične membrane domaćina (Tran i sur., 2022). Zabilježeno je i alternativno cijepanje pomoću katepsina L tijekom endocitoze (Lebeau i sur., 2020). Prilikom oba mehanizma ulaska, genom virusa se oslobađa u citosol stanice domaćina, gdje se izravno s RNA lanca translacija replikacijsko-transkripcijski kompleks (Slika 2B-C). Poliproteine (pp1a i pp1ab) cijepa virusna proteaza u nestrukturane proteine replikacijsko-transkripcijskog kompleksa, uključujući i RNA ovisnu RNA polimerazu. Pozitivno smisljeni genom nakon toga služi kao kalup za transkripciju negativno smislene RNA koja je potrebna za replikaciju virusnog genoma (Slika 2D) i subgenomske RNA (sgRNA) čijom translacijom u endoplazmatskom retikulumu stanice domaćina nastaju strukturni proteini: S, E, M, N (Slika 2E-F) (Harrison i sur., 2020). Nakon translacije, M, S i E proteini prenose se do mjesta sastavljanja virusne čestice, prijelazne vezikule između endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata (ERGIC). N protein se spaja s repliciranim virusnim genomom ((+)ssRNA) s kojim tvori nukleoprotein i ulazi u vezikulu, pri čemu dolazi do sastavljanja virusne čestice (Slika 2G-H). Zadnji korak životnog ciklusa SARS-CoV-2 čini egzocitoza virusa (Slika 2I) (Lebeau i sur., 2020).



Slika 2. Životni ciklus SARS-CoV-2. (1) Ulazak virusa u ciljnu stanicu pomoću ACE2 receptora. (2) Oslobođanje virusnog genoma. (3) Izravna translacija replikacijsko-transkripcijskog kompleksa s RNA virusa. (4) Replikacija virusnog genoma na temelju negativno smislenog kalupa. (5) Transkripcija subgenomske RNA koja nosi kod za strukturne proteine. (6) Translacija strukturalnih proteina S, E i M u endoplazmatskom retikulumu. (7) N protein se spaja s genomom virusa i tvori nukleoprotein te ulazi u vezikulu i zajedno s ostalim strukturalnim proteinima formira se zrela virusna čestica (8). (9) SARS-CoV-2 izlazi iz zaražene stanice egzocitozom (Izrađeno u programu BioRender.com (2022.) uz pomoć predloška „Coronavirus Replication Cycle“ preuzetog s mrežne stranice <https://app.biorender.com>).

1.4. Put prijenosa i klinička slika

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (<https://www.who.int>) glavni put prijenosa SARS-CoV-2 s čovjeka na čovjeka je kapljičnim putem pri bliskom kontaktu s osobom koja kiše i/ili kašlje, pri čemu je nezaražena osoba preko sluznice nosa i usta te konjunktive oka izravno izložena infektivnim respiratornim kapljicama zaražene osobe. Osim

kapljično, virus se može prenijeti i neizravno pomoću kontaminiranih predmeta jer ima sposobnost preživljavanja na površinama određeno vrijeme (<https://www.hzjz.hr>). Virus je također detektiran u fecesu nekih pacijenata iz Wuhana i Sjedinjenih Američkih Država, što upućuje na to da SARS-CoV-2 može preživjeti i replicirati se u probavnom traktu, pri čemu se javlja sumnja o potencijalnom fekalno-oralnom prijenosu virusa (Wu i sur., 2020).

Vrijeme inkubacije virusa u prosjeku iznosi 1 do 14 dana, no najčešće se kreće između 3 do 7 dana. Virus može biti prisutan na sluznici grla ili nosa nekoliko dana prije pojave prvih simptoma (Rahman i sur., 2021). Simptomi COVID-19 infekcije su nespecifični te mogu varirati od asimptomatske infekcije pa sve do teške pneumonije koja može završiti smrću (Wu i sur., 2020). Zanimljiva je činjenica da u potpuno asimptomatskih bolesnika količina virusa, odnosno opterećenje organizma virusom, može biti jednako kao i u simptomatskih. Ta spoznaja ukazuje na to da su upravo asimptomatski slučajevi mogući rezervoari infekcije (Rahman i sur., 2021). Najčešći simptomi koji se javljaju nakon inkubacije virusa su: povišena tjelesna temperatura, kašalj koji je uglavnom suhi, poteškoće u disanju, rinoreja, glavobolja, bolovi u mišićima te iscrpljenost (Yi i sur., 2020; <https://www.hzjz.hr>). Kod manjeg broja pacijenata mogu se javiti i gastrointestinalne tegobe poput proljeva i povraćanja (Rahman i sur., 2021). Neki pacijenti mogu razviti dispneju i/ili hipoksemiju najčešće tjedan dana od pojave simptoma. U teškim slučajevima infekcija brzo napreduje te se mogu razviti akutni respiratorni sindrom distresa, septički šok, metabolička acidoza i poremećaj u zgrušavanju krvi, koji svi mogu završiti fatalno (Yi i sur., 2020).

Poznato je da infekcija patogenom SARS-CoV-2 može biti okidač za pretjerani imunosni odgovor domaćina, poznatiji kao „citokinska oluja“. Radi se o potencijalno smrtonosnom stanju za koje je karakteristična prekomjerna aktivacija imunosnih stanica i pretjerano stvaranje proupalnih citokina i ostalih medijatora upale, od kojih su najznačajniji IL-2, 6, 10 te TNF- α . Ovo stanje organizma može dovesti do akutnog respiratornog sindroma distresa i višestrukog zatajenja organa koje se smatra ključnim uzrokom smrti uzrokovane infekcijom COVID-19 (Hu i sur., 2021). Tim težim oblicima bolesti najpodložniji su kronični bolesnici koji boluju od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, kroničnih plućnih bolesti, malignih oboljenja te starija populacija (<https://www.hzjz.hr>; <https://www.who.int>).

1.5. Cjepiva i varijante SARS-CoV-2

Svjetska zdravstvena organizacija odobrila je nekoliko cjepiva protiv bolesti COVID-19 u Popisu upotrebe u hitnim slučajevima (engl. *Emergency Use Listing*, EUL). Program masovnog cijepljenja započeo je u prosincu 2020. godine te se broj primljenih doza na svjetskoj razini svakodnevno bilježi (<https://www.who.int>). Prema podacima Agencije za lijekove i medicinske proizvode (<https://www.halmed.hr>) u Europskoj uniji i Republici Hrvatskoj trenutno je odobreno pet cjepiva različitih proizvođača čija su imena i karakteristike navedene u Tablici 1. Svjetska zdravstvena organizacija je objavila podatak da je do 27. travnja 2022. godine u svijetu je utrošeno ukupno 11 477 767 378 doza cjepiva (<https://covid19.who.int>).

Od početka pandemije zabilježeno je nekoliko značajnih mutacija proteina šiljka SARS-CoV-2 virusa, posebice u receptor-vezujućoj domeni (RBD) te u S1 domeni. Navedene mutacije rezultirale su većom zaraznošću virusa, nadjačavši tako prethodno cirkulirajuće sojeve, čime se javlja problem djelotvornosti postojećih cjepiva (Tran i sur., 2022). Među varijante virusa od interesa (engl. *Variants of Concern*, VOC) spadaju: Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1), Delta (B.1.617.2) i Epsilon (B.1.427/B.1.429) sojevi (Raman i sur., 2021; AlMalki i sur., 2022; Tran i sur., 2022). Navedene varijante SARS-CoV-2 povezane su s većom transmisijom virusa i težom kliničkom slikom, dok je za Beta i Epsilon soj zabilježena sposobnost zaobilaznja neutralizacije virusa protutijelima, čija je produkcija potaknuta cjepivom (Tran i sur., 2022).

Najnovija varijanta virusa koja je 26. studenog 2021. godine dospjela na VOC listu Svjetske zdravstvene organizacije je Omikron (B.1.1.529), koji pokazuje veću zaraznost u odnosu na Delta varijantu i sposoban je za značajno izbjegavanje cjepivom potaknutog imunskog odgovora zbog višestrukih mutacija proteina šiljka (Araf i sur., 2022; del Rio i sur., 2022). Tran i suradnici (2022) navode da je kod pacijenata cijepljenim sa samo dvije doze cjepiva, njihova djelotvornost u neutralizaciji Omikron soja značajno manja. Zaključno, nedovoljna procijepljenost na svjetskoj razini te pojava nove varijante SARS-CoV-2 predstavljaju najveći izazov u ovom stadiju pandemije (del Rio i sur., 2022).

Tablica 1. Cjepiva protiv bolesti COVID-19 odobrena u Europskoj uniji i njihove značajke (WHO guidance document 2022.; CDC- Vaccines for COVID-19, Agencija za lijekove i medicinske proizvode - informacije o odobrenim cjevivima)

| Naziv cjeviva | Proizvođač | Vrsta cjeviva | Broj doza | Datum odobrenja (EMA) |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| BNT162b2/COMIRNATY | Pfizer, Inc. i BioNTech | mRNA modificiranih nukleozida formulirana u lipidne nanočestice. | Za starije od 5 godina 2 doze u razmaku od 3 do 8 tjedana. <i>Booster</i> doza za starije od 12 godina se preporuča. | 21. prosinca 2020. |
| mRNA-1273/ Spikevax | ModernaTX, Inc | mRNA inkapsulirana u lipidne nanočestice. | Za starije od 18 godina 2 doze u razmaku od 4 do 8 tjedana. <i>Booster</i> doza se preporuča. | 6. siječnja 2021. |
| AZD1222 Vaxzevria | AstraZeneca i Sveučilište u Oxfordu | Rekombinantni ChAdOx1 adenovirusni vektor koji kodira protein šiljka SARS-CoV-2. | Za starije od 18 godina 2 doze u razmaku od 8 do 12 tjedana. <i>Booster</i> doza se može razmotriti nakon 4 do 6 mjeseci od druge doze. | 29. siječnja 2021. |
| Ad26.COV2.S/Jcovden | Janssen–Cilag International NV | Rekombinantni adenovirusni vektor (Ad26) koji kodira protein šiljka SARS-CoV-2. | Za starije od 18 godina 1 doza. <i>Booster</i> doza se preporuča. | 11. ožujka 2021. |
| NVX-CoV2373/Nuvaxovid | Novavax | Pročišćeni rekombinantni protein šiljka SARS-CoV-2 u formulaciji s Matrix-M adjuvansom. | Za starije od 18 godina 2 doze u razmaku od 3 tjedna. | 20. prosinca 2021. |

1.6. Odobreni lijekovi

Razvoj novog lijeka za liječenje COVID-19 predstavlja zahtjevan i dugotrajan proces, koji ne ide u prilog globalnoj pandemiji u kojoj se svijet nalazi, stoga se znanstvenici okreću intenzivnim ispitivanjima postojećih lijekova te njihovoj prenamjeni. Nekoliko lijekova je u fazi kliničkih ispitivanja uključujući lopinavir, favipiravir, ribavirin i leflunomid (<https://www.clinicaltrials.gov>). Dodatno, neke ljekovite biljke sa znatnom antivirusnom aktivnošću potencijalni su kandidati u liječenju COVID-19 (Rehman i sur., 2021).

Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) 22. listopada 2020. odobrila je remdesivir za liječenje COVID-19 infekcije u odraslih i djece starije od 12 godina, koji su pozitivni na SARS-CoV-2, imaju blage do umjerene simptome i u rizičnoj su skupini za razvoj teške infekcije, uključujući hospitalizaciju i smrt. 25. travnja 2022. proširuje odobrenje i na djecu stariju od 28 dana i težu od 3 kilograma (<https://www.fda.gov>).

Lijekovi za liječenje COVID-19 ovlaštene od strane Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) su: tiksagevimab/cilgavimab, anakinra, PF-07321332/ritonavir, regdanvimab, tocilizumab, casirivimab/imdevimab, remdesivir i sotrovimab, a odobreni su za različite faze COVID-19, od kojih su najčešće postojanje visokog rizika za razvoj teškog oblika bolesti i razvoj upale pluća koja zahtjeva ili ne zahtjeva nadomjesnu terapiju kisikom. Neki od ovih lijekova već su registrirani za druge indikacije, dok se ostali podvrgavaju dodatnom praćenju (<https://www.ema.europa.eu>).

1.7. SARS-CoV-2 3CLpro kao potencijalna meta lijekova

Betakoronavirusi obično proizvode polipeptid duljine oko 800 kDa uslijed transkripcije genoma. Nastali polipeptid se proteolitički cijepa pomoću papainu slične proteaze (PLpro) i 3-kimotripsinu slične proteaze (engl. *3-Chymotrypsin-Like Protease*, 3CLpro), koja se još naziva i glavna proteaza (engl. *Main Protease*, Mpro). 3CLpro cijepa poliprotein na 11 specifičnih mjesta, pri čemu nastaju nestrukturani proteini bitni za virusnu replikaciju (Anand i sur., 2003). Taj korak čini 3CL-proteazu jednom od ključnih enzima u životnom ciklusu virusa.

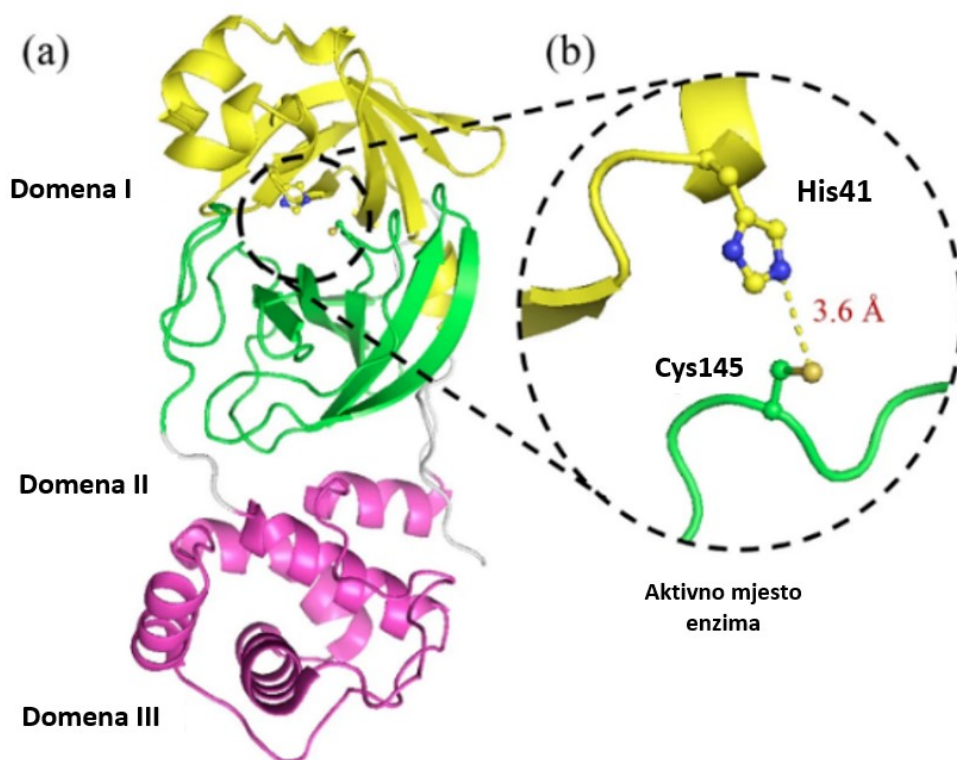
Koronavirusi su u pravilu podložni ekstenzivnoj mutagenezi, međutim ključni proteini ostaju konzervirani jer bi mutacije u tom području mogle biti pogubne za virus (Goyal i Goyal, 2020). Činjenica da SARS-CoV 2 3CLpro dijeli 96% identiteta s SARS-CoV 3CLpro potvrđuje

da se radi o veoma konzerviranom enzimu koji nije sklon mutacijama te s tog gledišta 3CLpro predstavlja privlačnu metu za razvoj antivirusnih lijekova protiv SARS-CoV-2, ali i budućih varijanti koronavirusa (Abian i sur., 2020; Guijarro-Real i sur., 2021; Novak i sur., 2021).

SARS-CoV-2 3CLpro je homodimer, čiji protomeri sadrže 306 aminokiselinskih ostataka, sastoje od tri domene (I, II, III) koje čine 9 alfa uzvojnica i 13 beta nabranih ploča (Slika 3.). Domene I (ostaci 8-101) i II (ostaci 102-184) tvori 6 antiparalelnih beta nabranih ploča i 4 kratke alfe uzvojnice. Dugačka fleksibilna petlja (ostaci 185-200), koja se sastoji od svežnja 5 alfa uzvojnica, povezuje domenu III (ostaci 201-306) s domenom II. Aminokiselinski ostaci 1-7 na *N*-terminalnom kraju tvore strukturu nazvanu „*N*-finger“ koja ima značajnu ulogu u dimerizaciji enzima nužnoj za enzimsku aktivnost proteina (Novak i sur., 2021a; Novak i sur., 2021b). Dimerizacija se odvija na način da „*N*-finger“ struktura jednog monomera ostvaruje interakcije s Glu166 drugog monomera, pri čemu se postavlja pravilna orijentacija mjesta vezanja supstrata (Goyal i Goyal, 2020).

Mjesto vezanja supstrata sastavljeno je od džepova P1, P1', P2 i P3. Mjesto P1 sastavljeno je od aminokiselinskih ostataka Phe140, Asn142, Glu166, His163 i His172 i dvije molekule vode. Mjesto P2 čini dubok džep sastavljen od ostataka His41, Met49, Tyr54, Met165 i Asp187, dok P3 čini Leu168 kojemu su bočno pozicionirani Glu166, Pro168 i Gly170 (Jin i sur., 2020). Aktivno mjesto enzima nalazi se u rascjepu između domena I i II, a aminokiseline His41 i Cys145 čine veoma konzerviranu katalitičku dijadu (Slika 3.) koja proteolitički cijepa virusni poliprotein na 11 određenih mjesta (Anand i sur., 2003).

Inhibicija aktivnosti 3CLpro može zaustaviti replikaciju virusa, a s obzirom na to da nije zabilježena niti jedna ljudska proteaza koja ima isti obrazac cijepanja, malo je vjerojatno da bi inhibitori tog enzima imali toksičan učinak na organizam (Goyal i Goyal, 2020).



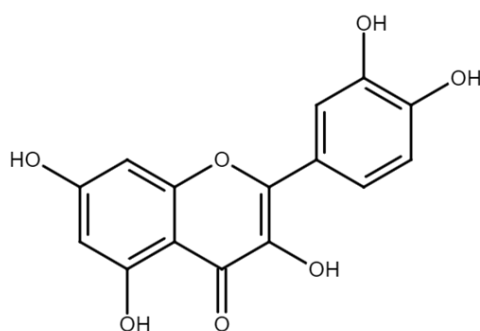
Slika 3. Kristalna struktura SARS-CoV-2 3CLpro. (a) Prikaz strukturnih domena enzima. Domena I obojena je žuto, domena II zeleno, a domena III ljubičasto. Aktivno mjesto enzima nalazi se u procjepu između domena I i II. (b) Prikaz katalitičke dijade enzima koju čine aminokiseline His41 i Cys145 međusobno udaljene 3,6 Å (preuzeto i prilagođeno prema Ferreira i Rabeh, (2020) uz dopuštenje izdavača).

1.8. Antivirusno djelovanje spojeva iz prirode

Razvoj virusne rezistencije predstavlja velik izazov u razvoju novih i djelotvornih antivirusnih lijekova. Najčešće se radi o sintetskim spojevima koji djeluju samo na jednu metu odnosno ciljaju jednu virusnu molekulu, pri čemu se virusi podvrgavaju mutacijama kako bi izbjegli njihovo djelovanje. Iz tog razloga javlja se potreba za razvojem novih antivirusnih lijekova koji bi ciljali različite korake u replikacijskom ciklusu virusa (Kitazato i sur., 2007). Proteklih nekoliko godina u razvoju novih lijekova sve se više pažnje počinje pridavati spojevima iz prirode. Kod velikog broja fitokemijskih spojeva istražuje se antibakterijska, antivirusna, antioksidativna i citostatska aktivnost. Najčešće se radi o sekundarnim metabolitima biljaka kao što su flavonoidi, terpeni, lignani, tanini i alkaloidi (Swamy, 2020). Otkriveno je nekoliko stotina prirodnih aktivnih antivirusnih spojeva diljem svijeta, čiji se mehanizmi međusobno nadopunjuju i preklapaju, bilo da djeluju na ulazak virusa u stanicu,

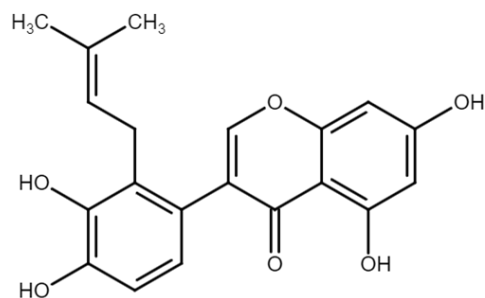
virusnu replikaciju ili sintezu virusnog genoma. Dodatno, bioaktivni prirodni spojevi su najčešće male molekule koje pokazuju dobra svojstva slična lijeku te se dobro apsorbiraju i metaboliziraju u organizmu. Samim time ukupni trošak proizvodnje takvog lijeka bio bi manji, a sve navedene karakteristike čine ih obećavajućim kandidatima u razvoju novih antivirusnih lijekova (Kitazato i sur., 2007). U nastavku poglavlja prikazani su rezultati nekoliko istraživanja inhibicijskog djelovanja prirodnih spojeva na SARS-CoV-2 3CLpro.

U istraživanju potencijalnih inhibitora SARS-CoV-2 3CLpro Abian i suradnici (2020) su *in vitro* probirom male baze od 150 spojeva, među kojima su se nalazili i odobreni lijekovi različitih terapijskih indikacija, došli do zaključka da kvercetin (Slika 4.), biljni pigment flavonoidne strukture, pokazuje relativno jak inhibitorski učinak na aktivnost 3CLpro. S obzirom na to da je farmakokinetika, odnosno ADMET profil kvercetina dobro poznat, mogao bi se uzeti u obzir kao potencijalni kandidat za razvoj lijeka.



Slika 4. Struktura kvercetina

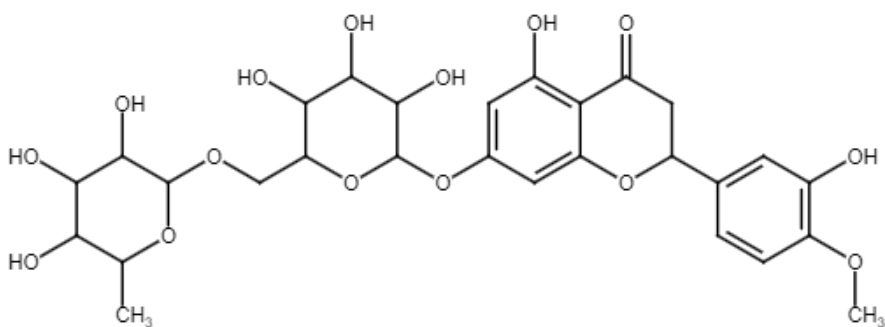
Istraživanje Tahir ul Quamara i suradnika (2020) pokazalo je kako u bazi ljekovitih biljaka, koja sadrži više od 32 000 potentnih antivirusnih spojeva i spojeva tradicionalne kineske medicine, postoje potencijalni kandidati za razvoj lijekova inhibitora 3CLpro. Izdvojili su 9 najpotentnijih spojeva, a najbolji rezultat molekuskog sidrenja pokazao je spoj 5,7,3',4'-tetrahidroksi-2'-(3,3-dimetillalil) izoflavon (Slika 5.) iz biljke *Psorothamnus arborescens*.



Slika 5. Struktura 5,7,3',4'-tetrahidroksi- 2'-(3,3-dimetillalil) izoflavona

Shree i suradnici (2022) su probirom ljekovitih biljaka ayurvedske medicine metodama molekuskog sidrenja i simulacije molekulske dinamike istaknuli inhibitorni potencijal 6 fitokemijskih spojeva iz biljki *Withania somnifera*, *Tinospora cordifolia* i *Ocimum snactum*, koji su, između ostalog, pokazali dobre farmakokinetičke karakteristike te netoksičnost, bitnih za razvoj lijeka.

Da su prirodni spojevi obećavajuća meta za razvoj inhibitora 3CLpro potvrđuje i istraživanje Mosquera-Yuquija i suradnika (2022), koji su molekulskim sidrenjem 92 fitokemijska spoja iz biljaka s područja Andi ustanovili da hesperidin (Slika 6.) pokazuje značajan inhibitorni učinak, kako na aktivnost 3CLpro, tako i na RNA ovisnu RNA polimerazu, pri čemu se otvara mogućnost razvoja lijeka s dvostrukim antivirusnim mehanizmom.

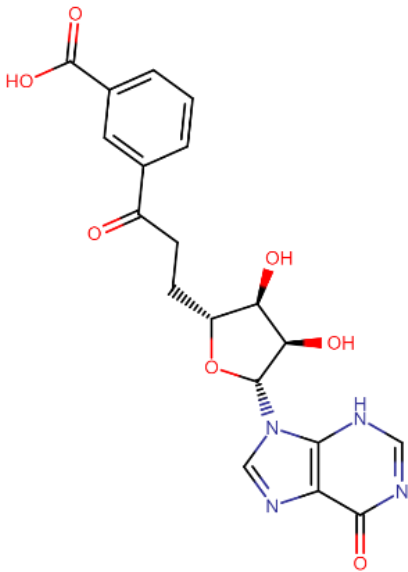


Slika 6. Struktura hesperidina

1.9. Inhibicijski potencijal futalozina

Novak i suradnici (2021a) proveli su istraživanje u potrazi za prirodnim inhibitorom SARS-CoV-2 3CLpro koristeći se metodama virtualnog probira molekula, simulacije molekulske dinamike, molekuskog sidrenja te analize farmakokinetičkih parametara. Analizom dobivenih podataka ustanovili su da među više od 25 000 prirodnih mikrobnih spojeva najbolji omjer inhibicijskog učinka i farmakokinetičkog profila pokazuje futalozin (Tablica 2.), sekundarni metabolit izoliran iz roda *Streptomyces*. Osim što se dobro veže za aktivno mjesto enzima, pokazalo se da ostvaruje značajnu interakciju i s procjepom između domena II i III, što bi moglo značiti da bi futalozin mogao inhibirati 3CLpro dvostrukim mehanizmom djelovanja.

Tablica 2. *Struktura i karakteristike futalozina (struktura i informacije o podrijetlu preuzeti s mrežne stranice Natural Products Atlas - www.npatlas.org, molekulske karakteristike izračunate pomoću web platforme pkCSM - <http://biosig.unimelb.edu.au>)*

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
|  | Naziv spoja | <i>Futalozin</i> |
| | Molekulska formula | $C_{19}H_{18}N_4O_7$ |
| | Molekulska masa | 414,374 Da |
| | Podrijetlo | <i>Bakterijsko</i> |
| | Organizam iz kojeg je izoliran | <i>Streptomyces sp. MK359-NF1</i> |
| | LogP | 0,1001 |
| | Broj donora vodikovih veza | 4 |
| | Broj akceptora vodikovih veza | 9 |
| | Broj veza koje rotiraju | 6 |

Na temelju navedenih saznanja, u ovom istraživanju ispitat će se inhibicijski učinak derivata futalozina na SARS-CoV-2 3CLpro vezanjem za aktivno mjesto enzima.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Usljed stanja globalne pandemije COVID-19, koja traje već više od dvije godine, znanstvenici diljem svijeta pokušavaju stati na kraj širenju virusa ulažući napore u razvoj novih cjepiva i lijekova. S obzirom na to da je proces razvoja lijeka dugotrajan, sve se više pažnje pridaje prenamjeni postojećih lijekova i istraživanju poznatih spojeva, a uz pomoć brzih i pouzdanih računalnih algoritama, koji imaju sposobnost predviđanja interakcija, probir potencijalnih molekula kandidata nikad nije bio lakši.

Osim razvoja djelotvornog cjepiva, nužno je razviti i djelotvorne lijekove, s obzirom na to da postojeća cjepiva ne pružaju 100%-tnu zaštitu od razvoja COVID-19, pogotovo uslijed mutacija virusa i nastanka novih, zaraznijih varijanti SARS-CoV-2. Bitno je spomenuti i problem izloženosti osoba koje se ne mogu cijepiti, bilo da se radi o imunokompromitiranim osobama, djeci određenih dobnih skupina, osobama koje su alergične na neke od komponenti cjepiva i slično, zbog čega je potreba za razvojem dobrih antivirusnih lijekova još veća (<https://www.who.int>).

Temeljem dosadašnjih istraživanja poznato je da je 3CLpro koronavirusa veoma konzerviran enzim koji nije podložan mutacijama te čini jednu od ključnih komponenti u životnom ciklusu SARS-CoV-2. Sljedeći logičan korak bio bi nastojati razviti lijek koji bi inhibirao aktivnost tog enzima i na taj način spriječio daljnju replikaciju virusa. Inhibicijom virusne replikacije, mogao bi se spriječiti razvoj teže kliničke slike i posljedično smanjiti broj smrtnih ishoda.

Vodeći se dosadašnjim istraživanjima potencijalnih inhibitora 3CLpro te nastavno istraživanju Novaka i sur. (2021a), čiji su rezultati pokazali kako između više od 25 000 prirodnih mikrobnih spojeva najbolji omjer vezanja u aktivno mjesto enzima i farmakokinetičkih svojstva pokazuje futalozin; cilj ovog istraživanja je modificirati molekulu futalozina, dizajniranjem derivata na temelju strukture aktivnog mjesta 3CLpro koji bi se jače vezali te računalno ispitati njihov inhibitorni potencijal pomoću molekulskog sidrenja mjereći energije vezanja molekula.

3. MATERIJALI I METODE

Struktura SARS-CoV-2 3CLpro u ovom istraživanju je preuzeta iz rada Novaka i sur. (2021a), u kojem se struktura enzima s mrežne stranice „RCSB Protein Data Bank“ (www.rcsb.org; kod 6LU7) ručno provjerila i ispravila, te se enzim podvrgnuo energetske minimizaciji, nakon čega je bila provedena molekulska-dinamska simulacija od 900 ns. Nakon toga su bile utvrđene dvije različite konformacije slobodnog enzima, prisutne 86,7 % i 13,3 % vremena. Za potrebe ovog istraživanja je uzeta reprezentativna konformacija enzima SARS-CoV-2 3CLpro zastupljena 86,7 % vremena. Iz istog rada je preuzeta i početna struktura futalozina u pdb formatu (engl. *The Protein Data Bank file format*).

Modifikacije početne strukture futalozina (174 derivata) su napravljene ručno pomoću računalnog programa Chimera 1.16 (Pettersen i sur., 2004) i pohranjene u pdb formatu, nakon čega je bila korištena AutoDockTools `prepare_ligand4.py` skripta (Morris i sur., 2009) da bi se ligandi pripremili za sidrenje i pohranili u pdbqt formatu. Molekula receptora (3CLpro) je također pripremljena za sidrenje (svim atomima su pripisani Gasteigerovi naboji, nepolarni vodikovi atomi su stopljeni s pripadajućim ugljikovim atomima i određena je vrsta svim atomima) i pohranjena u pdbqt formatu. Molekulska sidrenja je provedeno u kutiji veličine $20 \times 25 \times 25 \text{ \AA}$, sa središtem na Cys145 S-atomu (koordinate 16,18, 59,05, 46,84), broj modova i iscrpnost pretraživanja (engl. *exhaustiveness*) su bili namješteni na 100, pomoću računalnog programa AutoDock Vina (Trott i Olson, 2009) na računalu Intel® Core™ i5-10310U CPU @1.70 GHz s 64-bitnim Windows 10 Pro operacijskim sustavom.

Nakon prvog kruga molekuskog sidrenja, uzeta je molekula s najnižom energijom vezanja, na temelju koje je onda predloženo dodatnih 200 derivata, uzimajući u obzir njezine interakcije s aktivnim mjesto 3CLpro enzima. Molekulska sidrenja tih derivata je provedeno s identičnim postavkama kao i sidrenje derivata iz prvog kruga.

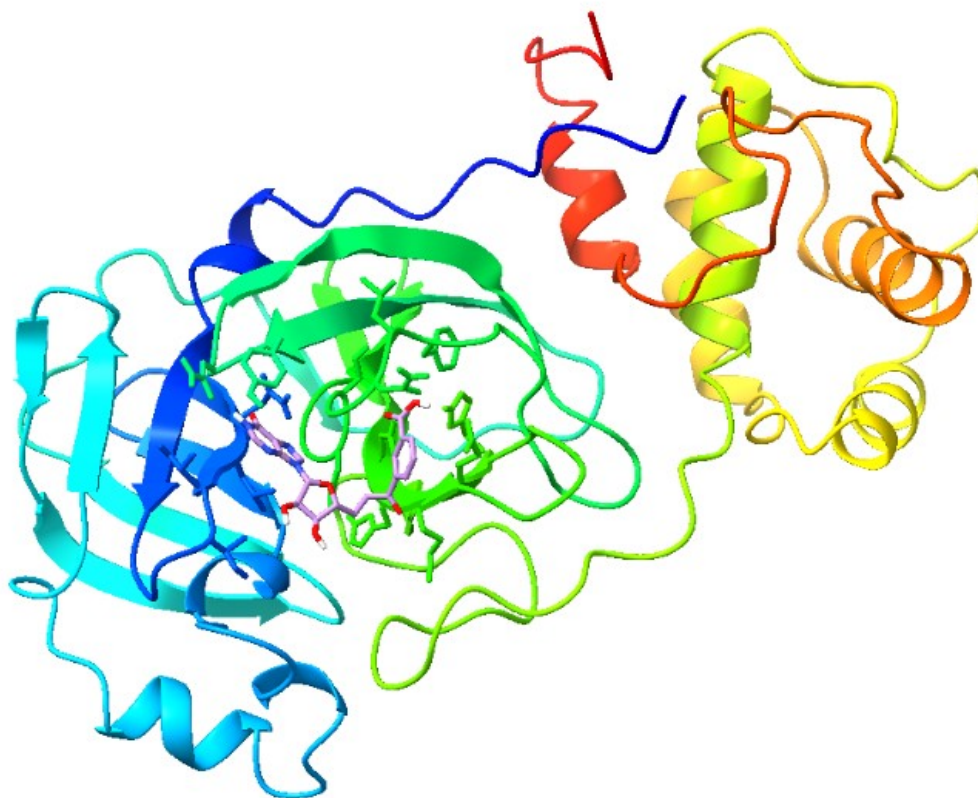
Broj i vrste interakcija između derivata od interesa i aktivnog mjesta 3CLpro (u nastavku protein 6LU7) analizirane su u računalnom programu Discovery Studio 2021 (BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio v21.1.020298, San Diego: Dassault Systemes, 2021). Vizualni prikazi kompleksa enzim-derivat su izrađeni uz pomoć programa UCSF ChimeraX v1.3 (2021-12-08), farmakokinetičke (ADMET) karakteristike molekula od interesa predviđene su pomoću web platforme pkCSM (Pires i sur., 2015), a statistički prikazi energija vezanja

liganada su napravljeni u programu R 3.6.2. (R Core Team, 2018) s „ggplot2“ knjižnicom, koristeći RStudio 1.2.5033 sučelje.

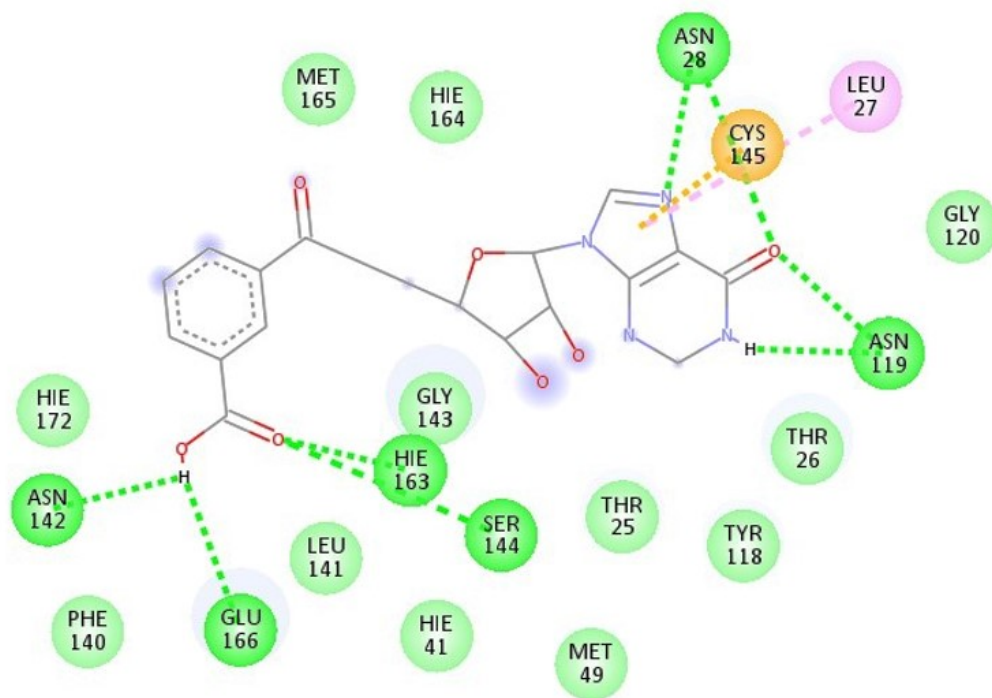
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati molekuskog sidrenja futalozina

Računalnom analizom vezanja liganda futalozina na aktivno mjesto proteina 6LU7 dobiveno je da energija vezanja iznosi $\Delta G = -7,4 \text{ kcal mol}^{-1}$. Molekula futalozina s proteinom ostvaruje 10 vodikovih veza, od kojih je jedna nekonvencionalna te dvije vrste π -interakcija. Struktura kompleksa futalozina s proteinom 6LU7 prikazana je na Slici 7, njihove interakcije na Slici 8, a duljine i vrste veza u Tablici 3.



Slika 7. *Strukturni prikaz kompleksa futalozina i proteina 6LU7 (izrađeno pomoću programa UCSF ChimeraX 1.3)*



Interakcije



Slika 8. 2D prikaz broja i vrsta interakcija između furalozina i aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu enzima (izrađeno pomoću programa Discovery Studio 2021).

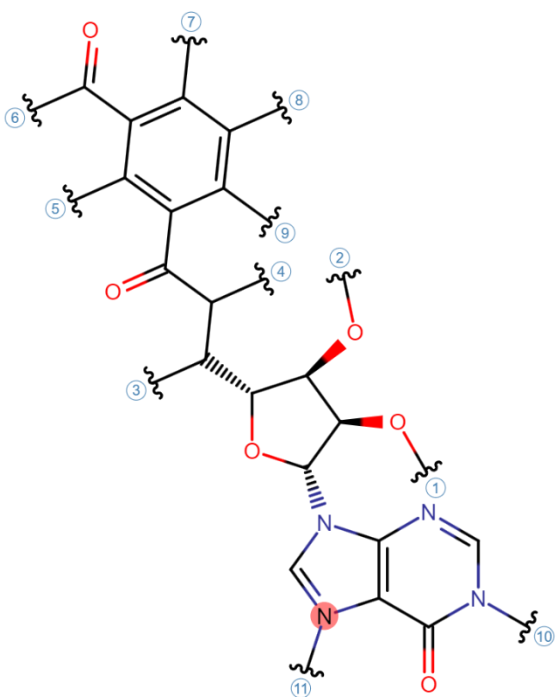
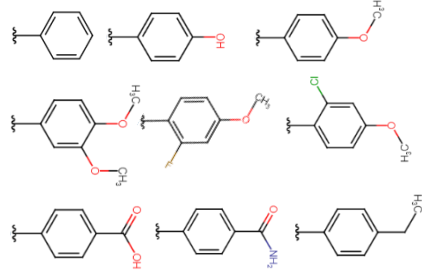
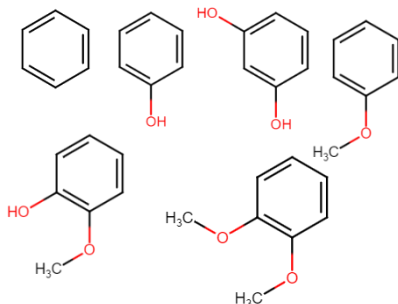
Tablica 3. Pregled aminokiselina s kojima furalozin ulazi u interakciju te vrste i duljine interakcija

| Aminokiselina | Vrsta veze | Duljina veze (Å) |
|---------------|--------------------------------|------------------|
| Leu27 | π -alkil | 4,74 |
| Asn28 | vodikova veza | 2,96 |
| Asn28 | vodikova veza | 2,87 |
| Asn28 | vodikova veza | 3,03 |
| Asn119 | vodikova veza | 2,41 |
| Asn119 | nekonvencionalna vodikova veza | 3,08 |
| Asn119 | vodikova veza | 2,02 |
| Asn142 | vodikova veza | 2,86 |
| Ser144 | vodikova veza | 2,82 |
| Cys145 | π -sumpor | 5,37 |
| His163 | vodikova veza | 2,51 |
| Glu166 | vodikova veza | 2,84 |

4.2. Modificiranje molekule futalozina

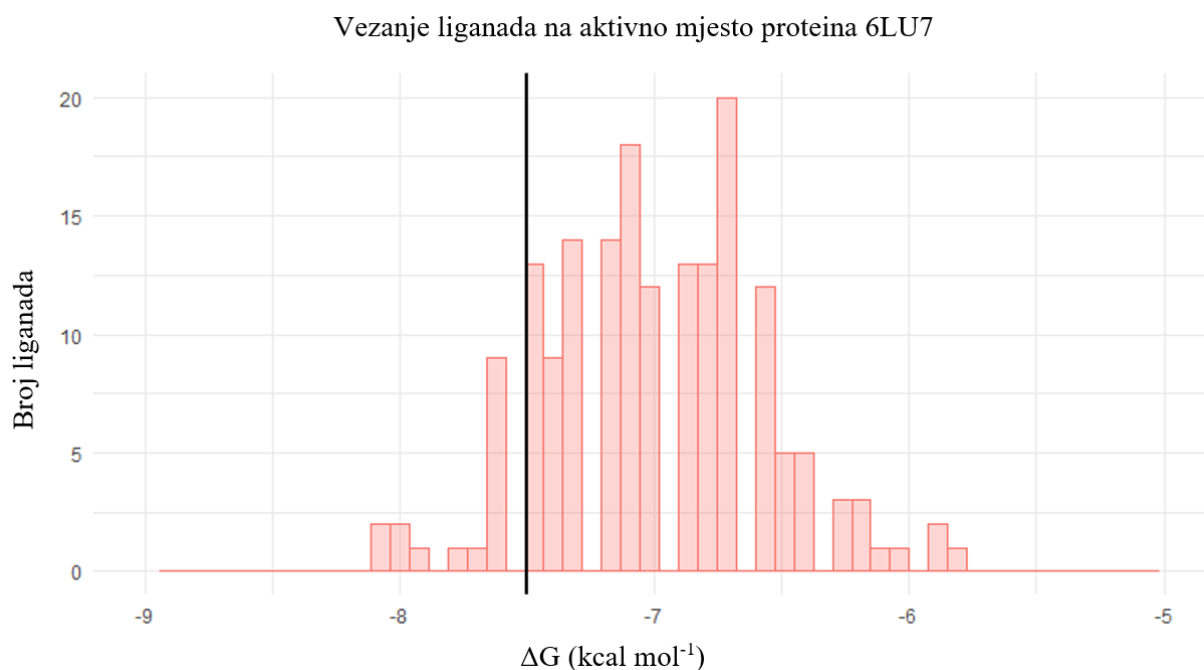
S obzirom na hidrofilnu, odnosno hidrofobnu prirodu aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu enzima, na strukturu futalozina dodani su različiti supstituenti. Za prvi krug molekuskog sidrenja dizajnirano je 174 derivata, a najčešća mjesta modifikacije i supstituenti navedeni su u Tablici 4.

Tablica 4. Prikaz strukture futalozina, mjesta modifikacije i najznačajnijih supstituenata

| Struktura futalozina i mjesta modifikacije | Mjesto modifikacije | Najznačajniji supstituenti |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | -R1/R2 | -CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , -CH ₂ CH ₂ COOH, -CH ₂ CH ₂ OH |
| | -R3 | -OH, -OCH ₃ , -OCH ₂ CH ₃ , -CONH ₂ ,  |
| | -R4 | -NH ₂ |
| | -R5 | -OH, -OCH ₃ |
| | -R6 | -NH ₂ , -NHCH ₃ |
| | -R7/R8/R9 | -OH, -OCH ₃  |
| | -R10/R11 | -CH ₃ |

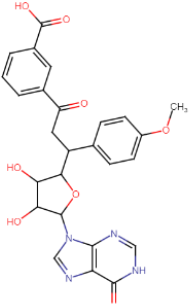
4.3. Rezultati prvog kruga molekuskog sidrenja

Rezultati molekuskog sidrenja pokazuju da svega 9% derivata ima nižu energiju vezanja od futalozina (Slika 9.), dok su dva najbolja derivata F41 i F42, čije energije vezanja iznose $\Delta G = -8,1$ kcal mol⁻¹ (Tablica 5.).



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti broja liganada (derivati futalozina) o energiji vezanja na aktivno mjesto proteina 6LU7. Crna linija prikazuje energiju vezanja futalozina ($\Delta G = -7,4$ kcal mol⁻¹). Ligandi lijevo od crne linije bolje se vežu na aktivno mjesto u odnosu na futalozin.

Tablica 5. Prikaz rezultata 10 najboljih derivata futalozina, njihove strukture, molekulske mase i energije vezanja

| Naziv i struktura liganda | M_w (Da) | ΔG (kcal mol ⁻¹) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------|
| F41  | 520,16 | -8,1 |

| | | | |
|------------|--|--------|------|
| F42 | | 534,18 | -8,1 |
| F39 | | 533,15 | -8,0 |
| F40 | | 506,14 | -8,0 |
| F46 | | 496,12 | -7,9 |
| F38 | | 534,14 | -7,8 |

| | | | |
|------|--|--------|------|
| F97 | | 514,18 | -7,7 |
| F116 | | 494,13 | -7,6 |
| F133 | | 524,15 | -7,6 |
| F148 | | 510,14 | -7,6 |

4.4. Modificiranje molekule F41

Molekula F41 je u dvije konformacije pokazala istu energiju vezanja, $\Delta G = -8,1$ kcal mol⁻¹, za razliku od molekule F42, koja tu istu energiju vezanja posjeduje samo u jednoj konformaciji. Iz tog razloga u daljnje istraživanje uzeta je molekula F41 te je po uzoru na nju dizajnirano 200 novih molekula koje su podvrgnute novom krugu molekuskog sidrenja, a najčešća mjesta modifikacije i supstituenti navedeni su u Tablici 6.

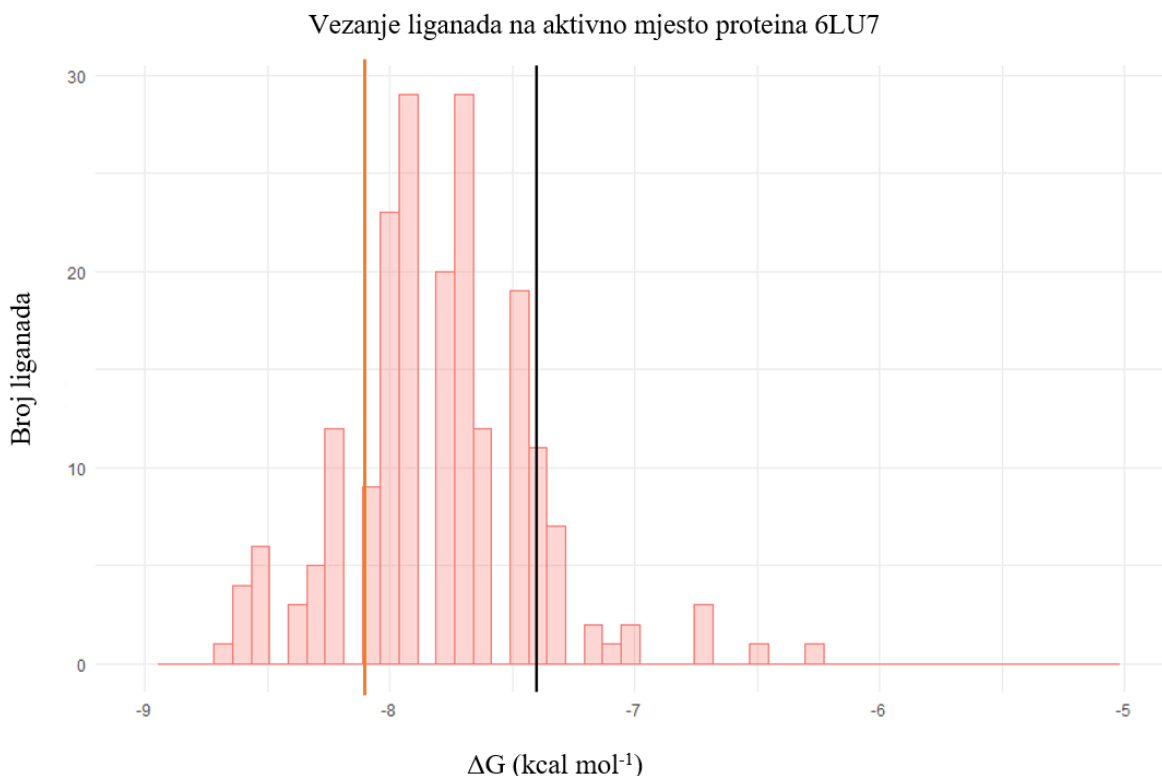
Tablica 6. Prikaz strukture liganda F41, mjesta modifikacije i najznačajnijih supstituenata

| Struktura liganda F41 s mjestima modifikacije | Mjesto modifikacije | Najznačajniji supstituenti | |
|-----------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| | -R1/R2 | -H, -CH ₃ | |
| | -R3/R4 | -F, -Cl, -OH | |
| | -R5/R6 | -OH, -OCH ₃ , -F, -Cl | |
| | -R7 | -NH ₂ , -CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ | |
| | -R8 | -OH, -OCH ₃ , -Cl | |
| | -R9 | -OH, -Cl, -F | |
| | -R10 | -OH, -OCH ₃ , -Cl | |
| | -R9,R10 | | |
| | -R11 | -NH ₂ | |
| | -R12 | -CH ₃ , -OH, -OCH ₃ , -OCH ₂ CH ₃ | |

Pri osmišljavanju novih derivata, najviše pažnje pridalo se popunjavanju hidrofilnih dijelova aktivnog mjesta, posebice u blizini aminokiselina Leu141, Asn142, His163 i Glu166, s obzirom na to da u tom dijelu enzima ima prostora za proširenje molekule. Najčešće su bile dodane aromatske ili cikličke strukture s proton donorima i/ili akceptorima, odnosno supstituentima koji mogu tvoriti vodikove veze. Metoksi skupina benzenskog prstena nije modificirana, s obzirom na to da se pokazala bitnom u vezanju za taj dio aktivnog mjesta, u blizini aminokiseline Tyr118.

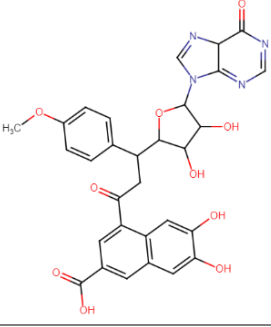
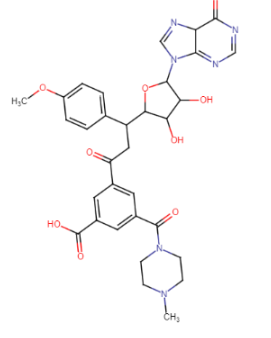
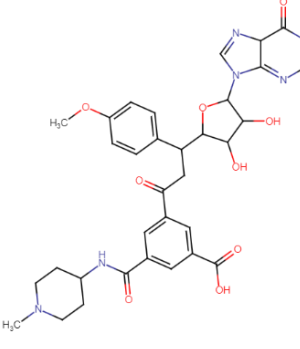
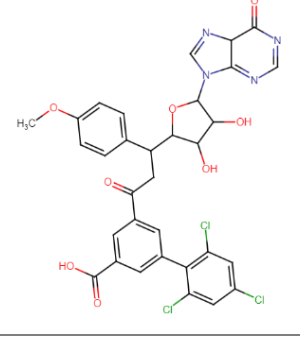
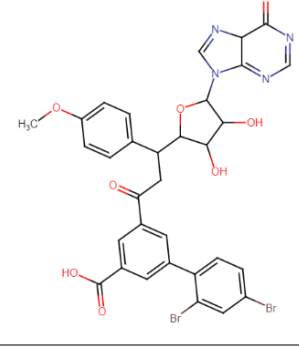
4.5. Rezultati drugog kruga molekuskog sidrenja

Analizom dobivenih rezultata molekuskog sidrenja 200 novih liganada pokazalo se da 86% liganada ima nižu energiju vezanja od početnog spoja futalozina, od kojih se 15,5% veže bolje u odnosu na temeljnu molekulu F41 (Slika 10.). Strukture i energije vezanja najboljih liganada iz drugog kruga prikazane su u Tablici 7.



Slika 10. Grafički prikaz ovisnosti broja liganada (derivati futalozina) o energiji vezanja na aktivno mjesto proteina 6LU7. Crna linija prikazuje energiju vezanja futalozina ($\Delta G = -7,4$ kcal mol⁻¹), a narančasta energiju vezanja molekule F41 ($\Delta G = -8,1$ kcal mol⁻¹). Ligandi lijevo od narančaste linije bolje se vežu na aktivno mjesto u odnosu na najbolji ligand iz prvog kruga molekuskog sidrenja.

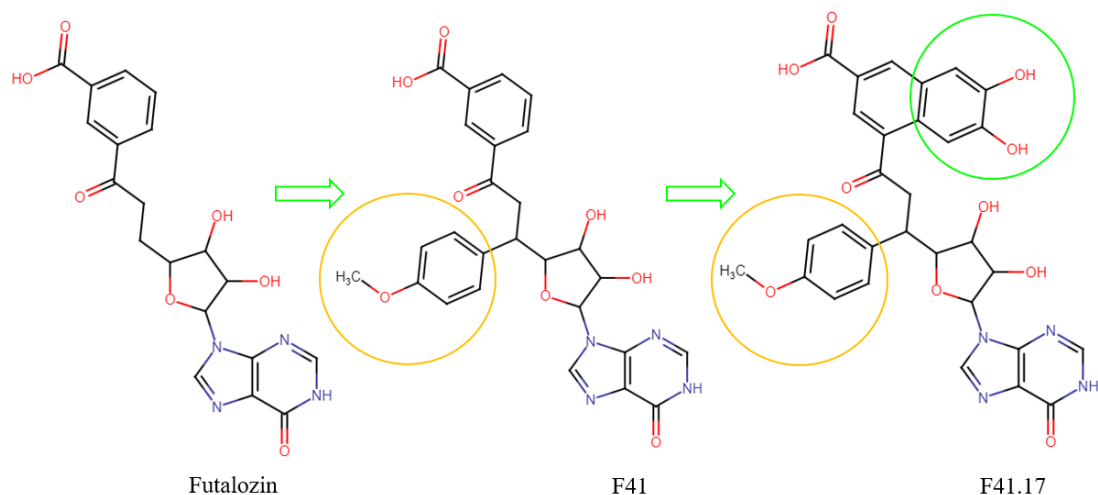
Tablica 7. Prikaz rezultata 5 najboljih derivata molekule F41, njihove strukture, molekulske mase i energije vezanja.

| Naziv i struktura liganda | M_w (Da) | ΔG (kcal mol ⁻¹) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------|
| <p data-bbox="292 432 371 465">F41.17</p>  | 604,57 | -8,7 |
| <p data-bbox="292 768 371 801">F41.46</p>  | 648,25 | -8,6 |
| <p data-bbox="292 1115 371 1149">F41.52</p>  | 662,27 | -8,6 |
| <p data-bbox="292 1473 371 1507">F41.71</p>  | 700,09 | -8,6 |
| <p data-bbox="292 1821 371 1854">F41.73</p>  | 754,03 | -8,6 |

4.6. Molekula F41.17

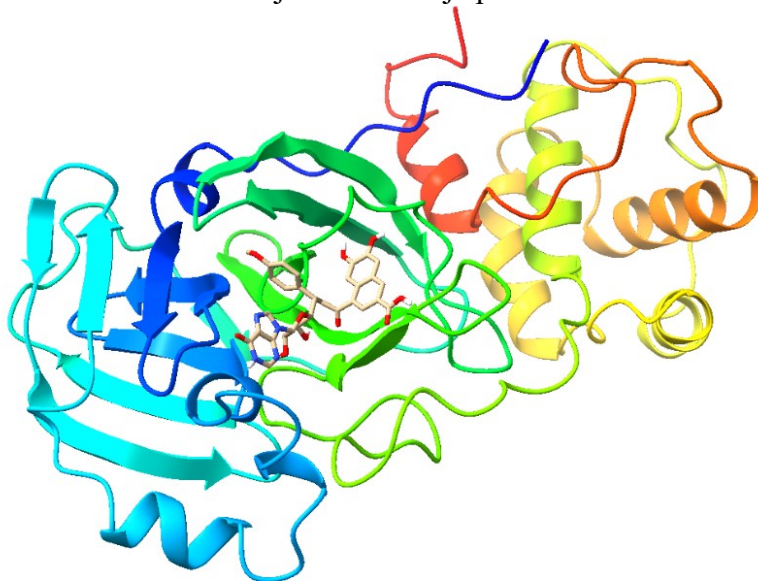
4.6.1. Struktura i smještaj

Rezultati računalnog sidrenja molekula pokazuju da od ukupno 374 derivata modificiranih po uzoru na fitalozin, najnižu energiju vezanja na aktivno mjesto proteina 6LU7, u iznosu od $\Delta G = -8,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ posjeduje molekula F41.17 (Slika 11.).



Slika 11. Razlika u strukturi molekule F41.17 u odnosu na fitalozin i molekulu F41.

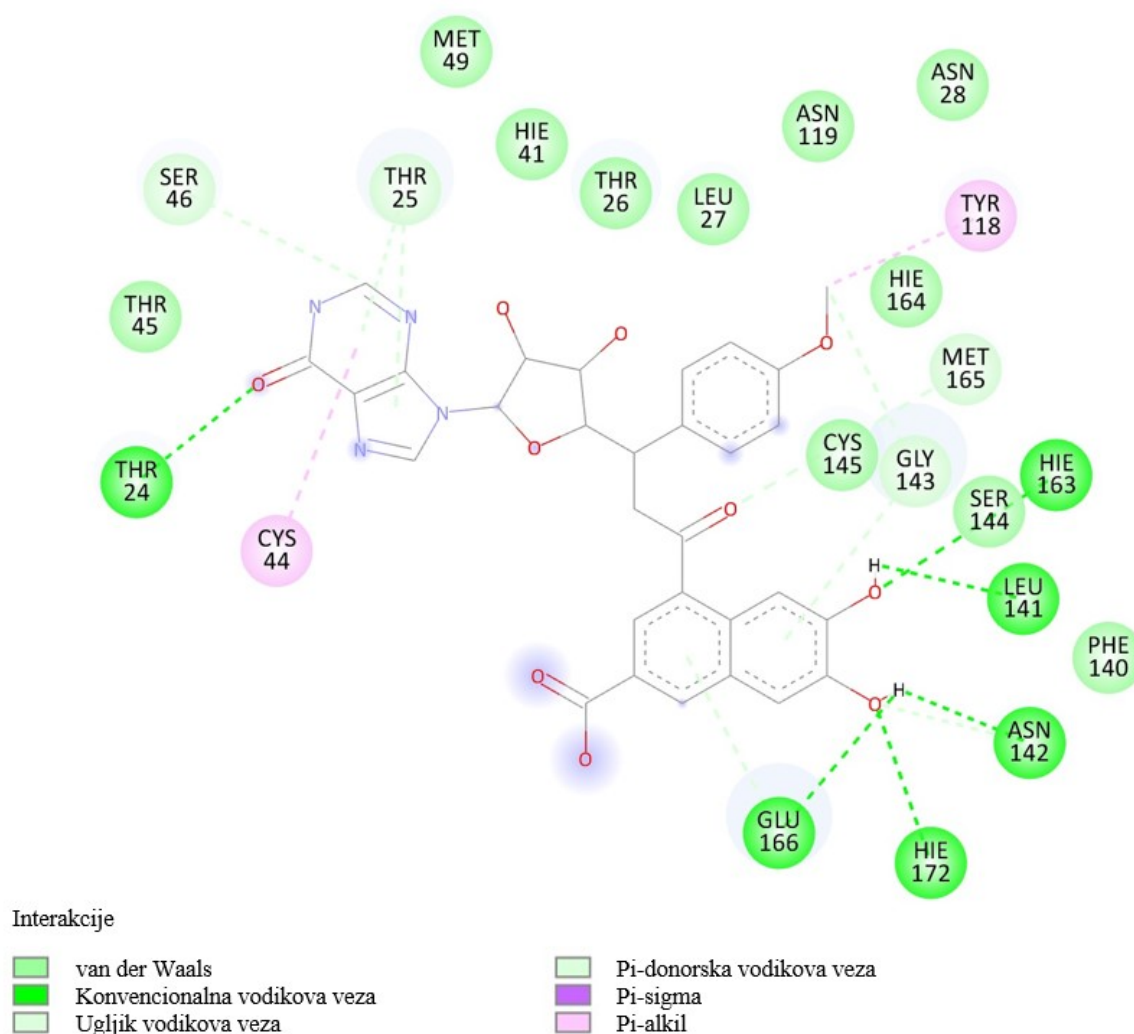
Naspram strukture fitalozina, odabrana molekula dodatno sadrži jedan benzenski prsten supstituiran metoksi skupinom u para položaju te drugi, koji kondenziran s benzojevom kiselinom tvori β -naftoličnu kiselinu, a koja je supstituirana dvjema hidroksi skupinama (Slika 11). Smještaj molekule u aktivnom mjestu enzima je prikazan na Slici 12.



Slika 12. Strukturni prikaz molekule F41.17 u kompleksu s proteinom 6LU7 (izrađeno pomoću programa UCSF ChimeraX 1.3).

4.6.2. Ligand-protein interakcije

Za razliku od fitalozina, molekula F41.17 s aminokiselinama aktivnog mjesta enzima ostvaruje više vrsta interakcija (Slika 13.). Osim 6 intermolekularnih vodikovih veza, tvori i jednu intramolekularnu, duljine 2,46 Å. Intramolekularna vodikova veza nalazi se između 4'-hidroksilne skupine tetrahidrofuran-diola i karbonilne skupine alkilnog lanca te vrlo vjerojatno doprinosi rigidnosti strukture i na taj način pogoduje stvaranju interakcija s aminokiselinama u blizini, stabilizirajući pritom protein-ligand kompleks. Također, zapažene su i 4 vodikove veze nekonvencionalnog tipa koje obuhvaćaju manje elektronegativne C-H veze kao proton donore te 4 π -donorske vodikove veze. Iako su te vodikove veze slabije od klasičnih, jer u njima sudjeluju manje elektronegativni proton donori (Alkorta i sur., 1998), one i dalje pridonose stabilizaciji strukture kompleksa protein-ligand. Vrste i duljine vodikovih veza navedene su u Tablici 8.



Slika 13. 2D prikaz broja i vrsta interakcija između molekule F41.17 i aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu enzima (izrađeno pomoću programa Discovery Studio 2021).

Tablica 8. Pregled aminokiselina s kojima molekula F41.17 tvori vodikove veze te vrste i duljine veza.

| Aminokiselina | Vrsta vodikove veze | Duljina veze (Å) |
|---------------|---------------------|------------------|
| Thr24 | konvencionalna | 3,10 |
| Thr25 | π -donorska | 2,17 |
| Thr25 | π -donorska | 2,75 |
| Ser46 | nekonvencionalna | 3,39 |
| Leu141 | konvencionalna | 2,14 |
| Asn142 | konvencionalna | 2,11 |
| Asn142 | nekonvencionalna | 3,24 |
| Gly143 | nekonvencionalna | 3,60 |
| Gly143 | π -donorska | 2,77 |
| His163 | konvencionalna | 2,84 |
| Met165 | nekonvencionalna | 3,58 |
| Glu166 | konvencionalna | 2,98 |
| Glu166 | π -donorska | 3,14 |
| His172 | konvencionalna | 3,24 |

Razmatrajući pojedinačni doprinos vodikovih veza ukupnoj energiji vezanja, na temelju duljine može se zaključiti o jačini interakcije. Jačinu vodikove veze određuju njezina duljina, kut vezanja i naboj pa je tako vodikova veza jača što je duljina veze kraća, naboj veći i kut bliži 180° (McRee, 1999; Herschlag i Pinney, 2018). Općenito se duljine vodikovih veza kreću između 2,7 i 3,3 Å, a najčešće iznose oko 3 Å (McRee, 1999). Jeffrey (1997.) definira jake vodikove kao one čija duljina iznosi 2,2-2,5 Å, dok su umjereno jake vodikove veze duljine 2,5-3,2 Å. Iz toga proizlazi da molekula F41.17 najjače interakcije s proteinom 6LU7 ostvaruje preko hidroksi skupina naftalenskog prstena s karbonilnim kisicima peptidne veze Leu141 odnosno amidne veze Asn142 te NH skupinom His163, a značajna je i interakcija π elektronskog oblaka hipoksantinskog prstena s hidroksi skupinom Thr25.

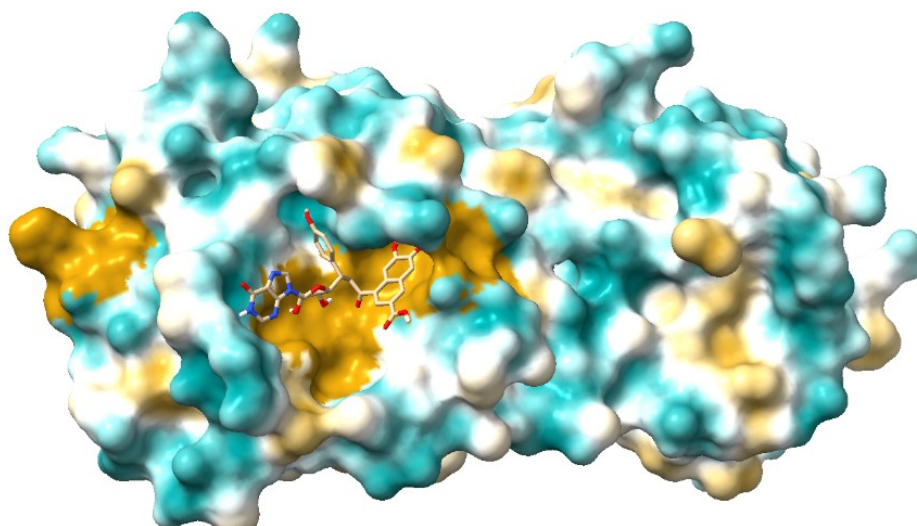
Što se tiče hidrofobnog doprinosa, molekula liganda i protein 6LU7 ostvaruju dvije vrste hidrofobnih interakcija: π -alkil i π -sigma, a zapažena je i π - π intramolekularna interakcija T-tipa molekule liganda. Hidrofobne interakcije, uz vodikove veze, doprinose stabilizaciji energetske favoriziranih liganada u kompleksu s aktivnim mjestom enzima, a smatraju se i glavnom pokretačkom silom za konformacijske promjene enzima nakon vezanja liganda (Patil i sur., 2010).

Opaženo je da ligand ne ostvaruje nekovalentne interakcije s aminokiselinama His41 i Cys145, za razliku od futalozina, gdje je zabilježena π -sumpor interakcija između elektronskog

oblaka imidazolskog prstena hipoksantina s atomom sumpora Cys145 koja doprinosi stabilizaciji kompleksa. Unatoč tome što ligand F41.17 ne ostvaruje interakcije s dvjema aminokiselinama koje su zaslužne za katalitičko djelovanje niti sadrži funkcionalne skupine tipično povezane s kovalentnom inhibicijom, njegovim bi se vezanjem u aktivno mjesto enzima potencijalno onemogućilo vezanje supstrata i posljedično proteazna aktivnost enzima.

4.6.3. Mogućnosti daljnje modifikacije

S obzirom na to da aktivno mjesto enzima sadrži hidrofilna područja (Slika 14.) gdje postoji još potencijalnih proton donora i akceptora, vezanje bi se moglo poboljšati dodavanjem polarnih funkcionalnih skupina, posebice modifikacijom naftalenskog prstena liganda supstituiranjem vodika hidroksilnim, tiolnim ili amino skupinama, benzenskog prstena supstituiranjem vodika hidroksilnim, tiolnim ili amino skupinama, supstituiranjem vodika naftalenskog i benzenskog prstena elektronegativnim elementom (F, Br, Cl) te modifikacijom karboksilne skupine naftalenskog prstena prevođenjem u amid i slično.



Slika 14. Prikaz hidrofilne/hidrofobne površine proteina 6LU7 u kompleksu s molekulom F41.17. Hidrofobna mjesta označena su žutom bojom, a hidrofilna plavom (izrađeno pomoću programa UCSF ChimeraX 1.3).

Uz hidrofobni dio proteina smješta se tetrahidrofuran-diolski prsten koji ne ostvaruje nikakve interakcije s tim dijelom molekule pa bi se umjesto diola mogle uvesti neke nepolarne alkiloksi skupine sa zasićenim i nezasićenim vezama koje bi mogle pojačati vezanje liganda.

4.6.4. Farmakokinetička predviđanja

Uzevši u obzir glavne molekulske deskriptore, molekula futalozina pokazuje veći stupanj sličnosti lijeku, ne kršeći pritom niti jedno Lipinskijevo pravilo (Tablica 9). Struktura molekule F41.17, iako kršenjem 3 Lipinskijeva pravila: molekulska masa (604,57 Da), broj donora (6) i akceptora (12) vodikove veze, ne bi predstavljala značajniji izazov u razvoju lijeka dobre oralne bioraspoloživosti i ADMET profila. Dapače, računalnim predviđanjem ADMET karakteristika koristeći „potpis molekule“ temeljen na teoriji grafa (engl. *graph-based signatures*), farmakokinetičke karakteristike molekule F41.17 vrlo su slične onima futalozina. Molekula F41.17 čak pokazuje veći stupanj intestinalne apsorpcije u odnosu na futalozin, te manju toksičnost. Zanimljivo je da se za obje molekule predviđa da nisu inhibitori P-glikoproteina, da ne prelaze krvno-moždanu barijeru te da nisu supstrati niti inhibitori najvažnijih CYP enzima, čime posjeduju poželjne karakteristike za razvoj lijeka (Tablica 9.)

Tablica 9. Usporedni prikaz strukturnih i ADMET karakteristika molekula futalozina i F41.17 (izračunato pomoću web platforme pkCSM - <http://biosig.unimelb.edu.au>).

| | Futalozin | F41.17 |
|----------------------------------------------|-----------|-----------|
| Molekulski deskriptor | | |
| Mw (Da) | 414,374 | 604,572 |
| LogP | 0,1001 | 1,1169 |
| Broj donora vodikovih veza | 4 | 6 |
| Broj akceptora vodikovih veza | 9 | 12 |
| Broj veza koje rotiraju | 6 | 8 |
| ADMET karakteristike | | |
| Intestinalna apsorpcija (%) | 32,938 | 39,316 |
| Supstrat P-gp | da | da |
| Inhibitor P-gp I/II | ne | ne |
| Volumen distribucije (L/kg) | 7,14 | 1,06 |
| Supstrat CYP2D6, 3A4, 1A2 | ne | ne |
| Inhibitor CYP1A2, 2C19, 2C9, 2D6, 3A4 | ne | ne |
| Ukupni klirens (mL/min/kg) | 3,61 | 2,44 |
| Hepatotoksičnost | ne | ne |
| Kožna preosjetljivost | ne | ne |
| Amesov test toksičnosti | negativan | negativan |
| Inhibitor hERG I/II | ne | ne |
| Akutna toksičnost na štakorima/LD50 (mol/kg) | 2,473 | 2,482 |

5. ZAKLJUČAK

Po uzoru na istraživanje Novaka i sur. (2021a) koje je pokazalo da molekula prirodnog mikrobnog spoja futalozina posjeduje inhibicijsko djelovanje na SARS-CoV-2 3CLpro, dizajnirano je ukupno 374 derivata futalozina koji su podvrgnuti visokoprotlačnom probiru putem molekuskog sidrenja na aktivno mjesto enzima 3CLpro.

Rezultati istraživanja pokazuju da:

- Molekula F41.17 u odnosu na ostale derivate ima najbolju energiju vezanja u iznosu od $\Delta G = -8,7 \text{ kcal mol}^{-1}$, što je za $1,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ manje u odnosu na ishodnu molekulu futalozina.
- Molekula F41.17 je, osim po energiji vezanja, bolja od molekule futalozina i po broju i vrsti interakcija koje ostvaruje s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima.
- Računalnim predviđanjem farmakokinetičkih karakteristika ADMET profil molekule F41.17 pokazao se istim ili boljim u odnosu na molekulu futalozina.

Zaključno, temeljem dobivenih rezultata, daljnja istraživanja inhibitornog učinka molekule F41.17 na SARS-CoV-2 3CLpro kao potencijalnog antivirusnog lijeka vrijedna su razmatranja.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

| | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2019-nCoV | 2019-novi koronavirus (engl. <i>2019-novel coronavirus</i>) |
| 3CLpro | 3-kimotripsinu slična proteaza (engl. <i>3-chymotrypsin-like protease</i>) |
| 6LU7 | kod kristalografske strukture 3CLpro monomera iz baze podataka RCSB Protein Data Bank |
| ACE2 | angiotenzin konvertirajući enzim 2 (engl. <i>angiotensin-converting enzyme 2</i>) |
| ADMET | apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, toksičnost |
| CDC | Američki centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. <i>Center for Disease Control and Prevention</i>) |
| COVID-19 | naziv za bolest koju uzrokuje virus SARS-CoV-2 (engl. <i>Coronavirus disease 2019</i>) |
| CYP | citokrom P450 |
| EMA | Europska agencija za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i>) |
| ERGIC | prijelazna vezikula endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata (engl. <i>ER-Golgi intermediate compartment</i>) |
| EUL | Popis upotrebe u hitnim slučajevima (engl. <i>Emergency Use Listing</i>) |
| FDA | Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>) |
| hERG | kalijev srčani kanal (engl. <i>human ether-à-go-go-related gene cardiac potassium channel</i>) |
| IL | interleukin |
| LD50 | koncentracija tvari, dana odjednom, koja uzrokuje smrt 50% ispitivanih laboratorijskih životinja (engl. <i>Lethal Dose</i>) |
| LogP | logaritam particijskog koeficijenta neke tvari između <i>n</i> -oktanola i fosfatnog pufera pH 7,4 |
| MERS-CoV | Koronavirus bliskoistočnog respiratornog sindroma (engl. <i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>) |
| M_w | molekulska masa (engl. <i>molecular weight</i>) |
| NSP | nestrukturni protein (engl. <i>non-structural protein</i>) |
| ORF | sekvenca RNA/DNA koja ne sadrži STOP kodon (engl. <i>open reading frame</i>) |
| pdb | računalni format datoteke (engl. <i>The Protein Data Bank file format</i>) |
| P-gp | P-glikoprotein |
| PLpro | papainu slična proteaza (engl. <i>papain-like protease</i>) |
| RBD | receptor-vezujuća domena (engl. <i>receptor binding domain</i>) |

| | |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RdRp | RNA ovisna RNA polimeraza (engl. <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>) |
| RTC | replikacijsko-transkripcijski kompleks (engl. <i>replication-transcription complex</i>) |
| RT-PCR | metoda lančane reakcije polimeraze pomoću reverzne transkriptaze (engl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>) |
| SARS-CoV | Koronavirus teškog akutnog respiratornog sindroma (engl. <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>) |
| SARS-CoV-2 | Drugi koronavirus teškog akutnog respiratornog sindroma (engl. <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>) |
| sgRNA | subgenomska RNA molekula (engl. <i>subgenomic RNA</i>) |
| ssRNA | jednolančana RNA molekula (engl. <i>single strain RNA</i>) |
| TMPRSS2 | transmembranska serinska proteaza 2 (engl. <i>Transmembrane Serine Protease 2</i>) |
| TNF- α | faktor nekroze tumora alfa (engl. <i>Tumour Necrosis Factor alpha</i>) |
| WHO | Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>) |

7. LITERATURA

- Abian O, Ortega-Alarcon D, Jimenez-Alesanco A, Ceballos-Laita L, Vega S, Reyburn H, Rizzuti B, Velazquez-Campoy A. Structural stability of SARS-CoV-2 3CLpro and identification of quercetin as an inhibitor by experimental screening. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 164, 1693–1703.
- Alanagreh L, Alzoughool F, Atoum M. The human coronavirus disease covid-19: Its origin, characteristics, and insights into potential drugs and its mechanisms. *Pathogens*, 2020, 9(5), 331-342.
- Alkorta I, Rozas I, Elguero J. Non-conventional hydrogen bonds. *Chem. Soc.Rev.*, 1998, 27(2), 163-170.
- AlMalki FA, Albukhaty S, Alyamani AA, Khalaf MN, Thomas S. The relevant information about the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) using the five-question approach (when, where, what, why, and how) and its impact on the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2022 Feb 17, 1-25.
- Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus Main Proteinase (3CL pro) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs. *Science*, 2003, 300(5626), 1763–1767.
- Araf Y, Akter F, Tang YD, Fatemi R, Parvez MSA, Zheng C, Hossain MG. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *J. Med. Virol.*, 2022, 94(5), 1825–1832.
- Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis, *J. Med. Virol.*, 2020, 92(4), 418–423.
- Chung JY, Thone MN, Kwon YJ. COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2021, 170, 1–25.

- Cjepivo Comirnaty. Sažetak opisa svojstava lijeka, dostupno na: <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 3.5.2022.
- Cjepivo Jcovden. Sažetak opisa svojstava lijeka, dostupno na: <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 3.5.2022.
- Cjepivo Nuvaxovid. Sažetak opisa svojstava lijeka, dostupno na: <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 3.5.2022.
- Cjepivo Spikevax. Sažetak opisa svojstava lijeka, dostupno na: <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 3.5.2022.
- Cjepivo Vaxzevria. Sažetak opisa svojstava lijeka, dostupno na: <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 3.5.2022.
- Coronavirus disease (COVID-19), World Health Organisation, dostupno na: <https://www.who.int>, pristupljeno 2.5.2022.
- COVID-19 Global Map, Coronavirus resource center, dostupno na: <https://coronavirus.jhu.edu>, pristupljeno 2.5.2022.
- COVID-19 treatments, European medicines agency, dostupno na: <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 6.5.2022.
- Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomedica*, 2020, 91(1), 157–160.
- EUA 046 Veklury (remdesivir) FS for HCPs, Food and Drug Administration, dostupno na: <https://www.fda.gov>, pristupljeno: 5.5.2022.
- Ferreira JC, Rabeh WM. Biochemical and biophysical characterization of the main protease, 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro) from the novel coronavirus SARS-CoV 2. *Sci. Rep.*, 2020, 10(1), 22200.
- Ghildiyal R, Prakash V, Chaudhary VK, Gupta V, Gabrani R. Phytochemicals as Antiviral Agents: Recent Updates. U: *Plant-derived Bioactives: Production, Properties and Therapeutic Applications*. Swamy MK, urednik, Springer Singapore, 2020, str. 279-295.

- Goyal B, Goyal D. Targeting the Dimerization of the Main Protease of Coronaviruses: A Potential Broad-Spectrum Therapeutic Strategy. *ACS Combinatorial Science*, 2020, 22(6), 297–305.
- Guijarro-Real C, Plazas M, Rodríguez-Burruezo A, Prohens J, Fita A. Potential In Vitro Inhibition of Selected Plant Extracts against SARS-CoV-2 Chymotrypsin-Like Protease (3CLPro) Activity. *Foods*, 2021, 10(7), 1503.
- Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.*, 2020, 41(12), 1100–1115.
- Herschlag D, Pinney MM. Hydrogen Bonds: Simple after All?. *Biochemistry*, 2018, 57(24), 3338–3352.
- Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2021, 93(1), 250–256.
- Informacije o odobrenim cjepivima, Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode, dostupno na: <https://www.halmed.hr>, pristupljeno 3.5.2022.
- Jeffrey GA. An introduction to Hydrogen Bonding. Oxford University Press, 1997, str.20-62.
- 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 LW, 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(7811), 289–293.
- Jukič M, Škrlj B, Tomšič G, Pleško S, Podlipnik Č, Bren U. Prioritisation of Compounds for 3CLpro Inhibitor Development on SARS-CoV-2 Variants. *Molecules*, 2021, 26(10), 3003.
- Kitazato K, Wang Y, Kobayashi N. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. *Drug Discov Ther.*, 2007, 1(1), 14–22.
- Lebeau G, Vagner D, Frumence É, Ah-Pine F, Guillot X, Nobécourt E, Raffray L, Gasque P.

- Deciphering SARS-CoV-2 Virologic and Immunologic Features. *Int J Mol Sci.*, 2020, 21(16), 5932.
- McRee DE. Computational techniques, U: Practical Protein Crystallography. McRee DE, urednik, Elsevier, 1999, str. 91–270.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009, 30(16), 2785-91.
- Mosquera-Yuqui F, Lopez-Guerra N, Moncayo-Palacio EA. Targeting the 3CLpro and RdRp of SARS-CoV-2 with phytochemicals from medicinal plants of the Andean Region: molecular docking and molecular dynamics simulations. *J Biomol Struct Dyn.*, 2022, 40(5), 2010–2023.
- Novak J, Rimac H, Kandagalla S, Grishina MA, Potemkin VA. Can natural products stop the SARS-CoV-2 virus? A docking and molecular dynamics study of a natural product database. *Future Med Chem.*, 2021, 13(4), 363–378.
- Novak J, Rimac H, Kandagalla S, Pathak P, Naumovich V, Grishina M, Potemkin V. Proposition of a new allosteric binding site for potential SARS-CoV-2 3CL protease inhibitors by utilizing molecular dynamics simulations and ensemble docking. *J Biomol Struct Dyn*, 2021, 1–14.
- Patil R, Das S, Stanley A, Yadav L, Sudhakar A, Varma AK. Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing. *PLoS One*, 2010, 5(8), e12029.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.*, 2004, 25(13), 1605–1612.
- Pires DE, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem.*, 2015, 58(9), 4066-4072.

Pitanja i odgovori o bolesti uzrokovanoj novim koronavirusom, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, dostupno na: <https://www.hzjz.hr>, pristupljeno 2.5.2022.

Rahman S, Montero MTV, Rowe K, Kirton R, Kunik F Jr. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2021, 14(5), 601–621.

Raman R, Patel KJ, Ranjan K. Covid-19: Unmasking emerging sars-cov-2 variants, vaccines and therapeutic strategies. *Biomolecules*, 2021, 11(7), 993-1022.

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria:Vienna, Austria 2018.

Rehman SU, Rehman SU, Yoo HH. COVID-19 challenges and its therapeutics. *Biomed Pharmacoter.*, 2021, 14, 112015.

del Rio C, Omer SB, Malani PN. Winter of Omicron—The Evolving COVID-19 Pandemic. *JAMA*, 2022, 327(4), 319-320.

Shree P, Mishra P, Selvaraj C, Singh SK, Chaube R, Garg N, Tripathi YB. Targeting COVID-19 (SARS-CoV-2) main protease through active phytochemicals of ayurvedic medicinal plants – *Withania somnifera* (Ashwagandha), *Tinospora cordifolia* (Giloy) and *Ocimum sanctum* (Tulsi) – a molecular docking study. *J Biomol Struct Dyn*, 2022, 40(1), 190–203.

Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process, guidance document. Dostupno na: https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status_of_COVID-19_Vaccines_within_WHO_EUL-PQ_evaluation_process-16June2021_Final.pdf, pristupljeno 3.5.2022.

Struktura i karakteristike futalozina, dostupno na: www.npatlas.org.

Tahir Ul Qamar M, Alqahtani SM, Alamri MA, Chen LL. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *J Pharm Anal.*, 2020, 10(4), 313–319.

- Tran BM, Deliyannis G, Hachani A, Earnest L, Torresi J, Vincan E. Organoid Models of SARS-CoV-2 Infection: What Have We Learned about COVID-19?. *Organoids*, 2022, 1(1), 2–27.
- Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.*, 2010, 31(2), 455-61.
- Vaccines for COVID-19, Centers for Disease Control and Prevention. Dostupno na: <https://www.cdc.gov>, pristupljeno 3.5.2022.
- Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *Int J Infect Dis.*, 2020, 94, 44–48.
- Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, Zhong W, Hao P. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(3), 457–460.
- Yi Y, Lagniton PNP, Ye S, Li E, Xu RH. COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. *Int J Biol Sci.*, 2020, 16(10), 1753–1766.

8. SAŽETAK

Globalna pandemija COVID-19, koju je uzrokovao patogen SARS-CoV-2, u više od 2 godine odnijela je 6 200 000 života te zarazila pola milijarde ljudi diljem svijeta. Unatoč naporima svjetskih zdravstvenih vlasti, broj umrlih od te bolesti i dalje se svakodnevno bilježi i to u peteroznamenkastim iznosima. U namjeri da se pandemija okonča, znanstvenici se intenzivno bave razvojem učinkovitog antivirusnog lijeka. SARS-CoV-2 3CL proteaza pokazala se privlačnom metom u razvoju prikladnog inhibitora posjedujući sličnosti s dobro istraženim 3CL proteazama drugih koronavirusa. S obzirom na to da igra ključnu ulogu u generiranju nestrukturnih proteina bitnih za virusnu replikaciju, smatra se jednim od najbitnijih enzima odgovornih za virulenciju SARS-CoV-2. U prijašnjim istraživanjima futalozin se istaknuo kao prikladni kandidat za razvoj inhibitora SARS-CoV-2 3CLpro, pokazujući značajan inhibitorni učinak, ali i dobre strukturne i ADMET karakteristike poželjne kod razvoja lijeka. Vodeći se navedenim saznanjima, u ovom istraživanju metodom molekuskog sidrenja ispitivao se inhibitorni učinak ukupno 374 molekula, dizajniranih po uzoru na futalozin te prilagođenih prirodi aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu enzima. Rezultati istraživanja pokazuju da molekula F41.17 od svih ispitivanih molekula posjeduje najbolji inhibitorni učinak na SARS-CoV-2 3CLpro. Energija vezanja F41.17 iznosi $\Delta G = -8,7$ kcal mol⁻¹ što je za 1,3 kcal mol⁻¹ niže u odnosu na energiju vezanja futalozina, a osim što tvori više interakcija s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima, pokazalo se da posjeduje jednake farmakokinetičke značajke kao i futalozin, ako ne i bolje. Sve navedene karakteristike molekule F41.17 čine ju kandidatom vrijednim razmatranja u daljnjem razvoju inhibitora SARS-CoV-2 3CLpro.

8. SUMMARY

The outbreak of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has claimed 6 200 000 lives and infected half billion people worldwide in more than two years. Despite the efforts of world's health authorities, number of deaths from this disease is still recorded in tens of thousands on a daily basis. In an effort to end the pandemic, scientists are working intensively to develop effective antiviral drugs. SARS-CoV-2 3CL protease has shown to bear similarities to well-researched 3CL proteases of other coronaviruses and presents an attractive target in the development of suitable protease inhibitors. Furthermore, 3CLpro is considered to be one of the most important enzymes responsible for SARS-CoV-2 virulence because it plays a key role in generating nonstructural proteins that are essential in viral replication. In previous studies, futasine proved to be a potential candidate for development of SARS-CoV-2 3CLpro inhibitors, showing not only a significant inhibitory effect, but also good structural and ADMET characteristics that are preferable in drug development. Based on these findings, in this study the inhibitory effect of a total of 374 molecules was investigated by molecular docking. The molecules were designed on the model of futasine and adapted to the nature of amino acid residues in the active site of the enzyme. The results of the study show that the F41.17 molecule has the best inhibitory effect on SARS-CoV-2 3CLpro among all 374 candidates. The binding energy to the active site of enzyme is $\Delta G = -8,7 \text{ kcal mol}^{-1}$, which is 1,3 kcal mol^{-1} lower than the binding energy of futasine. In addition, the F41.17 molecule has shown to make more interactions with amino acids in the active site of the enzyme and also has equal pharmacokinetic features as futasine, if not better. All these characteristics of the F41.17 molecule make it a candidate worth considering in further development of the SARS-CoV-2 3CLpro inhibitors.

Ispitivanje inhibitornog učinka derivata futalozina na SARS-CoV-2 3CLpro metodom molekuskog sidrenja

Antonija Nucak

SAŽETAK

Globalna pandemija COVID-19, koju je uzrokovao patogen SARS-CoV-2, u više od 2 godine odnijela je 6 200 000 života te zarazila pola milijarde ljudi diljem svijeta. Unatoč naporima svjetskih zdravstvenih vlasti, broj umrlih od te bolesti i dalje se svakodnevno bilježi i to u peteroznamenastim iznosima. U namjeri da se pandemija okonča, znanstvenici se intenzivno bave razvojem učinkovitog antivirusnog lijeka. SARS-CoV-2 3CL proteaza pokazala se privlačnom metodom u razvoju prikladnog inhibitora posjedujući sličnosti s dobro istraženim 3CL proteazama drugih koronavirusa. S obzirom na to da igra ključnu ulogu u generiranju nestrukturnih proteina bitnih za virusnu replikaciju, smatra se jednim od najbitnijih enzima odgovornih za virulenciju SARS-CoV-2. U prijašnjim istraživanjima futalozin se istaknuo kao prikladan kandidat za razvoj inhibitora SARS-CoV-2 3CLpro, pokazujući značajan inhibitorni učinak, ali i dobre strukturne i ADMET karakteristike poželjne kod razvoja lijeka. Vodeći se navedenim saznanjima, u ovom istraživanju metodom molekuskog sidrenja ispitivao se inhibitorni učinak ukupno 374 molekula, dizajniranih po uzoru na futalozin te prilagođenih prirodi aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu enzima. Rezultati istraživanja pokazuju da molekula F41.17 od svih ispitivanih molekula posjeduje najbolji inhibitorni učinak na SARS-CoV-2 3CLpro. Energija vezanja F41.17 iznosi $\Delta G = -8,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ što je za $1,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ niže u odnosu na energiju vezanja futalozina, a osim što tvori više interakcija s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima, pokazalo se da posjeduje jednake farmakokinetičke značajke kao i futalozin, ako ne i bolje. Sve navedene karakteristike molekule F41.17 čine ju kandidatom vrijednim razmatranja u daljnjem razvoju inhibitora SARS-CoV-2 3CLpro.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 43 stranica, 14 grafičkih prikaza, 9 tablica i 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: SARS-CoV-2, COVID-19, 3CLpro, futalozin, molekuskog sidrenje

Mentor: **Dr. sc. Hrvoje Rimac**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Hrvoje Rimac**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Kristina Pavić, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Marijan Marijan, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

A molecular docking study of futasosine derivatives as potential SARS-CoV-2 3CLpro inhibitors

Antonija Nucak

SUMMARY

The outbreak of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has claimed 6 200 000 lives and infected half billion people worldwide in more than two years. Despite the efforts of world's health authorities, number of deaths from this disease is still recorded in tens of thousands on a daily basis. In an effort to end the pandemic, scientists are working intensively to develop effective antiviral drugs. SARS-CoV-2 3CL protease has shown to bear similarities to well-researched 3CL proteases of other coronaviruses and presents an attractive target in the development of suitable protease inhibitors. Furthermore, 3CLpro is considered to be one of the most important enzymes responsible for SARS-CoV-2 virulence because it plays a key role in generating nonstructural proteins that are essential in viral replication. In previous studies, futasosine proved to be a potential candidate for development of SARS-CoV-2 3CLpro inhibitors, showing not only a significant inhibitory effect, but also good structural and ADMET characteristics that are preferable in drug development. Based on these findings, in this study the inhibitory effect of a total of 374 molecules was investigated by molecular docking. The molecules were designed on the model of futasosine and adapted to the nature of amino acid residues in the active site of the enzyme. The results of the study show that the F41.17 molecule has the best inhibitory effect on SARS-CoV-2 3CLpro among all 374 candidates. The binding energy to the active site of enzyme is $\Delta G = -8,7 \text{ kcal mol}^{-1}$, which is $1,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ lower than the binding energy of futasosine. In addition, the F41.17 molecule has shown to make more interactions with amino acids in the active site of the enzyme and also has equal pharmacokinetic features as futasosine, if not better. All these characteristics of the F41.17 molecule make it a candidate worth considering in further development of the SARS-CoV-2 3CLpro inhibitors.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 43 pages, 14 figures, 9 tables and 55 references. Original is in Croatian language.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, 3CLpro, futasosine, molecular docking

Mentor: **Hrvoje Rimac, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Hrvoje Rimac, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina Pavić, Ph.D. *Postdoktorand*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijan Marijan, Ph.D. *Postdoktorand*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.