УДК 577.1, 616-074
№ державної реєстрації 0121U111736
Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, тел: 239-31-25

ЗАТВЕРДЖУЮ
Перший проректор
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
професор _____ Володимир ІЛЬЧЕНКО
«17» грудня 2021 р.

ЗВІТ

про науково-дослідну роботу

за договором від «09» листопада 2020 р. № 213/01.2020

від «06» травня 2021 р. № 136/01/0480

Хіміко-генетичний підхід до вивчення наслідків пригнічення ACE-2 як фармакологічної моделі побічних ефектів COVID-19 в нервовій, кишковій, серцево-судинній системах та системі гемостазу (реєстраційний номер 2020.01/0480)

грантова підтримка Національного фонду досліджень України у межах конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»

(остаточний)

Науковий керівник НДР
Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії, д.х.н., професор _____ Сергій РЯБУХІН
(підпис)

(дата)

2021

Результати роботи розглянуто Науково-технічною радою Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
протокол №10 від 09.12.2021 р.

д.х.н., професор, завідувач кафедри супрамолекулярної хімії Інституту високих технологій		**Рябухін Сергій Вікторович** (вступ, розділи 1, 2, 3, 4 висновки)
д.х.н., професор кафедри супрамолекулярної хімії Інституту високих технологій		**Волочнюк Дмитро Михайлович** (вступ, розділи 2, 3, 4, 5, висновки)
д.б.н., професор кафедри супрамолекулярної хімії Інституту високих технологій		**Толстанова Ганна Миколаївна** (вступ, розділи 2, 5, висновки)
к.х.н., доцент кафедри супрамолекулярної хімії Інституту високих технологій		**Грабчук Галина Петрівна** (вступ, розділи 3, 4)
д.мед.н., провідний науковий співробітник, професор		**Соловйов Анатолій Іванович** (вступ, розділ 6, висновки)
к.б.н., науковий співробітник		**Довбинчук Таїса Володимирівна** (розділ 5, експериментальні дані)
к.х.н., науковий співробітник		**Мороз Юрій Сергійович** (розділ 2, 4 експериментальні дані, висновки)
к.х.н., науковий співробітник		**Бориско Петро Олександрович** (розділ 3, 4 експериментальні дані, висновки)
к.х.н., молодший науковий співробітник		**Пащенко Олександр Євгенійович** (розділ 1, 2, 4 планування експерименту, експериментальні дані)

к.х.н., молодший науковий співробітник		**Субота Андрій Іванович** (розділ 1, 4 експериментальні дані)
к.б.н., науковий співробітник		**Паршиков Олександр Вікторович** (розділ 6, експериментальні дані)
Інженер, аспірант		**Оксюта Олександр В'ячеславович** (розділ 2 експериментальні дані)
Інженер, студент		**Авраменко Микола Миколайович** (розділ 1, 4 експериментальні дані)
Інженер, студент		**Македон Єлизавета Сергіївна** (розділ 5 експериментальні дані)

Звіт про НДР: 59 с., 24 рис., 6 таблиць; 29 джерел.

Об'єкт дослідження: ACE2 та його роль в розповсюдженні та наслідках COVID-19, хімічні сполуки потенційні селективні інгібітори ACE2.

Мета роботи: Розробити та перевірити фармакологічну модель для вивчення побічних ефектів COVID-19 на основі хіміко-генетичного підходу до відключення каталітичної активності ACE2. Створити набір низькомолекулярних хімічних зондів для інгібування ACE2. Дослідити роль ACE2 шляхом хімічно індукованого відключення останнього як фармакологічної моделі побічних ефектів COVID-19 у нервовій, кишковій, серцево-судинній системах та системі гемостазу. Створити профайл для розроблених хімічних зондів.

Методи дослідження: органічний синтез, хемоінформатичний аналіз, *in silico* скринінг, молекулярний докінг, молекулярна механіка, *in vitro* скринінг, *in vivo* скринінг, флуоресцентний аналіз, цитотоксичний/цитостатичний скринінг, статистичний аналіз.

Розроблена фармакологічна модель для дослідження наслідків хімічно викликаного відключення ACE2, що використана для дослідження побічних ефектів спричинених COVID-19. Синтезовано шість потенційних інгібіторів ACE2 з відомою активністю. Для чотирьох з них визначена оптимальна сольова та оптимізовані умови отримання в мультиграмових кількостях. На основі побудованих докінгових моделей винайдено набори сполук лідерів з бази доступних стокових сполук (Enamine DB) та бази віртуальних сполук (RDB). За результатами докінгу проведено in vitro скринінг. Подано заявки на розміщення трьох хімічних зондів на Chemical Probe Portal (https://www.chemicalprobes.org/). Проведено комплексні дослідження ролі ACE2 шляхом хімічно індукованого відключення останнього як фармакологічної моделі побічних ефектів COVID-19 у нервовій, кишковій, серцево-судинній системах та системі гемостазу. Доведена роль ACE2 в появі довготривалих наслідків COVID-19 в нервовій та кишковій системах. Досліджено вплив інгубування на серцево-судинній системах та системі гемостазу. Отримані результати є важливою стартовою точкою подальших досліджень.

Ключові слова: ОРГАНІЧНИЙ СИНТЕЗ, МЕДИЧНА ХІМІЯ, ХЕМОІНФОРМАТИКА, МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ, IN SILICO СКРИНІНГ, IN VITRO СКРИНІНГ, IN VIVO СКРИНІНГ, СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ.

ABSTRACT

SRW report: 59 pages, 24 figures, 6 tables; 29 references.

Objects of the research: ACE2 and its role in the distribution and effects of COVID-19, chemical compounds potentially selective inhibitors of ACE2.

Aims: To develop and test a pharmacological model to study the side effects of COVID-19 based on a chemical-genetic approach for inhibiting ACE2 activity. To generate a set of low molecular weight chemical probes for inhibiting ACE2. To investigate the role of ACE2 by chemically induced disabling of the latter as a pharmacological model of COVID-19 side effects in the nervous, intestinal, cardiovascular and hemostasis systems. Create a profile for developed chemical probes.

Research methods: organic synthesis, chemoinformatics, *in silico* screening, molecular docking, molecular mechanics, *in vivo* screening, *in vivo* screening, fluorescence analysis, cytotoxic/cytostatic screening, statistics.

A pharmacological model for discovering the consequences of chemically induced ACE2 shutdown has been developed. It has been used to investigate the side effects caused by COVID-19. Six potential ACE2 inhibitors with declared activity have been synthesized. The optimal salt-form and optimized synthetic procedure for multigram scale producing were determined for four of them. Sets of leading compounds from the database of available stock compounds (Enamine DB) and the database of virtual compounds (RDB) were invented based on the elaborated docking models. According to the results of docking, in vitro screening was performed. Applications have been submitted for the placement of three chemical probes on the Chemical Probe Portal (https://www.chemicalprobes.org/). A comprehensive study of the role of ACE2 by chemically induced disabling of the latter as a pharmacological model of side effects of COVID-19 in the nervous, intestinal, cardiovascular and hemostasis systems was performed. The role of ACE2 in the long-term effects of COVID-19 in the nervous and intestinal systems has been proven. The effect of inhibition on the cardiovascular system and hemostasis system has been studied. The obtained results are an important starting point for further research.

Key words: ORGANIC SYNTHESIS, MEDICINAL CHEMISTRY, CHEMOINFORMATICS, MOLECULAR DOCKING, IN SILICO SCREENNING, IN VITRO SCREENNING, IN VIVO SCREENNING, STATISTICAL ANALYSIS.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ……...….**4**

РЕФЕРАТ (англійською мовою)……..……...….**5**

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ…….…….**7**

ВСТУП…….…...…….**8**

РОЗДІЛ 1. ВІДБІР ТА СИНТЕЗ СЕЛЕКТИВНИХ ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ ACE2 З ВІДОМОЮ АКТИВНІСТЮ……...…….....**11**

РОЗДІЛ 2. СТВОРЕННЯ ХІМІЧНОГО ПРОСТОРУ ТА ПОШУК НОВИХ СЕЛЕКТИВНИХ ІНГІБІТОРІВ ACE2……..…**18**

РОЗДІЛ 3. IN VITRO СКРИНІНГ ACE2 ІНГІБІТОРІВ З КОЛЕКЦІЙ КОМЕРЦІЙНО ДОСТУПНИХ СПОЛУК.…….……..…**32**

РОЗДІЛ 4. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ СПОЛУК – ІНГІБІТОРІВ ACE2 НА ІМОРТАЛІЗОВАНИХ КЛІТИНАХ МІКРОГЛІЇ BV-2 ТА КЛІТИНАХ ТОВСТОГО КИШЕЧНИКА CACO2.…….……..…**38**

РОЗДІЛ 5. ПЛАНУВАННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ СИНТЕЗУ СПОЛУК-ЛІДЕРІВ ОТРИМАНИХ В РЕЗУЛЬТАТІ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ.……...**45**

РОЗДІЛ 6. ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ СКОРОЧУВАЛЬНИХ РЕАКЦІЙ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ СУДИН НА ГУМОРАЛЬНУ СТИМУЛЯЦІЮ В УМОВАХ ДІЇ БЛОКАТОРІВ РЕЦЕПТОРІВ АНГІОТЕНЗИНУ…,,,,,,,,,,,,,,,,,,,...**50**

ВИСНОВКИ……..**55**

Публікації……...**56**

Перелік використаних джерел……..…...……...……..**57**

СЛОВНИК, СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАЧКИ

Хімічна генетика – це використання низькомолекулярних сполук для збудження біологічної системи та дослідження результатів цього ефекту. Методологія пошуку хімічних зондів також відноситься до хімічної генетики.

Хімічні зонди – хімічні речовини, що доповнюють використання інтерференції РНК (RNAi), зокрема, в змозі інгібувати конкретну функцію цільового білка, а не видаляти весь білок цілком. Це дозволяє запобігти системних побічних ефектів досягненням інгібування на конкретний час, а не назавжди. Підхід дає змогу наваго кращого контролю над рівнем і кінетикою інгібування.

SARS-CoV-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, одноланцюговий РНК-вмісний штам виду SARSr-CoV роду бетакоронавірусів.

ACE2 – Angiotensin I converting enzyme 2, білок, який кодується геном ACE2, розташованим у людини на Х-хромосомі.

РНК – рибонуклеїнова кислота.

COVID-19 – COronaVIrusDisease 2019, інфекційна хвороба викоикана вірусом SARS-CoV-2.

РАС – система ренін-ангіотензину.

Ang – ангіотензин.

ВСТУП

Не дивлячись на те, що з моменту виявлення у грудні 2019 року (Вухань, Хубей, Китай) гострого респіраторного синдрому коронавірусу-2 (SARS-CoV-2) пройшло майже 2 роки, а з моменту оголошення 11 березня 2020 року ВООЗ хворобу COVID-19, що викликана цим вірусом, глобальною пандемією – більш ніж півтора роки, механізми дії вірусу та причини уражень тих чи інших мішеней все ще залишаються не з'ясованими [1]. З іншого боку в науковій літературі з'являється усе більше підтверджень гіпотези, щодо визначною релі ACE2 в ураженні та розповсюдженні SARS-CoV-2 організмом людини та все більше науковці поділяють це припущення [2, 3]

SARS-CoV-2 потрапляє в клітини шляхом взаємодії S-білку вірусу з позаклітинним доменом трансмембранного ангіотензинового ферменту 2 (ACE2), знижуючи рівень ACE2 на поверхні клітини, шляхом інтерналізації. ACE2 широко експресується в ендотелії судин, дихальному епітелії, альвеолярних моноцитах, макрофагах, кишковому епітелії та нейронах. Кілька джерел підтвердили, що епітелій шлунково-кишкового тракту є другим основним місцем вірусної інвазії. Тест на вірусну РНК залишається позитивним в калі пацієнтів навіть після того, як результати випробувань на вірусну РНК в дихальних шляхах вже негативні. Це вказує на те, що вірусна інфекція шлунково-кишкового тракту та потенційна фекально-оральна передача можуть тривати навіть після виведення вірусу з дихальних шляхів [4, 5]. Клінічні дослідження показують, що діарея та інші розлади травлення спостерігаються приблизно в 50% випадків COVID-19 [6]. Постійно з'являються нові дані, що підтверджують проникнення SARS-CoV-2 в центральну нервову систему та, відповідно, розвиток неврологічних розладів [7]. Система гемостазу також є мішенню для SARS-CoV-2. Госпіталізовані пацієнти з COVID-19 з тяжкими респіраторними або системними розладами, мають підвищений ризик венозної тромбоемболії. Дані клінічних та лабораторних досліджень пацієнтів із COVID-19 свідчать про наявність у них тромбоцитопенії та синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові.

ACE2 – це цинк-вмісний ензим, розташований на поверхні ендотеліальних та інших клітин. Його відкриття в 2000 році призвело до концептуальних змін у розумінні принципів роботи системи ренін-ангіотензину (РАС). ACE2 – це

монокарбоксипептидаза, яка перетворює ангіотензин I (Ang I) у нонапептид Ang 1–9 та Ang II у гептапептид, Ang 1–7. Цей ферментативний шлях деградації Ang I та Ang II пригнічує активність РАС і, відповідно, зменшує шкідливі наслідки надмірного впливу Ang II на його рецептор AT1R. Також ACE2 проявляє незалежні від РАС функції: (i) регулює вбудовування у мембрану, експресію та активність транспортера нейтральних амінокислот SLC6A19 [8,9]; (ii) експресія антимікробних пептидів [7].

Незважаючи на важливу роль ACE2, значення якої підвищилося під час пандемії COVID-19, інструменти для дослідження ACE2 функцій дуже обмежені. Більшість даних про роль ACE2 є декларативними або ж теоретично-обґрунтованими без прямих експериментальних обґрунтувань. Усі наявні дані були одержані на генетично модифікованих моделях тваринах, з нокаутованим ACE2 в усьому організмі, або непрямим шляхом, за допомогою хімічно індукованої модуляції інших компонентів РАС, наприклад інгібування ACE чи блокування ангіотензинових або мінералокортикоїдних рецепторів [11].

Дані щодо використання хімічно-генетичних підходів у дослідженні ролі ACE2, шляхом прямого пригнічення каталітичної активності ACE2 є обмеженими. Це можна пояснити відсутністю низькомолекулярних хімічних зондів для ACE2. Єдиним комерційно доступним селективним інгібітором ACE2 є поліпептид DX600 (Ac-GDYSHCSPLRYPWKCTYPDPEGGG-NH2), який має серйозні обмеження для використання in vivo через невідповідний профіль ADME/DMPK параметрів [12].

Протягом нашого дослідження ми розв’язали наступні завдання.

Знайти різноманітні хемотипи, для представників яких існують посилання на селективну інгібуючу активність проти ACE2. Вибрати серед знайдених сполук ті, що з одного боку мають найбільш виражену активність, а з іншого є реальними для синтезу в масштабах 1-10 г. Синтезувати набір максимально різноманітних представників в заявлених кількостях. Визначити фізико-хімічні параметри (розчинность, хімічну стійкість, LogD/LogP, pKa) синтезованих обраних специфічних інгібіторів ACE2. Визначити оптимальні сольові форми для їх подальшого використання. (розділ 1)

Провести *in silico* скринінг потенційно активних сполук з новими хемотипами, використовуючи для цього раніше згенеровану, структуровану та проаналізовану нами ж базу комерційно доступних скринінгових сполук [13]. Ідентифікувати нові оптимізовані селективні інгібіторт ACE2 на основі хемотипів, що різняться від відомих за допомогою *in silico* скринінгу доступного хімічного простору. Тобто створити цей простір шляхом аналізу баз потенційно доступних речовин та проаналізувати на різних моделях використовуючи підходи докінгу. (розділ 2)

Зробити профілювання ADME/PK та валідацію “cell-free” за допомогою простого флюорометричного аналізу для обох ферментів у високопропускному форматі з використанням багатофункціональних зчитувачів зразків для набору синтезованих потенційних інгібіторів ACE2 серед обраних з хімічного простору. Винайти найбільш перспективні сполук шляхом in vitro скринінгу. (розділ 3,4)

Зробити валідацію на тканинах та визначення метаболічної стабільності в мікросомах, стабільності плазми; мікросомальної стабільності печінки; PAMPA, Caco-2, MDR1-MDCKII проникності та фармакокінетики отриманих сполук. (розділ 5)

Вивчити вплив тимчасового прямого відключення активності ACE2 на:

- хімічно- та електрично-стимульовану скоротливу активність гладких м’язів сегментів грудної аорти та внутрішньолегеневої артерії нормальних щурів та щурів з діабетом типу 2 та агрегацію/активацію тромбоцитів крові та екзоцитоз секреторних гранул; (розділ 6)

- функцію кишкового бар’єру, транспортну функцію епітелію, протизапальний ефект у нормальних щурів та за умов хімічно-індукованого запалення товстої кишки; (розділ 6)

- ключові особливості синаптичної нейропередачі в пресинаптичних нервових терміналах, а саме траспортер-опосередкований захват та вивільнення інгібіторних (гліцин, ГАМК) та збудливих (глутамат та аспартат) нейромедіаторів, мембранний потенціал та закислення синаптичних везикул (субвиконавець Інститут Біохімії ім. О.В. Палладіна).

Згенерувати профайл отриманих хімічних зондів відповідно до загальноприйнятих світових критеріїв, що висуваються до низькомолекулярних

хімічних зондів. Опублікувати розроблену та перевірену фармакологічну модель для вивчення побічних ефектів COVID-19 на основі хіміко-генетичного підходу до відключення каталітичної активності ACE2 у нервовій, кишковій, серцево-судинній системах та системі гемостазу. Оприлюднити інформацію про розроблені зонди та результати проекту на Chemical Probe Portal відповідно до рекомендацій NIH. (висновки)

ЗМІСТОВА ЧАСТИНА ЗВІТУ

РОЗДІЛ 1. ВІДБІР ТА СИНТЕЗ СЕЛЕКТИВНИХ ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ ACE2 З ВІДОМОЮ АКТИВНІСТЮ.

1.1. Підготовка реагентів та розчинників для проведення синтезу.

Розчинники очищали за стандартними процедурами [W. L. F. Armarego, C. Chai, Purification of Laboratory Chemicals, Elsevier: Oxford, 2003]. Доступні вихідні реагенти, що були в наявності, або були придбані в рамках проекту використовували без додаткової очистки.

1.2. Підтвердження структури та аналітичні дані отриманих сполук.

Температури топлення вимірювали на автоматичній системі MPA100 OptiMelt. Колонкову хроматографію проводили за допомогою Kieselgel Merck 60 (230–400 mesh) як стаціонарної фази. Спектри ЯМР ^{1}H, ^{13}C{^{1}H}, ^{31}P{^{1}H}, 19F{^{1}H} записували на спектрометрі Bruker 170 Avance 500 (при 500 МГц для ^{1}H ЯМР, 126 МГц для ^{13}C {1H} ЯМР, 202 МГц для ^{31}P{^{1}H} ЯМР, 263 МГц для ^{31}F{^{1}H} ЯМР) та Спектрометр Varian Unity Plus 400 (при 400 МГц для ^{1}H ЯМР, 101 МГц для ^{13}C {1H} ЯМР, 162 МГц для ^{31}P{^{1}H} ЯМР, 209 МГц для ^{31}F{^{1}H} ЯМР). Хімічні зсуви у спектрах ЯМР наводяться у м.ч. (за шкалою δ) від найменшого до найбільшого з використанням TMS у якості зовнішнього стандарту. Допускаються залишкові піки розчинників для ЯМР при 7,26 та 77,16 м.ч. для ^{1}H та ^{13}C{^{1}H} у $CDCl_3$ та 2,50 та 39,52 м.ч. для ^{1}H та ^{13}C{^{1}H} у ДМСО-d_6. Константи взаємодії (J) наведені в Гц. Спектри наводяться наступним чином: хімічний зсув (δ, м.ч.), кратність, інтегральна інтенсивність, константи J (Гц). Елементні аналізи були проведені в лабораторіях органічного аналізу Інституту органічної хімії НАН України. Мас - спектри записували на приладі Agilent 1100 LCMSD SL (хімічна іонізація).

1.3. Відбір молекул для синтезу.

Відправною точкою нашого дослідження став вибір молекул-кандидатів для побудови на їхній основі моделі пригнічення ACE2 рецептору, з метою їх подальшого використання для пошуку ефективних хімічних зондів. Задля реалізації цього задуму нами було проведено всебічний аналіз бази даних речовин з потенційною активністю проти ACE2 за допомогою платформи Reaxys Medcinal

Chemistry. В результаті такого аналізу було виявлено 392 сполуки з відомою, дослідженою активністю інгібування ACE2. Надалі ми застосували критерії відбору за значенням активності, а саме, нормалізованими величинами зв'язування лігандів з мішенями (pX) не менше восьми та селективності, а саме різниці між активністю ліганда проти ACE2 та ACE неменше ніж один порядок. Таким чином коло молекул-кандидатів було звужено до 59 сполук. Серед отриманого масиву сполук ми виявили три основні хемотипи, які відповідають одночасно критеріям активності та селективності (Рисунок 1.3.1) [14-16].

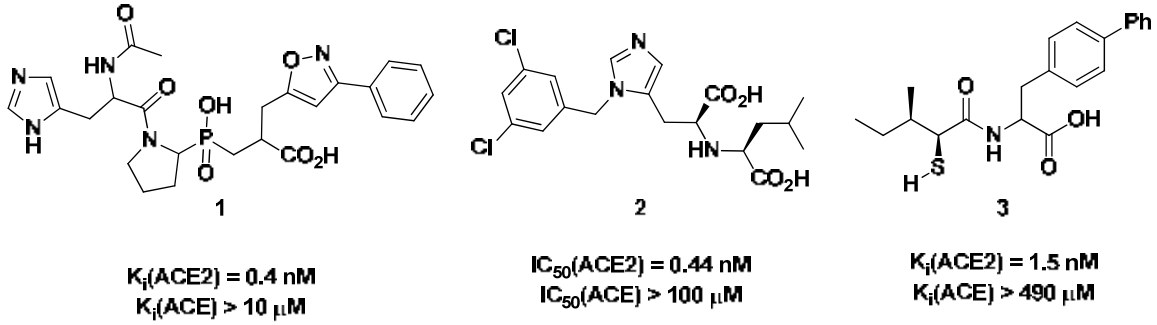


Рисунок 1.3.1 Представники основних хемотипів селективних інгібіторів ACE2 згідно з даними ReaxysMedcinalChemistry.

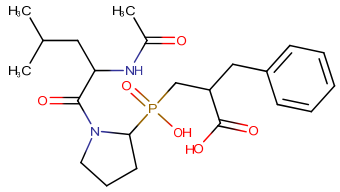
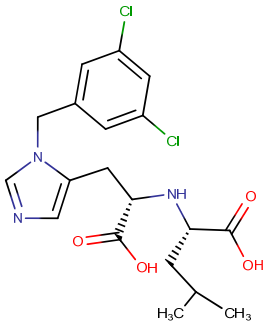
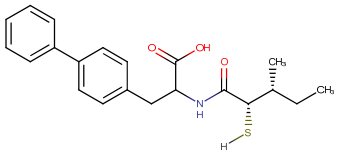
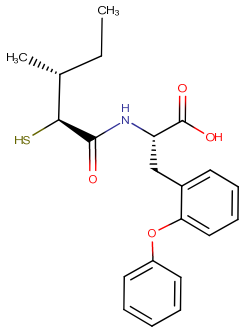
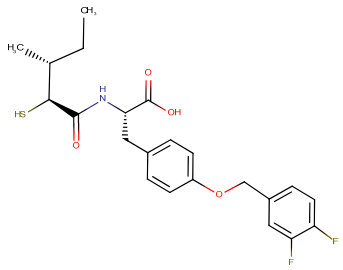
Саме з цих 3-х хемотипів ми обрали 10 речовин, що на наш погляд задовольняють усім критеріям щодо потенційних хімічних зондів. Це:

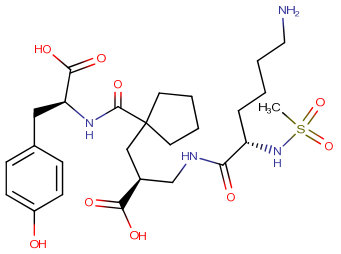
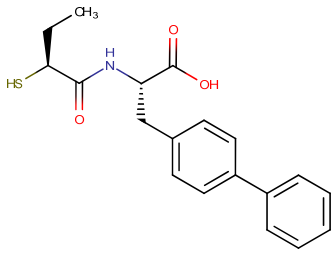
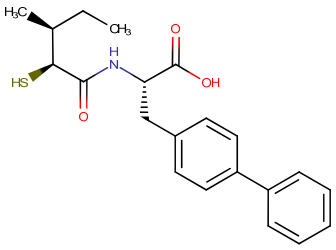
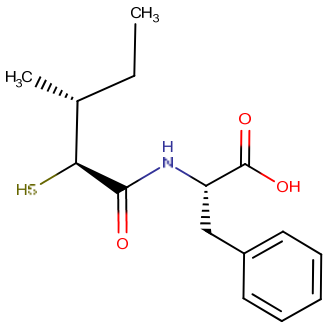
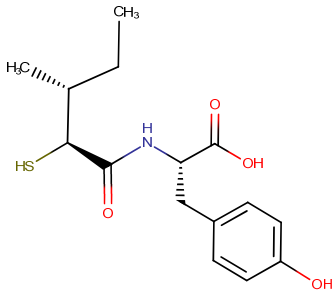
- синтетично доступні термодинамічно стабільні речовини,
- сполуки з інгібуючою активністю в наномолярних концентраціях,
- субстрати з високою селективністю по відношенню до ACE2 порівняно з ACE.

Як ми і очікували усі ці сполуки виявилися комерційно недоступними. Літературні відомості про їх отримання мали фрагментарний характер та описували лише синтез в аналітичних (кілька мг) кількостях, а їх використання в якості хімічних зондів взагалі не знайшло документального підтвердження (Таблиця 1.3.1).

Таблиця 1.3.1 Відомі молекули обрані для синтезу та подальшого використання в якості молекулярних зондів – селективних інгібіторів ACE2.

#	Структура	Молярна Маса	Формула	Px

I		452.49	$C_{22}H_{33}N_2O_6P$	9.80
II		428.31	$C_{19}H_{23}Cl_2N_3O_4$	9.30
III		371.50	$C_{21}H_{25}NO_3S$	8.80
IV		387.49	$C_{21}H_{25}NO_4S$	9.00
V		437.50	$C_{22}H_{25}F_2NO_4S$	9.00

VI		584.69	$C_{26}H_{40}N_4O_9S$	8.90
VII		343.44	$C_{19}H_{21}NO_3S$	8.80
VIII		371.50	$C_{21}H_{25}NO_3S$	8.80
IX		295.40	$C_{15}H_{21}NO_3S$	8.80
X		311.40	$C_{15}H_{21}NO_4S$	8.80

Тільки сполука **II** (GL1001) використовувалася *in vivo* як потенційний препарат для лікування експериментального виразкового коліту, але знову таки, не як

хімічний зонд для дослідження ACE2 [17]. Тому, виходячи з міркувань структурного різноманіття, значень активності та селективності нами було обрано саме ці 10 молекул для синтезу та використання в подальших біологічних дослідженнях. Варто зазначити, що сполука **I** в оригінальній роботі досліджувалася в вигляді суміші діастереомерів [16], що унеможливлює створення хімічного зонду безпосередньо на її основі. Тому ми плануємо спочатку також синтезувати **I** у вигляді суміші, але після первинної валідації активності хемотипу **I** синтезувати усі можливі діастереомери і дослідити їхню активність в індивідуальному енантіомерно чистому вигляді.

Нижче наведено обрані нами шляхи синтезу та методики за якими були отримані відповідні сполуки. Усі отримані сполуки охарактеризовані сучасними фізико-хімічними методами дослідження, структура їх доведена та підтверджена.

1.4. Сполуки **I** та **II**.

Сполука **I** після серії оптимізацій була синтезована у кількості 26,9 г (0,8+8,7+17,2) за схемою 1.4.1. у вигляді суміші усіх можливих енантіомерів (3 стереоцентри – 8 ізомерів). В рамках даного етапу нами було зроблено декілька спроб по розділенню цією суміші, включно з хіральною хроматографією, однак усі вони не дали потрібних результатів, тому було прийняте рішення тестувати отриману суміш з метою визначити чи є серед цієї суміші активні сполуки. [16]

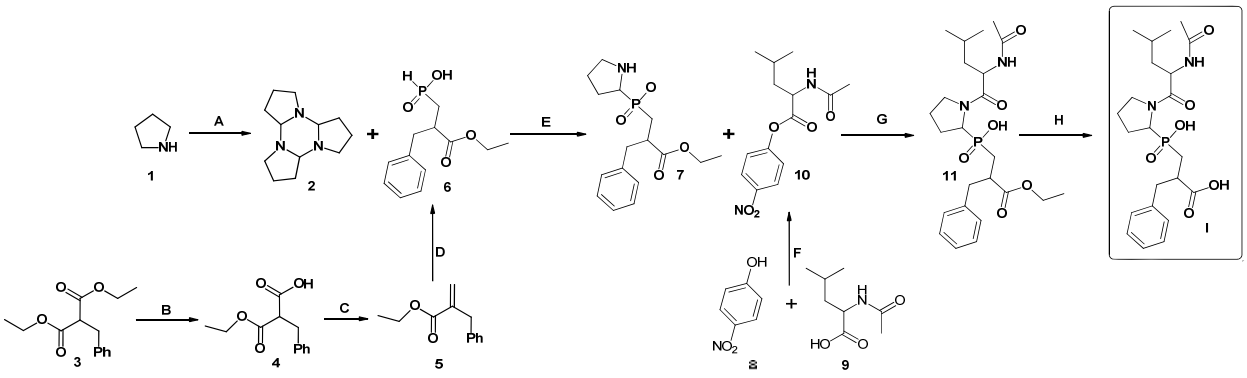


Схема 1.4.1. Синтетична схема синтезу сполуки **I**.

Оптимальною оптимізованою сольовою формую для неї виявилася вільна кислота.

Сполука **II** була синтезована за схемою 1.4.2. в кількості 19,6 г (1,4+4,2+14).

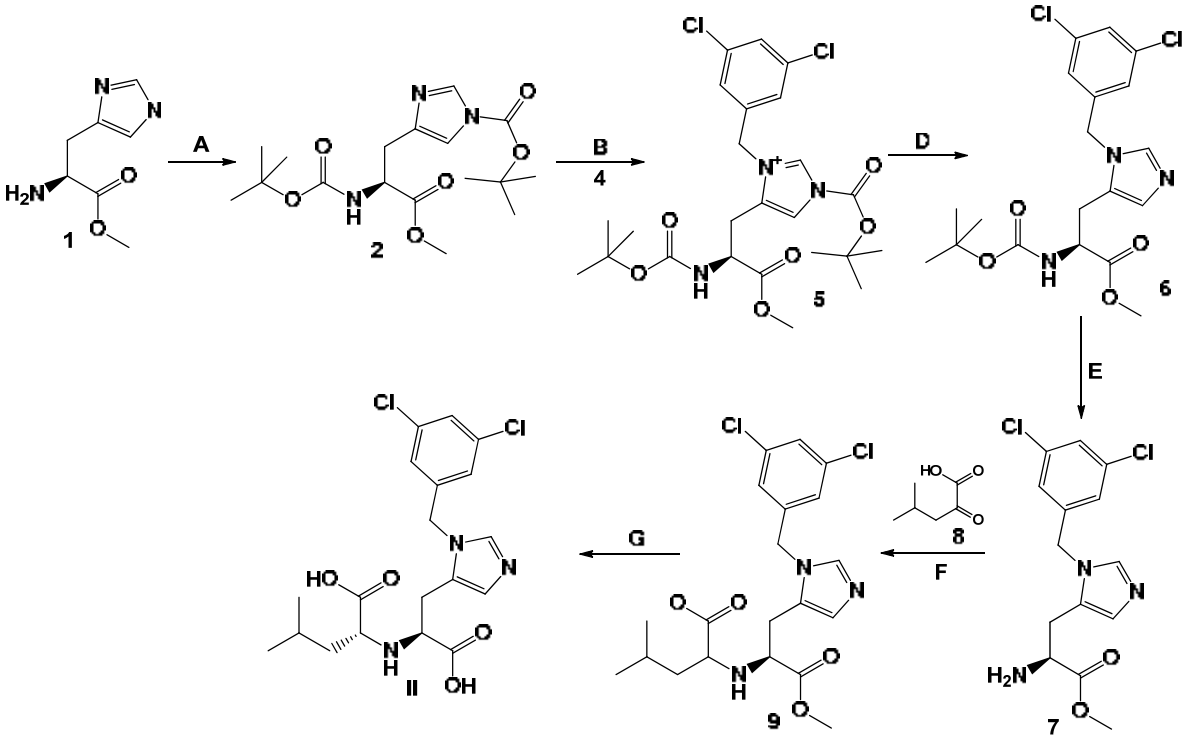


Схема 1.4.2 Синтетична схема синтезу сполуки **II**.

Для сполуки **II** найбільш придатною сольовою формою виявився дигідрохлорид (Рисунок 1.4.1)

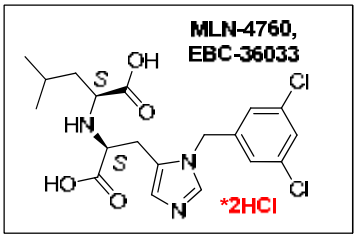


Рисунок 1.4.1 Оптимальна сольова форма для сполуки **II**.

Методики синтезу та експериментальні дані для сполук I та II знаходяться в експериментальній частині звіту.

1.5. Синтез сполук **III**, **IV**, **V**, **IX** та **X**.

Основною речовиною для синтезу усіх цих сполук є прекурсор **14** наведений на схемі 1.5.1.

На сьогодні нами було синтезовано близько 100 г речовини **9**, однак будь які спробі її переведення в сполуку **10** виявилися марними [17-19]. З усіх відомих літературних методів та наших знань жоден не дав результату краще ніж ~20% ее з конверсією не вище 50%. Такі результати є неприйнятними для ефективного синтезу сполук в мультиграмових кількостях. Відповідно подальші дослідження з

використання цих сполук були припинені через синтетичні труднощі та брак часу на їх подолання.

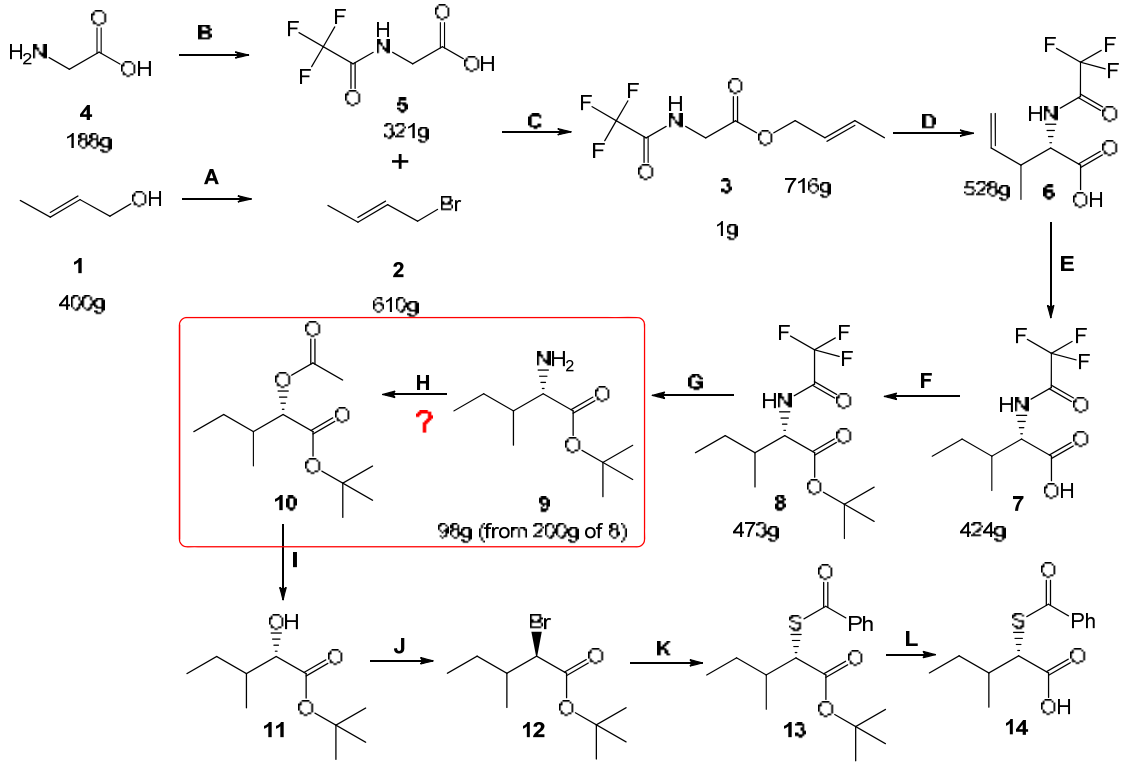


Схема 1.5.1. Синтетична схема синтезу прекурсору **14**.

1.6. Синтез сполуки **VI**.

Сполука **VI** синтезувалася за схемою схемою 1.6.1. виходячи з ключових інтермедіатів синтез яких наведений на схемі 1.6.2.

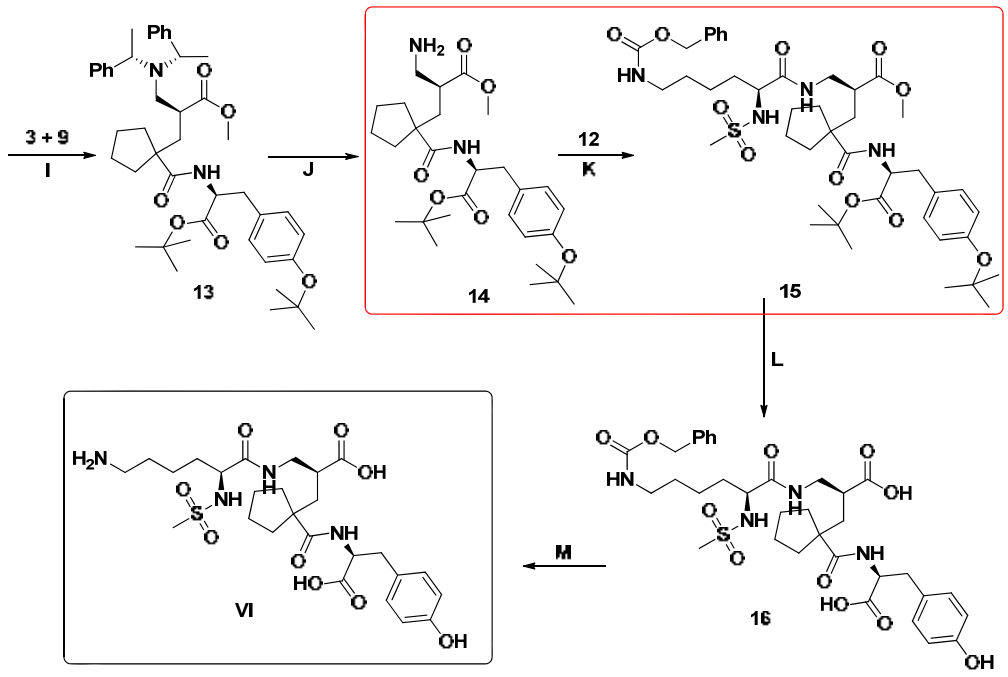


Схема 1.6.1. Синтетична схема синтезу сполуки **VI**.

Протягом звітнього періоду нами були синтезовані усі необхідні інтермедіати **3**, **5**, **9** та **12** в необхідних кількостях понад 100 г та понад 50 г відповідно [20-22].

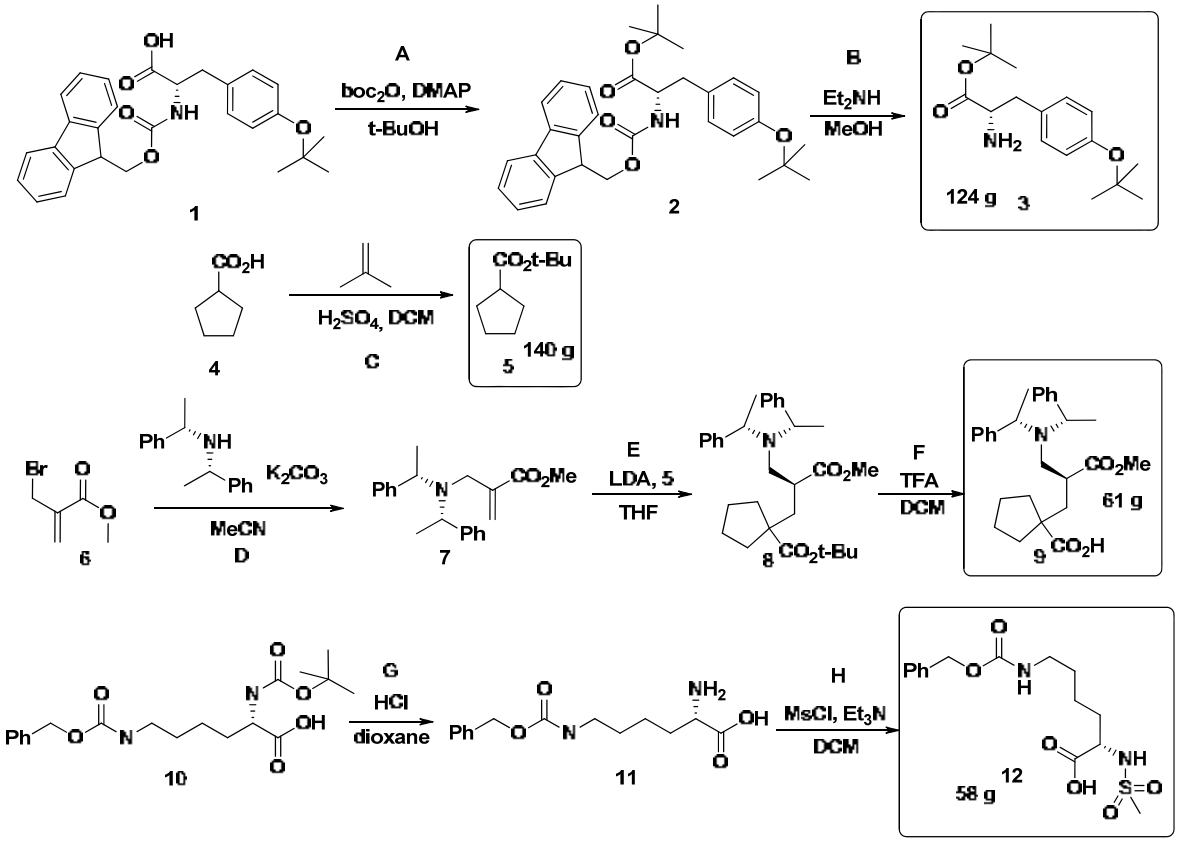


Схема 1.6.2. Синтетична схема синтезу прекурсорів **3**, **5**, **9**, **12**.

Проте нам так і не вдалося оптимізувати стадію К з використанням прекурсору **12**. Відповідно подальші дослідження з використання сполуки **VI** були припинені через синтетичні труднощі та брак часу на їх подолання.

1.7. Синтез сполуки **VII**.

Сполука **VII** синтезувалася за схемою **1.7.1.**

Нам не вдалося виділити кінцевий продукт **VII** у кількостях, які дозволили б розраховувати на проведення повного циклу валідації данної сполуки в якості хімічної проби проти ACE2-рецептора. Основною перепоною стала побічна реакція розрив зв'язку PhC(O)–S на стадії **J**, а також суттєвою епімеризацією продукту. Нам вдалося виділити аналітичну кількість **VII** шляхом препаративної хіральної рідинної хроматографії [22].

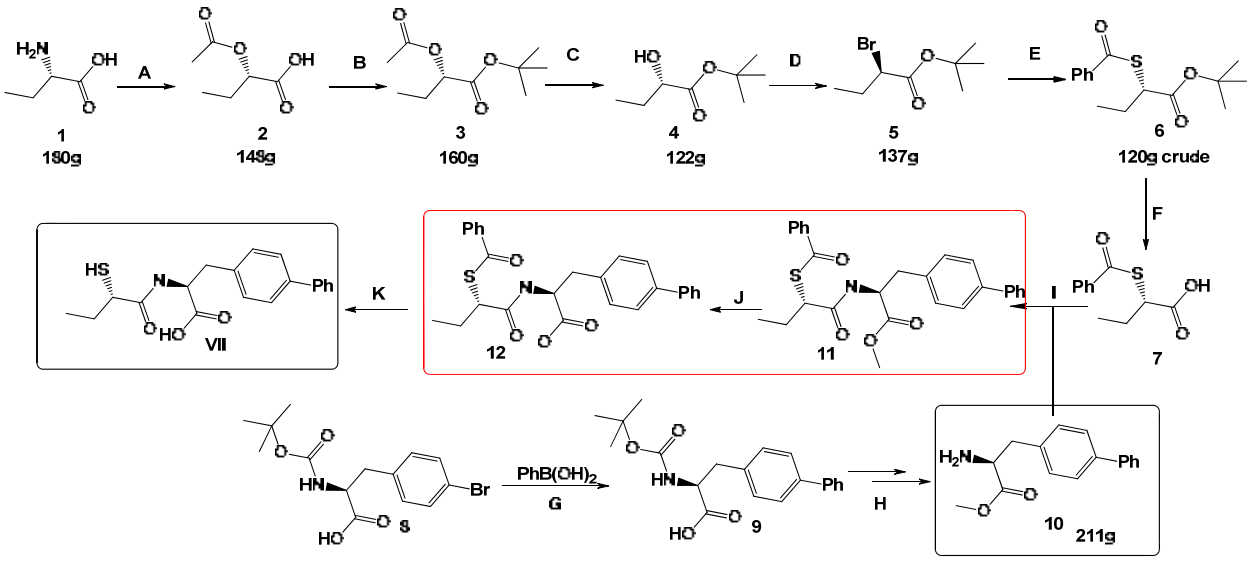


Схема 1.7.1. Синтетична схема синтезу сполуки **VII**.

На сьогодні інтермедіат **10** напрацьований у великих кількостях для синтезу сполук **VII**, **VIII, XI, XII** і, можливо, **III** [22]. З іншого боку на мікрокількостях триває оптимізація стадії **J** з метою знизити рівень епімеризації при гідролізі та унеможливити розрив зв'язку PhC(O)–S.

1.8. Синтез сполуки **VIII**.

Сполуку **VIII** було одержано за схемою 1.8.1.

Оскільки у випадку сполуки **VII** ми спостерігали суттєвий перебіг побічної реакції на стадії гідролізу естеру **11** (стадія **J**), що і стало на заваді отримання препаративно-значимої кількості цільового продукту, ми вирішили спробувати синтезувати близькі літературні аналоги сполуки **VII**, зі схожим профілем біологічної активності. Ми виходили з того, що використання більш просторово-утруднених фрагментів у тіокислотному ланцюзі може суттєво сповільнити небажану реакцію розриву зв'язку PhC(O)–S, а отже дозволити варіювати умовами для уникнення епімеризації, що в свою чергу прибере потребу у застосуванні методів хіральної хроматографії та зробить можливою очистку за допомогою більш придатних для препаративних синтезів методів (наприклад шляхом кристалізації).

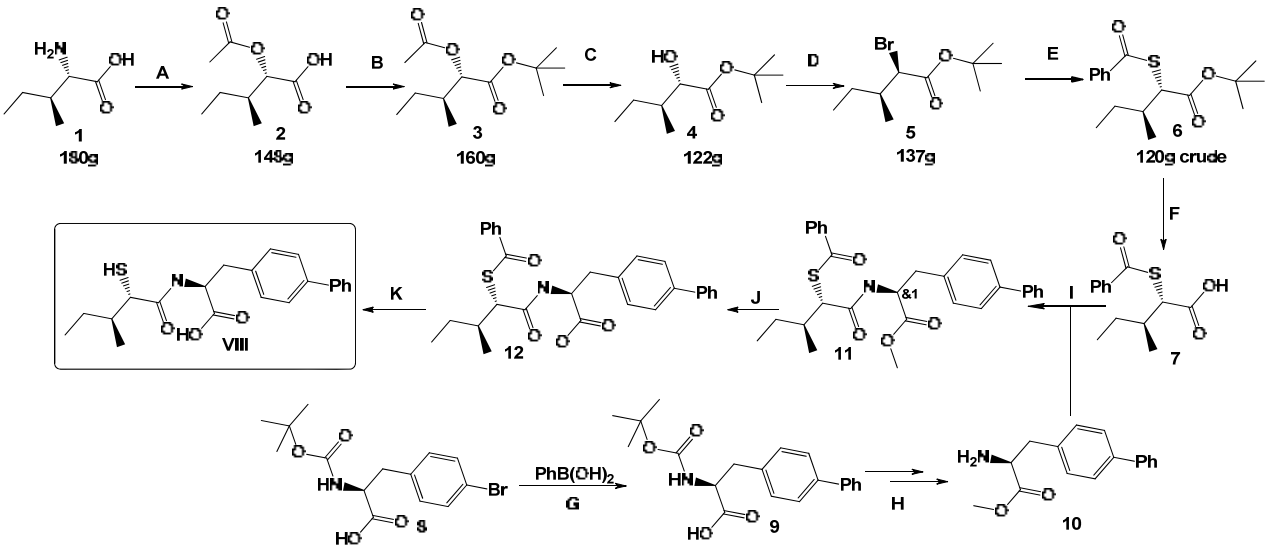


Схема 1.8.1. Синтетична схема синтезу сполуки **VIII**.

Ми синтезували інтермедіат **11** у достатній кількості (128 g). Проте на даному етапі нам не вдалось повністю уникнути проблеми зі стадією енантіоселективного гідролізу (**J**).[22] Кінцеву сполуку **VIII** було отримано в кількості більше 30 грамів, з перспективою подальшого масштабування.

Отримавши такі перспективні результати синтезу сполук **VII** та **VIII** ми вирішили отримати іще 2 аналоги даної сполуки з приблизно рівною активністю, сполуки **XI** та **XII**.

1.9. Синтез сполуки **XI**.

Сполуку **XI** було одержано за схемою **1.9.1.**

Для сполуки **XI** ми очікували виходи, близькі до отриманих для **VII** оскільки як і **VII**, **XI** має метиленовий фрагмент в альфа-положенні до вуглецю зв’язаного з сіркою. Однак, нам вдалось одержати невелику кількість продукту без застосування хіральної хроматографії.

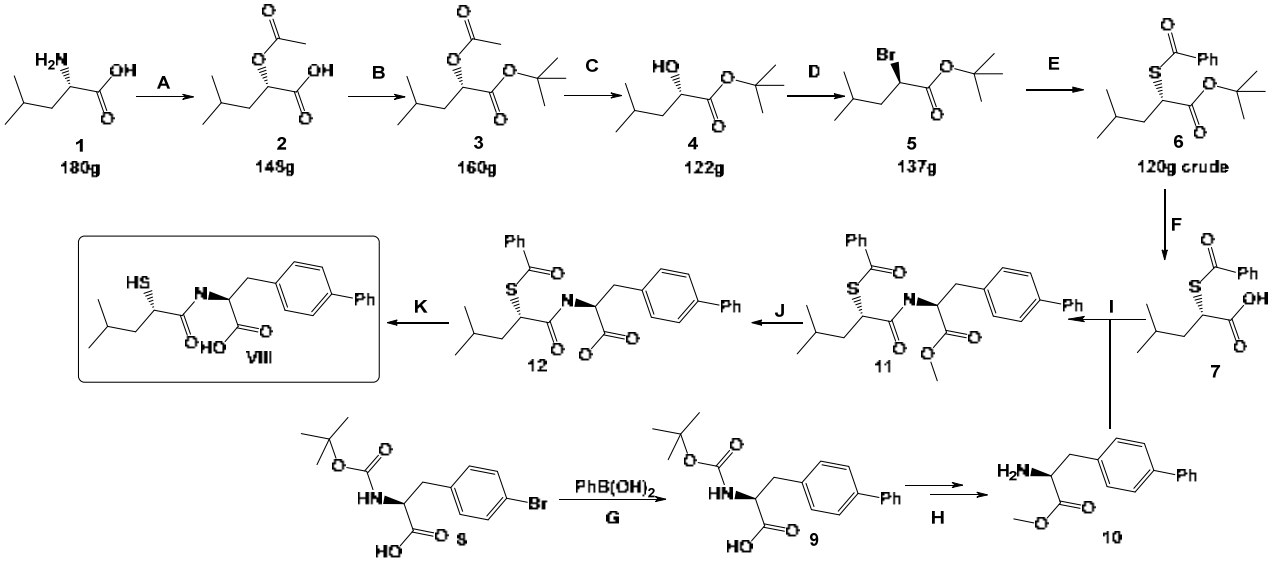


Схема 1.9.1. Синтетична схема синтезу сполуки **XI**.

Кінцеву сполуку **XI** було отримано в кількості 2,5 грамів, що є достатньою кількістю для проведення первинних біологічних досліджень з використанням даної речовини.

1.10. Синтез сполуки **XII**.

Сполуку **XII** було одержано за схемою **1.10.1.**

Гідроліз **11** (стадія **J**) очікувано в цьому випадку випадку, відбувався з виходами близькими до тих, що спостерігалися для сполуки **VIII**, отже нам вдалося отримати кінцевий продукт **XII** у препаративній кількості.

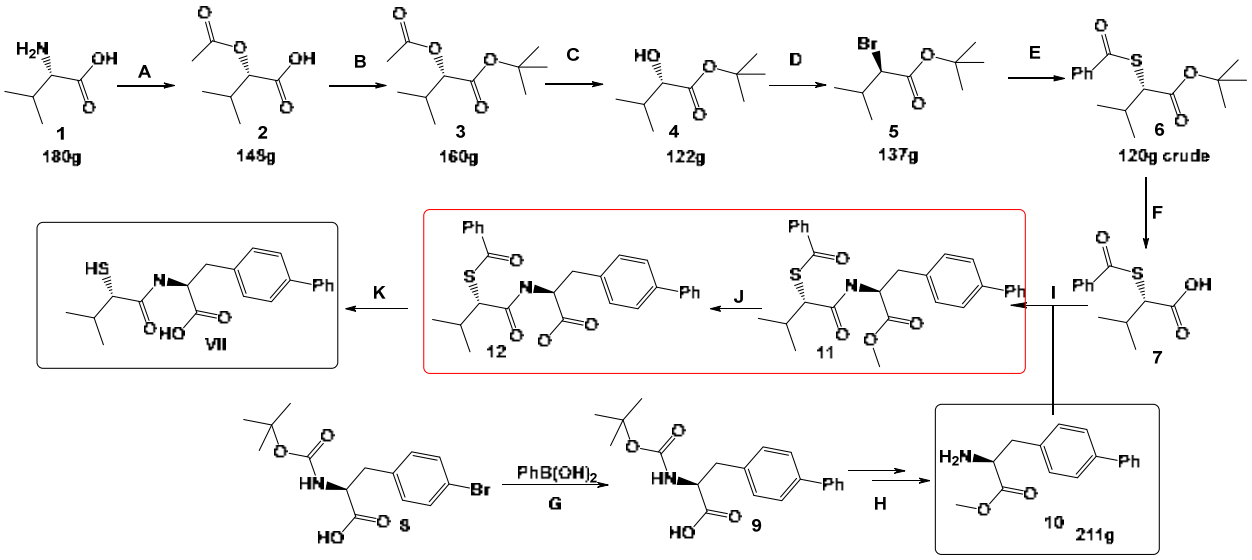


Схема 1.10.1. Синтетична схема синтезу сполуки **XII**.

Кінцеву сполуку **XII** було отримано в кількості більше 15 грамів, з перспективою подальшого масштабування.

Експериментальна частина

Синтез сполуки **I.**

Стадія A

До розчину піролідину (175 мл, 149,1 г, 2,10 моль) у H_2O (2 л) з гранулами NaOH (168 г, 4,2 моль) у круглодонній колбі, вкритої алюмінієвою фольгою, додавали $AgNO_3$ (1,746 г, 10,36 ммоль). До цієї суміші при 0 °C по краплях додавали 25% розчин $Na_2S_2O_8$ (2 л, 500 г, 2,10 моль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 3 год, а потім після додавання NaCl до водної фази до насичення екстрагували DCM (2 × 2 л). Сушили над Na_2SO_4, випаровували розчинник, розчиняли у Et_2O (200 мл), фільтрували через нейтральний оксид

алюмінію та випаровували з одержанням продукту у вигляді світло-оранжевого масла. Вихід 87 г (0,42 моль, 60%). ^{1}H NMR (500 МГц, DMSO-d_6) δ 3.83 – 3.71 (м, 3H), 3.02 – 2.89 (м, 3H), 2.53 – 2.41 (м, 3H), 1.90 – 1.76 (м, 3H), 1.78 – 1.58 (м, 9H). ^{13}C NMR (126 МГц, CDCl3) δ 81.5, 45.4, 27.4, 19.8.

Стадія B

До розчину сполуки **3** (250,3 г, 1,0 моль) в EtOH/H_2O (2,5 л/0,3 л) повільно по краплях додавали розчин KOH (56,0 г, 1,0 моль) в 1 л води. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 16 годин, упарювали, розводили 1,5 л води і екстрагували MTBE (1 л). Водну фазу відокремлювали, підкислювали до pH=1 3M HCl і екстрагували EtOAc (1,5 л). Органічну фазу відокремлювали, сушили над Na_2SO_4 і випаровували. Вихід 203 г (0,91 моль, 91%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 9.27 (с, 1H), 7.33 – 7.25 (м, 2H), 7.25 – 7.18 (м, 3H), 4.16 (кв, J = 5.9, 4.8 Гц, 2H), 3.70 (тд, J = 7.8, 2.6 Гц, 1H), 3.23 (д, J = 7.8 Гц, 2H), 1.20 (тд, J = 7.2, 2.5 Гц, 3H).

Стадія C

До охолодженої (0 °C) суміші сполуки **4** (203 г, 0,91 моль) з 120 мл формаліну додавали по краплях 120 мл піролідину. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 16 год, розводять 1 л води і 1 л EtOAc. Отриману суміш обережно підкислювали 6M HCl і екстрагували. Органічну фазу відокремлювали, промивали насиченим водним розчином $NaHCO_3$, сушили над Na_2SO_4 і упарювали. Вихід 142 г (0,75 моль, 82%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.91 – 6.19 (м, 1H), 7.31 – 7.16 (м, 3H), 7.12 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 4.08 (квд, J = 7.2, 2.6 Гц, 2H), 3.03 (дт, J = 15.9, 7.6 Гц, 2H), 2.86 (дт, J = 13.7, 5.7 Гц, 1H), 2.16 – 2.00 (м, 1H), 1.90 – 1.73 (м, 1H), 1.16 (тд, J = 7.2, 2.4 Гц, 3H).

Стадія D

Суспензію сухого $H_2P(O)(O^-NH_4^+)$ (118 г, 1,42 моль) та HMDS (360 мл, 277,2 г, 1,72 моль) нагрівали при 110 °C протягом 2 годин в атмосфері аргону. Потім реакційну суміш охолоджували до комнатної температури, додавали 2 л сухого DCM і після охолодження до 0 °C сполуку **5** (142 г, 0,75 моль) у DCM (500 мл) додавали при цій температурі по краплях протягом 30 хв. Реакційну суміш перемішували протягом 16 год при кімнатній температурі. Потім по краплях додавали абсолютний EtOH (400 мл). Суміш упарювали у вакуумі, потім розчиняли у 5% $NaHCO_3$ (2 л),

промивали MTBE (2 × 1 л), підкислювали 6 М HCl до pH=1 і екстрагували EtOAc (1,5 мл). Органічну фазу відокремлювали, промивали вод. $NaHSO_4$, сушили над Na_2SO_4 і випаровували насухо з одержанням продукту у вигляді в'язкого безбарвного масла. Вихід 126 г (0,49 моль, 66%). ^{1}H NMR (400 МГц, DMSO-d_6) δ 9.55 (ш, 2H), 7.31 – 7.19 (м, 2H), 7.21 – 7.04 (м, 3H), 4.07 – 3.83 (м, 2H), 3.59 (т, J = 6.1 Гц, 1H), 3.28 – 2.65 (м, 5H), 2.11 – 1.45 (м, 6H), 1.01 (кв, J = 6.8 Гц, 3H).

Стадія E

Et_3N (77 мл, 55,9 г, 0,55 моль) та TMSCl (70 мл, 59,78 г, 0,55 моль) додавали до розчину сполуки **6** (35 г, 136,59 ммоль) у сухому DCM (600 мл) при 0 °C в атмосфері аргону. Через 2 години при кімнатній температурі реакційну суміш охолоджували до 0 °C і по краплях додавали сполуку **2** (35 г, 168,83 ммоль) у сухому DCM (100 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 12 год, а потім додавали по краплях абсолютний EtOH (100 мл). Одержаний залишок після виділення розчинника обробляли 300 мл Et_2O, фільтрували і промивали 2 л теплого (40-50 °C) THF. Фільтрат випаровували, отримуючи неочищений продукт **7**, який використовували на наступній стадії без очищення. Вихід 41 г (126,02 ммоль, 92%).

Стадія F

До розчину сполук **8** (36 г, 258,79 ммоль) та **9** (45 г, 259,80 ммоль) порційно додавали при 0 °C DCC (54 г, 261,72 ммоль). Реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури протягом ночі, фільтрували і промивали DCM. Фільтрат випаровували і одержаний залишок використовували на наступній стадії без очищення. Вихід 72 г (244,64 ммоль, 95%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8.29 – 8.22 (м, 2H), 7.28 (д, J = 9.1 Гц, 2H), 6.03 (д, J = 7.7 Гц, 1H), 5.05 – 4.60 (м, 1H), 2.07 (с, 3H), 1.87 – 1.75 (м, 2H), 1.77 – 1.64 (м, 1H), 1.02 (т, J = 6.6 Гц, 6H).

Стадія G

До суміші сполук **7** (41 г, 126,02 ммоль) та **10** (72 г, 244,64 ммоль) у 350 мл ацетонітрилу додавали Et_3N (80 мл, 58,08 г, 0,57 моль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 16 годин, виливали в 1 л водного розчину $NaHSO_4$ і екстрагували 800 мл EtOAc. Органічну фазу відокремлювали, промивали водою (2 × 500 мл), сушили над Na_2SO_4 і упарювали. Одержаний залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (MTBE/MeOH). Вихід 15 г (31,21 ммоль, 25%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7.25 – 7.06 (м, 5H), 4.85

(с, 2H), 3.99 (с, 4H), 3.47 (с, 3H), 3.11 – 2.72 (м, 4H), 2.50 – 1.35 (м, 11H), 1.04 (с, 3H), 0.89 (с, 5H). LC/MS (CI): m/z = 481 $[M+H]^+$.

Стадія H

До розчину сполуки **11** (15 г, 31,21 ммоль) у MeOH (35 мл) додавали 35 мл водного розчину NaOH (7 г, 175 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 16 годин, потім метанол випаровували і отриману суміш розводили 200 мл води, промивали *i*PrOAc (150 мл), DCM (150 мл) і підкислювали до pH=1 водним розчином $NaHSO_4$ (150 мл) і екстрагували EtOAc (200 мл). Органічну фазу відокремлювали, сушили над Na_2SO_4, упарювали і сушили у вакуумі (1 мм рт.ст.). Вихід 8,7 г (19,23 ммоль, 62%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 11.66 (с, 2H), 7.17 (п, *J* = 7.2, 6.8 Гц, 5H), 4.83 – 4.68 (м, 1H), 4.40 – 4.15 (м, 1H), 3.95 – 3.59 (м, 1H), 3.45 (с, 1H), 3.19 – 2.93 (м, 2H), 2.86 (с, 1H), 2.13 (дд, *J* = 57.0, 34.8 Гц, 3H), 1.91 (д, *J* = 10.7 Гц, 6H), 1.75 – 1.20 (м, 4H), 0.89 (кв, *J* = 7.5, 7.0 Гц, 6H). ^{31}P NMR (202 МГц, $CDCl_3$) δ 51.10, 50.61, 49.71. LC/MS (CI): m/z = 453 $[M+H]^+$.

Синтез сполуки **II.**

Стадія A

До розчину (S)-гістидин метилового естеру гідрохлориду **1** (300 г, 1,24 моль, 1 екв.) у MeOH (2000 мл) та триетиламіну (360 мл, 2,6 моль, 2,1 екв.) повільно через крапельну воронку додавали ді-трет-бутилдикарбонат (Boc_2O, 567 г, 2,6 моль, 2,1 екв.). Через 24 години реакційну суміш концентрували і залишок розчиняли в DCM та H_2O. Органічну фазу промивали насиченим сольовим розчином, сушили над Na_2SO_4, фільтрували і концентрували, отримуючи ді-Boc-захищене похідне **2** у вигляді білої твердої речовини. Вихід 421 г (1,14 моль, 92%). ^{1}H NMR (400 МГц, CDCl3) δ 7.98 (с, 1H), 7.14 (с, 1H), 5.70 (с, 1H), 4.58 (с, 1H), 3.73 (с, 3H), 3.46 – 2.92 (м, 2H), 1.73 – 1.52 (м, 9H), 1.51 – 1.34 (м, 9H).

Стадія B, C, D

До охолодженого розчину (-78 °C). C) трифторметансульфонового ангідриду (240 г, 851 ммоль, 1,1 екв.) у DCM (2000 мл) повільно додавали розчин 3,5-дихлоробензилового спирту (150 г, 847 ммоль, 1,1 екв.) у діізопропілетиламіні (DIPEA) (110 г, 852 ммоль, 1,1 екв.) та DCM (1000 мл) в атмосфері аргону. Через 30 хвилин до розчину трифлату повільно додавали розчин ді-Бок-захищеного

гістидину **2** (300 г, 813 ммоль, 1 екв.) у DCM (500 мл). Реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури протягом ночі. Через 20 годин реакційну суміш концентрували, розчиняли в MeOH (2000 мл) і нагрівали із зворотним холодильником протягом 1 год. Реакційну суміш концентрували і розбавляли EtOAc. Органічну фазу промивали насиченим розчином $NaHCO_3$ (2 рази) і сольовим розчином (1 раз), потім сушили над Na_2SO_4, фільтрували і концентрували з отриманням N-3 алкилованого похідного імідазолу **6** (322 г, 752 ммоль, вихід 92,5%, неочищений), який використовували на наступній стадії без очищення. ^{1}H NMR (500 МГц, CDCl3) δ 7.59 – 7.41 (м, 1H), 7.35 – 7.18 (м, 1H), 7.02 – 6.60 (м, 3H), 5.99 – 5.73 (ш, 1H), 5.16 – 4.95 (м, 2H), 4.52 – 4.38 (м, 1H), 3.81 – 3.62 (м, 3H), 3.17 – 3.05 (м, 1H), 3.00 – 2.89 (м, 1H), 1.41 (с, 9H).

Стадія E

Сполуку **6** (322 г, 752 ммоль) розчиняли в MeOH (1000 мл) і до цього розчину додавали 4M розчин HCl в діоксані (1000 мл). Одержану суміш перемішували протягом 16 годин, потім осад відфільтровували, промивали спершу діоксаном (500 мл), потім MTBE (3x500 мл) і сушили, отримуючи білу тверду речовину **7** у вигляді дигідрохлориду. Вихід 204 г (509 ммоль, вихід 67,7%). ^{1}H NMR (400 МГц, DMSO-d_6) δ 9.29 (с, 1H), 9.00 (с, 2H), 7.79 – 7.59 (м, 2H), 7.50 (с, 2H), 5.60 (с, 2H), 4.39 – 4.19 (м, 1H), 3.73 (с, 3H), 3.31 – 3.19 (м, 2H).

Стадія F

До охолодженого до 0 °C розчину піваліновой кислоти (307,8 г, 3,02 моль, 11 екв.) у THF (1500 мл) порціями додавали боргідрид натрію (36,5 г, 961 ммоль, 3,5 екв.), одержану суміш нагрівали до кімнатної температури протягом ночі. Потім розчинник випарювали при зниженому тиску, залишок розчиняли в *i*-PrOH (600 мл), охолоджували до 0 °C і додавали сполуку **7** (110 г, 275 ммоль, 1 екв.) однією порцією. Потім при цій температурі до реакційної суміші порціями додавали натрієву сіль 4-метил-2-оксопентанової кислоти (одержану з 4-метил-2-оксопентанової кислоти (105 г, 905 ммоль, 3,3 екв.) та NaOH (36,4 г, 910 ммоль) у MeOH (500 мл)), одержану суміш нагрівали до кімнатної температури протягом 16 год. Розчинники випаровували при зниженому тиску, залишок повторно розчиняли у 2M водному розчині HCl і екстрагували EtOAc. Органічний шар відокремлювали, промивали 2M водним розчином HCl. Водні шари об'єднували, промивали EtOAc і

доводили до pH = 6-6,5 за допомогою твердого карбонату калію. Отриману суміш екстрагували EtOAc (3 рази). Одержані органічні шари об'єднували, сушили над Na_2SO_4, фільтрували та упарювали, отримуючи сирий продукт **9**, який використовували на наступній стадії без очищення. Вихід 71 г (161 ммоль, 58,5%, два діастереомери).^{1}H NMR (400 МГц, DMSO-d_6) δ 8.00 (с, 1H), 7.55 (кв, J = 3.5, 2.7 Гц, 1H), 7.16 (т, J = 2.2 Гц, 2H), 6.92 (с, 1H), 6.87 (с, 2H), 5.41 – 5.22 (м, 2H), 4.09 – 3.97 (м, 1H), 3.63 – 3.49 (м, 3H), 3.43 (т, J = 6.8 Гц, 1H), 3.31 – 2.60 (м, 2H), 1.71 – 1.59 (м, 1H), 1.30 (кв, J = 7.2 Гц, 1H), 1.16 (тд, J = 7.1, 1.5 Гц, 1H), 0.93 – 0.67 (м, 6H).

Стадія G

Сполуку **9** (71 г, 161 ммоль) розчиняли в 6М водному розчині HCl (300 мл) та діоксані (300 мл). Одержаний розчин нагрівали зі зворотним холодильником протягом 40 годин, потім концентрували з отриманням неочищеного залишку, який потім очищали за допомогою флеш-хроматографії із зворотною фазою (градієнт H_2O/CH_3CN), отримуючи бажаний продукт **10** у вигляді дигідрохлориду. Вихід 25,36 г (50,8 ммоль, 31,6%). ^{1}H NMR (400 МГц, D_2O) δ 8.56 (с, 1H), 7.41 (д, J = 9.5 Гц, 2H), 7.15 (с, 2H), 5.31 (с, 2H), 3.61 (т, J = 6.9 Гц, 1H), 3.47 (т, J = 6.9 Гц, 1H), 3.13 (с, 2H), 1.75 – 1.62 (м, 1H), 1.64 – 1.53 (м, 2H), 0.89 – 0.76 (м, 6H) (NH, OH does not observed due to exchange). LC/MS (CI): m/z = 428 $[M+H]^+$.

Синтез сполук **III**, **IV**, **V**, **IX** та **X** (вдалі спроби синтезу інтермедіатів).

Стадія A [21]

^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 5.92 – 5.59 (м, 2H), 3.92 (д, J = 7.2 Гц, 2H), 1.72 (д, J = 6.1 Гц, 3H). Вихід 81%.

Стадія B [22]

^{1}H NMR (500 МГц, DMSO-d_6) δ 9.76 (т, J = 6.1 Гц, 2H), 3.86 (дд, J = 6.1, 1.8 Гц, 2H). Вихід 75%.

Стадія C [23]

^{1}H NMR (600 МГц, $CDCl_3$) δ 7.22 (ш, 1H), 5.89 – 5.74 (м, 1H), 5.59 – 5.50 (м, 1H), 4.58 (дт, J = 6.8, 1.1 Гц, 2H), 4.08 (д, J = 5.2 Гц, 2H), 1.77 – 1.61 (м, 3H). Вихід 84%.

Синтез сполуки **VI**. (вдалі спроби синтезу інтермедіатів)

Стадія A [21]

^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7.81 – 7.52 (м, 4H), 7.38 (т, *J* = 7.4 Гц, 2H), 7.29 (кв, *J* = 6.4, 5.6 Гц, 2H), 7.03 (д, *J* = 8.1 Гц, 2H), 6.88 (д, *J* = 7.9 Гц, 2H), 5.32 (д, *J* = 8.1 Гц, 1H), 4.59 (с, 1H), 4.54 – 4.45 (м, 1H), 4.37 (дт, *J* = 44.8, 9.8 Гц, 1H), 4.24 – 4.06 (м, 1H), 3.02 (д, *J* = 7.0 Гц, 2H), 1.45 (с, 4H), 1.38 (с, 5H), 1.30 (с, 4H), 1.25 (с, 5H). Вихід 86%.

Стадія B [21]

^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.11 – 7.05 (м, 2H), 6.95 – 6.84 (м, 2H), 3.55 (дд, *J* = 7.4, 6.0 Гц, 2H), 3.06 – 2.75 (м, 1H), 1.46 – 1.39 (м, 2H), 1.37 (с, 9H), 1.30 (с, 9H). Вихід 92%.

Стадія C [22]

^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 2.68 – 2.55 (м, 1H), 1.89 – 1.77 (м, 2H), 1.78 – 1.67 (м, 2H), 1.70 – 1.60 (м, 2H), 1.58 – 1.49 (м, 2H), 1.42 (с, 6H), 1.42 (с, 3H). Вихід 94%.

Стадія D [23]

^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.35 – 7.16 (м, 10H), 6.25 (кв, *J* = 1.9 Гц, 1H), 6.18 (кв, *J* = 2.1 Гц, 1H), 3.93 (кв, *J* = 6.9 Гц, 2H), 3.69 (с, 3H), 3.68 – 3.62 (м, 1H), 3.26 (дт, *J* = 17.7, 1.8 Гц, 1H), 1.30 (д, *J* = 6.9 Гц, 6H). Вихід 78%.

Стадія E [23]

^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.30 – 7.14 (м, 10H), 3.96 (кв, *J* = 7.0 Гц, 2H), 3.41 (с, 3H), 2.82 – 2.65 (м, 3H), 2.06 – 1.97 (м, 2H), 1.92 – 1.78 (м, 2H), 1.68 – 1.52 (м, 4H), 1.42 (с, 9H), 1.38 (с, 3H), 1.36 (с, 3H), 1.34 – 1.19 (м, 2H). Вихід 67%.

Стадія F [23]

^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7.42 – 7.10 (м, 10H), 3.93 (кв, *J* = 7.0 Гц, 2H), 3.36 (с, 3H), 2.77 – 2.63 (м, 3H), 2.04 – 1.91 (м, 4H), 1.47 – 1.35 (м, 4H), 1.35 (с, 3H), 1.33 (с, 3H), 1.31 – 1.25 (м, 2H) (OH does not observed due to exchange). Вихід 96%.

Стадія G, H.

^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.33 (с, 5H), 6.46 (с, 3H), 4.10 (с, 1H), 3.19 (с, 2H), 2.94 (с, 3H), 1.94 – 1.68 (м, 2H), 1.56 – 1.44 (м, 4H) (NH, OH are in exchange).

Синтез сполуки **VII**.

Стадія A

Речовину 1 (42 г) розчини в крижаній оцтовій кислоті, охолодили до 10°C та присипали нітрит натрію (44 г, порціями). Утворену суспензію перемішували при кімнатній температурі 24 години, сконцентрували та екстрагували

(етилацетат/вода). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 42 г (0,21 моль, 53%). ^{1}H NMR (500 МГц, DMSO-d_6) δ 3.83 – 3.71 (м, 3H), 3.02 – 2.89 (м, 3H), 2.53 – 2.41 (м, 3H), 1.90 – 1.76 (м, 3H), 1.78 – 1.58 (м, 9H). ^{13}C NMR (126 МГц, CDCl3) δ 81.5, 45.4, 27.4, 19.8.

Стадія B

Речовину 2 (42 г) розчинили в метанолі (300 мл) та додали розчин гідроксиду натрію (24 г) у воді (300 мл). Розчин перемішували при кімнатній температурі 24 години, сконцентрували, розбавили водою (500 мл), додали гідросульфат натрію до pH = 1 та екстрагували етилацетатом. Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 29 г (0,4 моль, 77%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 9.27 (с, 1H), 7.33 – 7.25 (м, 2H), 7.25 – 7.18 (м, 3H), 4.16 (кв, J = 5.9, 4.8 Гц, 2H), 3.70 (тд, J = 7.8, 2.6 Гц, 1H), 3.23 (д, J = 7.8 Гц, 2H), 1.20 (тд, J = 7.2, 2.5 Гц, 3H).

Стадія C

До розчину речовини 3 (120 г) в суміші діоксан (1200 мл)/вода (600 мл) додано фенілборонову кислоту (51 г), $Pd(dppf)Cl_2$ (25.6 г), та поташ (96.3 г). Крізь розчин пропущено струмінь аргону впродовж 15 хвилин. Розчин кип’ятили 16 годин, після цього розчинник випарували за зниженого тиску. Залишок экстрагували системою етилацетат (3 л)/вода (3 л). Розчин відфільтровано від залишків каталізатора, органічний шар відділено та висушено (Na_2SO_4). Вихід 108 г (0,72 моль, 62%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.91 – 6.19 (м, 1H), 7.31 – 7.16 (м, 3H), 7.12 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 4.08 (квд, J = 7.2, 2.6 Гц, 2H), 3.03 (дт, J = 15.9, 7.6 Гц, 2H), 2.86 (дт, J = 13.7, 5.7 Гц, 1H), 2.16 – 2.00 (м, 1H), 1.90 – 1.73 (м, 1H), 1.16 (тд, J = 7.2, 2.4 Гц, 3H).

Стадія D

Приготували розчин 2M HCl в метанолі і розчинили у ньому речовину 4 (108 г). Утворений розчин кип’ятили 16 годин сконцентрували за зниженого тиску, розчинили у новій порції розчину, кип’ятили ще 16 годин та сконцентрували за зниженого тиску. Залишок кристалізували з етилацетату/метанолу (10:1). Вихід 72 г (0,52 моль, 76%). ^{1}H NMR (400 МГц, DMSO-d_6) δ 9.55 (ш, 2H), 7.31 – 7.19 (м, 2H), 7.21 – 7.04 (м, 3H), 4.07 – 3.83 (м, 2H), 3.59 (т, J = 6.1 Гц, 1H), 3.28 – 2.65 (м, 5H), 2.11 – 1.45 (м, 6H), 1.01 (кв, J = 6.8 Гц, 3H).

Стадія E

Речовини 5 (28 г), 6 (63 г) та гідроксибензотріазол (38 г) розчинили у дихлорметані та охолодили до 0°С. Додали DIPEA (94 мл) та EDC (54 г, порціями. Розчин перемішували при кімнатній температурі 24 години. Розчин промили водою (2х1л), содою (2х1л) та гідросульфатом натрію (2х1л). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 75 г (0.25 моль, 82%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8.29 – 8.22 (м, 2H), 7.28 (д, *J* = 9.1 Гц, 2H), 6.03 (д, *J* = 7.7 Гц, 1H), 5.05 – 4.60 (м, 1H), 2.07 (с, 3H), 1.87 – 1.75 (м, 2H), 1.77 – 1.64 (м, 1H), 1.02 (т, *J* = 6.6 Гц, 6H).

Стадія F

Речовину 6 (75 г) розчинили у дихлорметані (1 л), охолодили до 0°С, додали триетиламін (57 мл) та метилсульфохлорид (19 мл, впродовж 10 хвилин). Розчин перемішували при 0°С 1 годину, промили водою (1 л) та содою (1 л), органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 91 г (0,29 ммоль, 93%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8.29 – 8.22 (м, 2H), 7.28 (д, *J* = 9.1 Гц, 2H), 6.03 (д, *J* = 7.7 Гц, 1H), 5.05 – 4.60 (м, 1H), 2.07 (с, 3H), 1.87 – 1.75 (м, 2H), 1.77 – 1.64 (м, 1H), 1.02 (т, *J* = 6.6 Гц, 6H).

Стадія I

Речовину 7 (91 г)розчинили у ДМФ (1 л) та додали тіоацетат калію (47 г). Розчин перемішували при 60°С 36 годин. Суміш екстрагували системою етилацетат (1.5 л)/вода (1.5 л). Органічний шар промили водою (3х1л), відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 11 г (0,07 ммоль, 21%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7.25 – 7.06 (м, 5H), 4.85 (с, 2H), 3.99 (с, 4H), 3.47 (с, 3H), 3.11 – 2.72 (м, 4H), 2.50 – 1.35 (м, 11H), 1.04 (с, 3H), 0.89 (с, 5H). LC/MS (CI): m/z = 481 $[M+H]^+$.

Стадія J

Речовину 11 (11г) розчинили у ТГФ (100 мл), охолодили до 0°С, пропустили струмінь аргону впродовж 10 хвилин, та додали холодний, дегазований розчин NaOH (2.6 г) у воді (100 мл). Розчин перемішували при 0°С в інертній атмосфері 1 годину, вилили у холодний розчин гідросульфату натрію (500 мл) та екстрагували етилацетатом (500 мл). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 4.2 г (0,04 моль,

58%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 11.66 (с, 2H), 7.17 (п, *J* = 7.2, 6.8 Гц, 5H), 4.83 – 4.68 (м, 1H), 4.40 – 4.15 (м, 1H), 3.95 – 3.59 (м, 1H), 3.45 (с, 1H), 3.19 – 2.93 (м, 2H), 2.86 (с, 1H), 2.13 (дд, *J* = 57.0, 34.8 Гц, 3H), 1.91 (д, *J* = 10.7 Гц, 6H), 1.75 – 1.20 (м, 4H), 0.89 (кв, *J* = 7.5, 7.0 Гц, 6H). LC/MS (CI): m/z = 453 $[M+H]^+$.

Стадія K

Речовину 12 (4г) розчинили у ТГФ (100 мл), охолодили до 0°C, пропустили струмінь аргону впродовж 10 хвилин, та додали холодний, дегазований розчин NaOH (2.6 г) у воді (100 мл). Розчин перемішували при 0°C в інертній атмосфері 1 годину, вилили у холодний розчин гідросульфату натрію (500 мл) та екстрагували етилацетатом (500 мл). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 0.25 г (0,2 моль, 52%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 11.66 (с, 2H), 7.17 (п, *J* = 7.2, 6.8 Гц, 5H), 4.83 – 4.68 (м, 1H), 4.40 – 4.15 (м, 1H), 3.95 – 3.59 (м, 1H), 3.45 (с, 1H), 3.19 – 2.93 (м, 2H), 2.86 (с, 1H), 2.13 (дд, *J* = 57.0, 34.8 Гц, 3H), 1.91 (д, *J* = 10.7 Гц, 6H), 1.75 – 1.20 (м, 4H), 0.89 (кв, *J* = 7.5, 7.0 Гц, 6H). LC/MS (CI): m/z = 453 $[M+H]^+$.

Синтез сполуки **VIII**.

Стадія A

Речовину 1 (42 г) розчини в крижаній оцтовій кислоті, охолодили до 10°C та присипали нітрит натрію (44 г, порціями). Утворену суспензію перемішували при кімнатній температурі 24 години, сконцентрували та екстрагували (етилацетат/вода). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 62 г (0,47 моль, 69%). ^{1}H NMR (500 МГц, DMSO-d_6) δ 3.83 – 3.71 (м, 3H), 3.02 – 2.89 (м, 3H), 2.53 – 2.41 (м, 3H), 1.90 – 1.76 (м, 3H), 1.78 – 1.58 (м, 9H). ^{13}C NMR (126 МГц, CDCl3) δ 81.5, 45.4, 27.4, 19.8.

Стадія B

Речовину 2 (62 г) розчинили в метанолі (300 мл) та додали розчин гідроксиду натрію (24 г) у воді (300 мл). Розчин перемішували при кімнатній температурі 24 години, сконцентрували, розбавили водою (500 мл), додали гідросульфат натрію до pH = 1 та екстрагували етилацетатом. Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 37 г (0,21 моль, 61%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$)

δ 9.27 (с, 1H), 7.33 – 7.25 (м, 2H), 7.25 – 7.18 (м, 3H), 4.16 (кв, *J* = 5.9, 4.8 Гц, 2H), 3.70 (тд, *J* = 7.8, 2.6 Гц, 1H), 3.23 (д, *J* = 7.8 Гц, 2H), 1.20 (тд, *J* = 7.2, 2.5 Гц, 3H).

Стадія C

До розчину речовини 3 (120 г) в суміші діоксан (1200 мл)/вода (600 мл) додано фенілборонову кислоту (51 г), $Pd(dppf)Cl_2$ (25.6 г), та поташ (96.3 г). Крізь розчин пропущено струмінь аргону впродовж 15 хвилин. Розчин кип'ятили 16 годин, після цього розчинник випарували за зниженого тиску. Залишок экстрагували системою етилацетат (3 л)/вода (3 л). Розчин відфільтровано від залишків каталізатора, органічний шар відділено та висушено (Na_2SO_4). Вихід 108 г (0,65 моль, 72%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.91 – 6.19 (м, 1H), 7.31 – 7.16 (м, 3H), 7.12 (д, *J* = 7.6 Гц, 2H), 4.08 (квд, *J* = 7.2, 2.6 Гц, 2H), 3.03 (дт, *J* = 15.9, 7.6 Гц, 2H), 2.86 (дт, *J* = 13.7, 5.7 Гц, 1H), 2.16 – 2.00 (м, 1H), 1.90 – 1.73 (м, 1H), 1.16 (тд, *J* = 7.2, 2.4 Гц, 3H).

Стадія D

Приготували розчин 2M HCl в метанолі і розчинили у ньому речовину 4 (108 г). Утворений розчин кип'ятили 16 годин сконцентрували за зниженого тиску, розчинили у новій порції розчину, кип'ятили ще 16 годин та сконцентрували за зниженого тиску. Залишок кристалізували з етилацетату/метанолу (10:1). Вихід 72 г (0,51 моль, 56%). ^{1}H NMR (400 МГц, DMSO-d_6) δ 9.55 (ш, 2H), 7.31 – 7.19 (м, 2H), 7.21 – 7.04 (м, 3H), 4.07 – 3.83 (м, 2H), 3.59 (т, *J* = 6.1 Гц, 1H), 3.28 – 2.65 (м, 5H), 2.11 – 1.45 (м, 6H), 1.01 (кв, *J* = 6.8 Гц, 3H).

Стадія E

Речовини 5 (28 г), 6 (63 г) та гідроксибензотріазол (38 г) розчинили у дихлорметані та охолодили до 0°C. Додали DIPEA (94 мл) та EDC (54 г, порціями. Розчин перемішували при кімнатній температурі 24 години. Розчин промили водою (2x1л), содою (2x1л) та гідросульфатом натрію (2x1л). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 75 г (0,12 моль, 82%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8.29 – 8.22 (м, 2H), 7.28 (д, *J* = 9.1 Гц, 2H), 6.03 (д, *J* = 7.7 Гц, 1H), 5.05 – 4.60 (м, 1H), 2.07 (с, 3H), 1.87 – 1.75 (м, 2H), 1.77 – 1.64 (м, 1H), 1.02 (т, *J* = 6.6 Гц, 6H).

Стадія F

Речовину 6 (65 г) розчинили у дихлорметані (1 л), охолодили до 0°C, додали триетиламін (57 мл) та метилсульфохлорид (19 мл, впродовж 10 хвилин). Розчин

перемішували при 0°C 1 годину, промили водою (1 л) та содою (1 л), органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 91 г (0,27 моль, 91%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8.29 – 8.22 (м, 2H), 7.28 (д, *J* = 9.1 Гц, 2H), 6.03 (д, *J* = 7.7 Гц, 1H), 5.05 – 4.60 (м, 1H), 2.07 (с, 3H), 1.87 – 1.75 (м, 2H), 1.77 – 1.64 (м, 1H), 1.02 (т, *J* = 6.6 Гц, 6H).

Стадія I

Речовину 7 (81 г)розчинили у ДМФ (1 л) та додали тіоацетат калію (47 г). Розчин перемішували при 60°C 36 годин. Суміш екстрагували системою етилацетат (1.5 л)/вода (1.5 л). Органічний шар промили водою (3x1л), відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 24 г (0,05 ммоль, 28%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7.25 – 7.06 (м, 5H), 4.85 (с, 2H), 3.99 (с, 4H), 3.47 (с, 3H), 3.11 – 2.72 (м, 4H), 2.50 – 1.35 (м, 11H), 1.04 (с, 3H), 0.89 (с, 5H). LC/MS (CI): m/z = 481 $[M+H]^+$.

Стадія J

Речовину 11 (24г) розчинили у ТГФ (100 мл), охолодили до 0°C, пропустили струмінь аргону впродовж 10 хвилин, та додали холодний, дегазований розчин NaOH (2.6 г) у воді (100 мл). Розчин перемішували при 0°C в інертній атмосфері 1 годину, вилили у холодний розчин гідросульфату натрію (500 мл) та екстрагували етилацетатом (500 мл). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 42 г (0,21 моль, 42%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 11.66 (с, 2H), 7.17 (п, *J* = 7.2, 6.8 Гц, 5H), 4.83 – 4.68 (м, 1H), 4.40 – 4.15 (м, 1H), 3.95 – 3.59 (м, 1H), 3.45 (с, 1H), 3.19 – 2.93 (м, 2H), 2.86 (с, 1H), 2.13 (дд, *J* = 57.0, 34.8 Гц, 3H), 1.91 (д, *J* = 10.7 Гц, 6H), 1.75 – 1.20 (м, 4H), 0.89 (кв, *J* = 7.5, 7.0 Гц, 6H). LC/MS (CI): m/z = 453 $[M+H]^+$.

Стадія K

Речовину 12 (42 г) розчинили у ТГФ (100 мл), охолодили до 0°C, пропустили струмінь аргону впродовж 10 хвилин, та додали холодний, дегазований розчин NaOH (2.6 г) у воді (100 мл). Розчин перемішували при 0°C в інертній атмосфері 1 годину, вилили у холодний розчин гідросульфату натрію (500 мл) та екстрагували етилацетатом (500 мл). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 33.5 г (0,27 моль,

72%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 11.66 (с, 2H), 7.17 (п, *J* = 7.2, 6.8 Гц, 5H), 4.83 – 4.68 (м, 1H), 4.40 – 4.15 (м, 1H), 3.95 – 3.59 (м, 1H), 3.45 (с, 1H), 3.19 – 2.93 (м, 2H), 2.86 (с, 1H), 2.13 (дд, *J* = 57.0, 34.8 Гц, 3H), 1.91 (д, *J* = 10.7 Гц, 6H), 1.75 – 1.20 (м, 4H), 0.89 (кв, *J* = 7.5, 7.0 Гц, 6H). LC/MS (CI): m/z = 453 $[M+H]^+$.

Стадія A

Речовину 1 (82 г) розчини в крижаній оцтовій кислоті, охолодили до 10°C та присипали нітрит натрію (44 г, порціями). Утворену суспензію перемішували при кімнатній температурі 24 години, сконцентрували та екстрагували (етилацетат/вода). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 62 г (0,52 моль, 68%). ^{1}H NMR (500 МГц, DMSO-d_6) δ 3.83 – 3.71 (м, 3H), 3.02 – 2.89 (м, 3H), 2.53 – 2.41 (м, 3H), 1.90 – 1.76 (м, 3H), 1.78 – 1.58 (м, 9H). ^{13}C NMR (126 МГц, CDCl3) δ 81.5, 45.4, 27.4, 19.8.

Стадія B

Речовину 2 (88 г) розчинили в метанолі (300 мл) та додали розчин гідроксиду натрію (24 г) у воді (300 мл). Розчин перемішували при кімнатній температурі 24 години, сконцентрували, розбавили водою (500 мл), додали гідросульфат натрію до pH = 1 та екстрагували етилацетатом. Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 69 г (0,71 моль, 71%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 9.27 (с, 1H), 7.33 – 7.25 (м, 2H), 7.25 – 7.18 (м, 3H), 4.16 (кв, *J* = 5.9, 4.8 Гц, 2H), 3.70 (тд, *J* = 7.8, 2.6 Гц, 1H), 3.23 (д, *J* = 7.8 Гц, 2H), 1.20 (тд, *J* = 7.2, 2.5 Гц, 3H).

Стадія C

До розчину речовини 3 (127 г) в суміші діоксан (1200 мл)/вода (600 мл) додано фенілборонову кислоту (51 г), $Pd(dppf)Cl_2$ (25.6 г), та поташ (96.3 г). Крізь розчин пропущено струмінь аргону впродовж 15 хвилин. Розчин кип’ятили 16 годин, після цього розчинник випарували за зниженого тиску. Залишок экстрагували системою етилацетат (3 л)/вода (3 л). Розчин відфільтровано від залишків каталізатора, органічний шар відділено та висушено (Na_2SO_4). Вихід 118 г (0,78 моль, 72%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.91 – 6.19 (м, 1H), 7.31 – 7.16 (м, 3H), 7.12 (д, *J* = 7.6 Гц, 2H), 4.08 (квд, *J* = 7.2, 2.6 Гц, 2H), 3.03 (дт, *J* = 15.9, 7.6 Гц, 2H), 2.86 (дт, *J* = 13.7, 5.7 Гц, 1H), 2.16 – 2.00 (м, 1H), 1.90 – 1.73 (м, 1H), 1.16 (тд, *J* = 7.2, 2.4 Гц, 3H).

Стадія D

Приготували розчин 2М HCl в метанолі і розчинили у ньому речовину 4 (98 г). Утворений розчин кип'ятили 16 годин сконцентрували за зниженого тиску, розчинили у новій порції розчину, кип'ятили ще 16 годин та сконцентрували за зниженого тиску. Залишок кристалізували з етилацетату/метанолу (10:1). Вихід 52 г (0,58 моль, 65%). ^{1}H NMR (400 МГц, DMSO-d_6) δ 9.55 (ш, 2H), 7.31 – 7.19 (м, 2H), 7.21 – 7.04 (м, 3H), 4.07 – 3.83 (м, 2H), 3.59 (т, J = 6.1 Гц, 1H), 3.28 – 2.65 (м, 5H), 2.11 – 1.45 (м, 6H), 1.01 (кв, J = 6.8 Гц, 3H).

Стадія E

Речовини 5 (68 г), 6 (63 г) та гідроксибензотріазол (38 г) розчинили у дихлорметані та охолодили до 0°C. Додали DIPEA (94 мл) та EDC (54 г, порціями. Розчин перемішували при кімнатній температурі 24 години. Розчин промили водою (2x1л), содою (2x1л) та гідросульфатом натрію (2x1л). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 125 г (0,32 моль, 76%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8.29 – 8.22 (м, 2H), 7.28 (д, J = 9.1 Гц, 2H), 6.03 (д, J = 7.7 Гц, 1H), 5.05 – 4.60 (м, 1H), 2.07 (с, 3H), 1.87 – 1.75 (м, 2H), 1.77 – 1.64 (м, 1H), 1.02 (т, J = 6.6 Гц, 6H).

Стадія F

Речовину 6 (85 г) розчинили у дихлорметані (1 л), охолодили до 0°C, додали триетиламін (57 мл) та метилсульфохлорид (19 мл, впродовж 10 хвилин). Розчин перемішували при 0°C 1 годину, промили водою (1 л) та содою (1 л), органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 92 г (0,44 моль, 94%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8.29 – 8.22 (м, 2H), 7.28 (д, J = 9.1 Гц, 2H), 6.03 (д, J = 7.7 Гц, 1H), 5.05 – 4.60 (м, 1H), 2.07 (с, 3H), 1.87 – 1.75 (м, 2H), 1.77 – 1.64 (м, 1H), 1.02 (т, J = 6.6 Гц, 6H).

Стадія I

Речовину 7 (92 г)розчинили у ДМФ (1 л) та додали тіоацетат калію (47 г). Розчин перемішували при 60°C 36 годин. Суміш екстрагували системою етилацетат (1.5 л)/вода (1.5 л). Органічний шар промили водою (3x1л), відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 76 г (0,31 моль, 65%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7.25 – 7.06 (м, 5H), 4.85 (с, 2H), 3.99

(с, 4H), 3.47 (с, 3H), 3.11 – 2.72 (м, 4H), 2.50 – 1.35 (м, 11H), 1.04 (с, 3H), 0.89 (с, 5H). LC/MS (CI): m/z = 481 $[M+H]^+$.

Стадія J

Речовину 11 (38 г) розчинили у ТГФ (100 мл), охолодили до 0°C, пропустили струмінь аргону впродовж 10 хвилин, та додали холодний, дегазований розчин NaOH (2.6 г) у воді (100 мл). Розчин перемішували при 0°C в інертній атмосфері 1 годину, вилили у холодний розчин гідросульфату натрію (500 мл) та екстрагували етилацетатом (500 мл). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 4.2 г (0,082 моль, 32%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 11.66 (с, 2H), 7.17 (п, *J* = 7.2, 6.8 Гц, 5H), 4.83 – 4.68 (м, 1H), 4.40 – 4.15 (м, 1H), 3.95 – 3.59 (м, 1H), 3.45 (с, 1H), 3.19 – 2.93 (м, 2H), 2.86 (с, 1H), 2.13 (дд, *J* = 57.0, 34.8 Гц, 3H), 1.91 (д, *J* = 10.7 Гц, 6H), 1.75 – 1.20 (м, 4H), 0.89 (кв, *J* = 7.5, 7.0 Гц, 6H). LC/MS (CI): m/z = 453 $[M+H]^+$.

Стадія K

Речовину 12 (4 г) розчинили у ТГФ (100 мл), охолодили до 0°C, пропустили струмінь аргону впродовж 10 хвилин, та додали холодний, дегазований розчин NaOH (2.6 г) у воді (100 мл). Розчин перемішували при 0°C в інертній атмосфері 1 годину, вилили у холодний розчин гідросульфату натрію (500 мл) та екстрагували етилацетатом (500 мл). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 2.5 г (0,019 моль, 37%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 11.66 (с, 2H), 7.17 (п, *J* = 7.2, 6.8 Гц, 5H), 4.83 – 4.68 (м, 1H), 4.40 – 4.15 (м, 1H), 3.95 – 3.59 (м, 1H), 3.45 (с, 1H), 3.19 – 2.93 (м, 2H), 2.86 (с, 1H), 2.13 (дд, *J* = 57.0, 34.8 Гц, 3H), 1.91 (д, *J* = 10.7 Гц, 6H), 1.75 – 1.20 (м, 4H), 0.89 (кв, *J* = 7.5, 7.0 Гц, 6H). LC/MS (CI): m/z = 453 $[M+H]^+$.

Синтез сполуки **XII.**

Стадія A

Речовину 1 (92 г) розчини в крижаній оцтовій кислоті, охолодили до 10°C та присипали нітрит натрію (44 г, порціями). Утворену суспензію перемішували при кімнатній температурі 24 години, сконцентрували та екстрагували (етилацетат/вода). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 78 г (0,42 моль, 61%). ^{1}H NMR (500 МГц, DMSO-d_6) δ 3.83

– 3.71 (м, 3H), 3.02 – 2.89 (м, 3H), 2.53 – 2.41 (м, 3H), 1.90 – 1.76 (м, 3H), 1.78 – 1.58 (м, 9H). ^{13}C NMR (126 МГц, CDCl3) δ 81.5, 45.4, 27.4, 19.8.

Стадія B

Речовину 2 (78 г) розчинили в метанолі (300 мл) та додали розчин гідроксиду натрію (24 г) у воді (300 мл). Розчин перемішували при кімнатній температурі 24 години, сконцентрували, розбавили водою (500 мл), додали гідросульфат натрію до pH = 1 та екстрагували етилацетатом. Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 59 г (0,61 моль, 71%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 9.27 (с, 1H), 7.33 – 7.25 (м, 2H), 7.25 – 7.18 (м, 3H), 4.16 (кв, *J* = 5.9, 4.8 Гц, 2H), 3.70 (тд, *J* = 7.8, 2.6 Гц, 1H), 3.23 (д, *J* = 7.8 Гц, 2H), 1.20 (тд, *J* = 7.2, 2.5 Гц, 3H).

Стадія C

До розчину речовини 3 (101 г) в суміші діоксан (1200 мл)/вода (600 мл) додано фенілборонову кислоту (51 г), Pd(dppf)Cl_2 (25.6 г), та поташ (96.3 г). Крізь розчин пропущено струмінь аргону впродовж 15 хвилин. Розчин кип’ятили 16 годин, після цього розчинник випарували за зниженого тиску. Залишок экстрагували системою етилацетат (3 л)/вода (3 л). Розчин відфільтровано від залишків каталізатора, органічний шар відділено та висушено (Na_2SO_4). Вихід 98 г (0,71 моль, 74%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.91 – 6.19 (м, 1H), 7.31 – 7.16 (м, 3H), 7.12 (д, *J* = 7.6 Гц, 2H), 4.08 (квд, *J* = 7.2, 2.6 Гц, 2H), 3.03 (дт, *J* = 15.9, 7.6 Гц, 2H), 2.86 (дт, *J* = 13.7, 5.7 Гц, 1H), 2.16 – 2.00 (м, 1H), 1.90 – 1.73 (м, 1H), 1.16 (тд, *J* = 7.2, 2.4 Гц, 3H).

Стадія D

Приготували розчин 2M HCl в метанолі і розчинили у ньому речовину 4 (98 г). Утворений розчин кип’ятили 16 годин сконцентрували за зниженого тиску, розчинили у новій порції розчину, кип’ятили ще 16 годин та сконцентрували за зниженого тиску. Залишок кристалізували з етилацетату/метанолу (10:1). Вихід 62 г (0,39 моль, 64%). ^{1}H NMR (400 МГц, DMSO-d_6) δ 9.55 (ш, 2H), 7.31 – 7.19 (м, 2H), 7.21 – 7.04 (м, 3H), 4.07 – 3.83 (м, 2H), 3.59 (т, *J* = 6.1 Гц, 1H), 3.28 – 2.65 (м, 5H), 2.11 – 1.45 (м, 6H), 1.01 (кв, *J* = 6.8 Гц, 3H).

Стадія E

Речовини 5 (62 г), 6 (63 г) та гідроксибензотріазол (38 г) розчинили у дихлорметані та охолодили до 0°C. Додали DIPEA (94 мл) та EDC (54 г, порціями. Розчин перемішували при кімнатній температурі 24 години. Розчин промили водою (2x1л),

содою (2x1л) та гідросульфатом натрію (2x1л). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 55 г (0,33 моль, 85%).

Стадія F

Речовину 6 (55 г) розчинили у дихлорметані (1 л), охолодили до 0°C, додали триетиламін (57 мл) та метилсульфохлорид (19 мл, впродовж 10 хвилин). Розчин перемішували при 0°C 1 годину, промили водою (1 л) та содою (1 л), органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Вихід 71 г (0,37 моль, 81%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8.29 – 8.22 (м, 2H), 7.28 (д, *J* = 9.1 Гц, 2H), 6.03 (д, *J* = 7.7 Гц, 1H), 5.05 – 4.60 (м, 1H), 2.07 (с, 3H), 1.87 – 1.75 (м, 2H), 1.77 – 1.64 (м, 1H), 1.02 (т, *J* = 6.6 Гц, 6H).

Стадія I

Речовину 7 (71 г)розчинили у ДМФ (1 л) та додали тіоацетат калію (47 г). Розчин перемішували при 60°C 36 годин. Суміш екстрагували системою етилацетат (1.5 л)/вода (1.5 л). Органічний шар промили водою (3x1л), відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 41 г (0,31 моль, 85%). ^{1}H NMR (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7.25 – 7.06 (м, 5H), 4.85 (с, 2H), 3.99 (с, 4H), 3.47 (с, 3H), 3.11 – 2.72 (м, 4H), 2.50 – 1.35 (м, 11H), 1.04 (с, 3H), 0.89 (с, 5H). LC/MS (CI): m/z = 481 $[M+H]^+$.

Стадія J

Речовину 11 (41 г) розчинили у ТГФ (100 мл), охолодили до 0°C, пропустили струмінь аргону впродовж 10 хвилин, та додали холодний, дегазований розчин NaOH (2.6 г) у воді (100 мл). Розчин перемішували при 0°C в інертній атмосфері 1 годину, вилили у холодний розчин гідросульфату натрію (500 мл) та екстрагували етилацетатом (500 мл). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 21 г (0,31 моль, 92%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 11.66 (с, 2H), 7.17 (п, *J* = 7.2, 6.8 Гц, 5H), 4.83 – 4.68 (м, 1H), 4.40 – 4.15 (м, 1H), 3.95 – 3.59 (м, 1H), 3.45 (с, 1H), 3.19 – 2.93 (м, 2H), 2.86 (с, 1H), 2.13 (дд, *J* = 57.0, 34.8 Гц, 3H), 1.91 (д, *J* = 10.7 Гц, 6H), 1.75 – 1.20 (м, 4H), 0.89 (кв, *J* = 7.5, 7.0 Гц, 6H). LC/MS (CI): m/z = 453 $[M+H]^+$.

Стадія K

Речовину 12 (4г) розчинили у ТГФ (100 мл), охолодили до 0°С, пропустили струмінь аргону впродовж 10 хвилин, та додали холодний, дегазований розчин NaOH (2.6 г) у воді (100 мл). Розчин перемішували при 0°С в інертній атмосфері 1 годину, вилили у холодний розчин гідросульфату натрію (500 мл) та екстрагували етилацетатом (500 мл). Органічний шар відділили, висушили (Na_2SO_4) та сконцентрували. Залишок було очищено хроматографією. Вихід 15.5 г (19,23 ммоль, 62%). ^{1}H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ 11.66 (с, 2H), 7.17 (п, *J* = 7.2, 6.8 Гц, 5H), 4.83 – 4.68 (м, 1H), 4.40 – 4.15 (м, 1H), 3.95 – 3.59 (м, 1H), 3.45 (с, 1H), 3.19 – 2.93 (м, 2H), 2.86 (с, 1H), 2.13 (дд, *J* = 57.0, 34.8 Гц, 3H), 1.91 (д, *J* = 10.7 Гц, 6H), 1.75 – 1.20 (м, 4H), 0.89 (кв, *J* = 7.5, 7.0 Гц, 6H). LC/MS (CI): m/z = 453 $[M+H]^+$.

Висновки:

1. Вдосконалено цілу низку відомих синтетичних процедур при отриманні та масштабуванні ключових сполук потенційних селективних до ACE2 хімічних зондів. В деяких випадках розроблені нові, більш ефективні підходи.
2. Збільшено виходи цільових сполук, до десятків грам, завдяки уникненню коштовних та/або високовартісних реагентів, спрощенню апаратного супроводу синтезу, тощо. Саме доступність отриманих сполук в таких кількостях робить доволі перспективним їх подальше використання.
3. Синтезовано 6-ть сполук для подальшого профілювання та використання як ефективних та селективних хімічних зондів для пригнічення ACE2.
4. За матеріалами цього пункту досліджень спільно з субвиконавцем подано до друку статтю у журналі першого квартілю – Food and Chemical Toxicology.

РОЗДІЛ 2. СТВОРЕННЯ ХІМІЧНОГО ПРОСТОРУ ТА ПОШУК НОВИХ СЕЛЕКТИВНИХ ІНГІБІТОРІВ ACE2.

Дослідження сучасних біологічних наслідків інгібування каталітичної активності ACE2 в даний час є складним через дуже обмежені дані про зв'язування малих органічних молекул з ACE2. Ця частина дослідження була спрямована на пошук найбільш перспективних молекул-кандидатів, які відповідають сучасним критеріям хімічного зонда для ACE2-рецепторів. З цією метою ми застосували віртуальний скринінг in silico у поєднанні з підходами молекулярного докінгу та молекулярної динаміки до комерційно доступних колекцій (наприклад, найбільша у світі колекція скринінгових сполук для біологічного скринінгу, Enamine Screening Collection, що містить 3,2 мільйона сполук [13]). і до бази даних синтетично доступних віртуальних сполук (база даних Enamine REAL Database (RDB), 1,4 мільярда сполук [24,25]). Процедуру приготування ліганду проводили шляхом включення водню з подальшою мінімізацією структур ліганду (виконання 3D-відображення структури, якщо необхідно). Потім ми генерували всі ліганд-протоновані стани, знайдені в зазначеному діапазоні pH 5,0–9,0. Наступні етапи приготування ліганду включали створення лише конформацій кільця з найнижчою енергією, знесолення та утворення таутомерів і стереоізомерів (по два стереоізомери на хіральний центр в ліганді).

Одним із ключових критеріїв визначення сполуки як хімічного зонда є її селективність щодо конкретної молекулярної мішені [26]. ACE2 є металопротеазою, яка функціонує як карбоксипептидаза. Також він складається з 805 амінокислотних залишків і має трансмембранний домен і одну послідовність HEXXH, яка зв'язує цинк (положення амінокислотних залишків 374–378) [27]. ACE2, з одного боку, є ферментом, який виконує описані вище функції та має ділянку функціональної активності, а з іншого боку є місцем прикріплення S-шипа SARS-CoV-2. Ці ділянки не збігаються за своїм розташуванням у білку. Щоб імітувати блокуючу дію ACE2 як ферменту, необхідно закріпити його активний центр. Таким чином, рентгенівська структура з відомим інгібітором в активному центрі ферменту є найкращою моделлю для стикування. У цій роботі ми використали такі рентгенівські структури мішеней ACE2 (код PDB: 1R4L) та ACE (код PDB: 1O86) [28]. Спочатку ми перетворили білки як хімічні речовини в об'єкти

ICM, а потім видалили всі молекули води. Емпірично додані атоми водню були додатково оптимізовані разом із білковими структурами за допомогою вбудованого модуля оптимізації структури. Крім того, ми оптимізували орієнтацію HIS, PRO, ASN, GLN і CYS. Наступні залишки були додатково оптимізовані: HIS — перевірено три стани протонування та два оберти, і залишок було перейменовано відповідно до його підтипу, HIE (епсилон таутомер) або HIP (+). ASN і GLN.

З іншого боку ACE2 – це мембранний білок з ферментативним доменом, розташованим на зовнішній поверхні клітин людини. Його назвали так, тому що спочатку він був ідентифікований як гомолог (або версія) ангіотензин-перетворюючого ферменту (АПФ). Цей фермент опосередковує утворення пептидного гормону ангіотензину II з ангіотензину I. ACE широко вивчений і добре відомий тим, що викликає судинозвужувальний ефект (тобто викликає скорочення м'язів у стінці судини та звужує її просвіт) [28] . І ACE2, і ACE є частиною ренін-ангіотензинової системи (РАС), яка регулює артеріальний тиск [29]. Крім того, каталітичний домен ACE2 на 42% ідентичний домену ACE. Хоча ACE2 є близьким гомологом ACE, його каталітична активність не блокується препаратами, які інгібують ACE. ACE діє проти ACE2, як фермент, що утворює Ang II, проти механізму деградації ACE2-Ang II. Таким чином, ACE2 каталізує перетворення ангіотензину II в ангіотензин 1–7, тим самим врівноважуючи активність ACE. Ми прагнули знайти лише високоселективні інгібітори ACE2, оскільки вони можуть мати протилежні функції. Якщо обидва білки заблоковані, ми не зможемо отримати модель ефекту SARS-CoV-2. Тому в нашому дослідженні ми визначили ACE як «антиціль» з причин, пов'язаних із селективністю [27].

2.1. Методи дослідження та програмне забезпечення.

В роботі для генерування вихідного набору (бібліотеки) сполук використовувалися стандартні методи фільтрування за структурними фільтрами, розрахунок дескрипторів, фільтрування за схожістю по Танімото, генерування decoys, молекулярний докінг, молекулярна динаміка.

Відповідні дослідження проводилися з використанням різноманітних доступних програмних пакетів: Chimera (зіставлення просторових структур, 3d-візуалізація), Python in Jupiter пакет RDKit (робота з бібліотеками,

хемоінформатичні фільтри), генерування decoys (http://dude.docking.org/generate). Скринінг *in silico* проводили за допомогою пакету програм Molsoft 3.8.6 у супроводі програми візуалізації Chimera1.14.

Молекулярну динаміку розрахували за допомогою програмного забезпечення Gromacs 2019 (версія 2019.5). Модель розчинника — SPC, форма коробки — ромбічна, розмір — 10 Å × 10 Å × 10 Å, силове полеcharmff3631. Нейтралізацію проводили шляхом додавання іонів Na+. Час моделювання—10 нс. Кількість кадрів—1000. Клас ансамблю—NPT. Температура — 300 К. Тиск (бар)—1,01325. Метод термостата — ланцюг Нозе-Гувера. Ми розслабили модельну систему перед моделюванням з часом релаксації 1 пс. Радіус відсікання взаємодії—9Å.

2.2. Порівняння сайтів зв'язування.

Після ретельної перевірки сайтів зв'язування в ACE2 та ACE ми виявили специфічні структурні відмінності, які можна використовувати для селективності та специфічності [30]. ACE2 і ACE мають ряд подібних фрагментів і сегментів, тобто обидва є цинковмісними ферментами, чутливими до аніонної активації [31–33]. Однак, на відміну від ACE, ACE2 діє як карбоксипептидаза і не чутливий до інгібування класичними інгібіторами ACE [30].

Порівняння сайтів зв'язування білка та ліганду дає цінне уявлення про ще не вивчені подібності сайтів. Ці знання можуть бути корисні на різних етапах обчислювальної та хімічної біології. Пошук передбачуваних неактивних сайтів та встановлення поліфармакологічних ефектів шляхом порівняння сайтів зв'язування привели до багатообіцяючих результатів для численних проектів [34]. Хоча порівняння сайтів зв'язування тепер можна отримати зі баз подібності [35], часто доцільно проводити додаткові порівняння, і це може бути навіть необхідним, якщо використовуються нові не відомі структури структури [36]. Порівняння сайтів зв'язування можна застосувати для дослідження незначних відмінностей між еволюційно пов'язаними сайтами зв'язування, а також для виявлення подібності між білками, які не мають очевидної глобальної (послідовності чи структурної) схожості.

Ретельна перевірка активних сайтів виявила дві пари фрагментів, що лежать у протилежних областях і відіграють ключову роль у зв'язуванні білків: амінокислотний залишок TYR510 в ACE2 проти VAL518 в ACE і, що найважливіше, ARG273 проти GLN281. Тринадцять із цих залишків активних центрів зберігаються в ферментах ACE2 і ACE: GLU145/GLU162, CYS344/CYS352, HIS345/HIS353, CYS361/CYS370, ASP368/ASP377, HIS374/HIS383, GLU375/GLU384, HIS378/HIS387, GLU402/GLU411, PHE504/PHE512, HIS505/HIS513, ARG514/ARG522 and TYR515/TYR523.

Ця структурна подібність призводить до майже ідентичного способу розташування XX5 і LPR при порівнянні активних сайтів. TYR510 і THR347 вибудовують гідрофобну підкишеню ACE2 і дозволяють цьому субсайту вміщувати лише бічні ланцюги малого та середнього розміру, що узгоджується з відомими перевагами субстрату. У суперпозиції структур ACE2, зв'язаного з ORE-1001, і зв'язаного з лізиноприлом ACE, фенольна група TYR510 ACE2 займає простір, де розташована фенілпропілова група лізиноприлу (рисунок 2.2.1).

Іншою істотною відмінністю між ACE2 і ACE є заміна ARG273 на GLN281 (Рисунок 2.2.2). Гуанідінієва група ARG273 утворює сольовий міст з кінцевою карбоксильною групою ORE-1001. Важливо, що гіпотеза про те, що ARG273 відповідає за зв'язування лігандів з ACE2, була експериментально доведена шляхом заміни аргініну на залишок глутаміну (мутація R273Q) за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу, що негайно призвело до втрати спорідненості відомих інгібіторів до рецептора. [30].

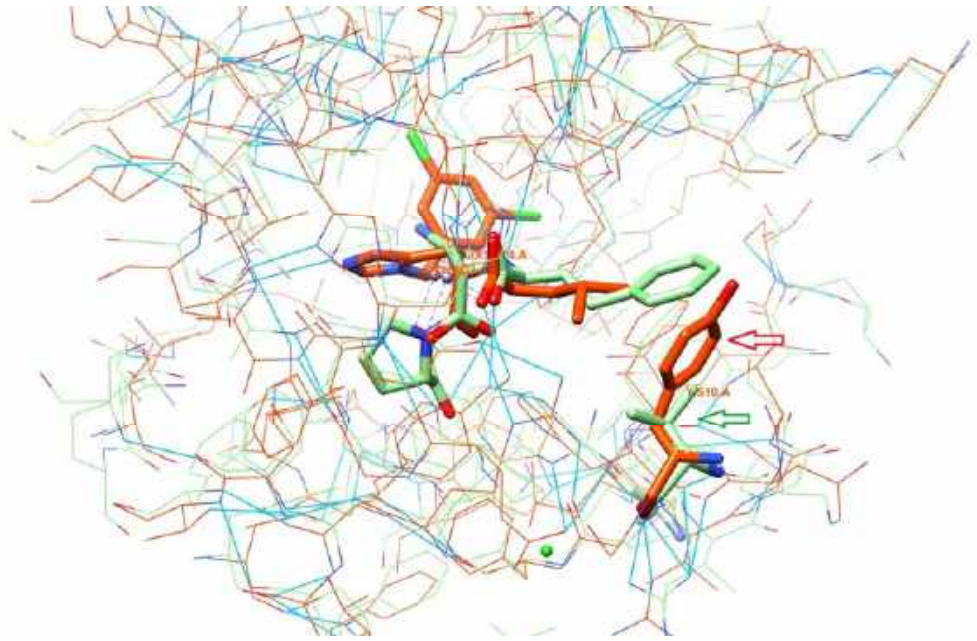


Рисунок 2.2.1. Порівняння сайтів зв’язування ACE2 і ACE. У зелені фрагменти - ACE з лігандом лізиноприлом (код PDB: 1O86/LPR), оранжеві - ACE2 з лігандом ORE-1001 (код PDB: 1R4L/XX5), синій — водневі контакти. Зелена та оранжева стрілки вказують на VAL518 та TYR510 у ACE та ACE2 відповідно.

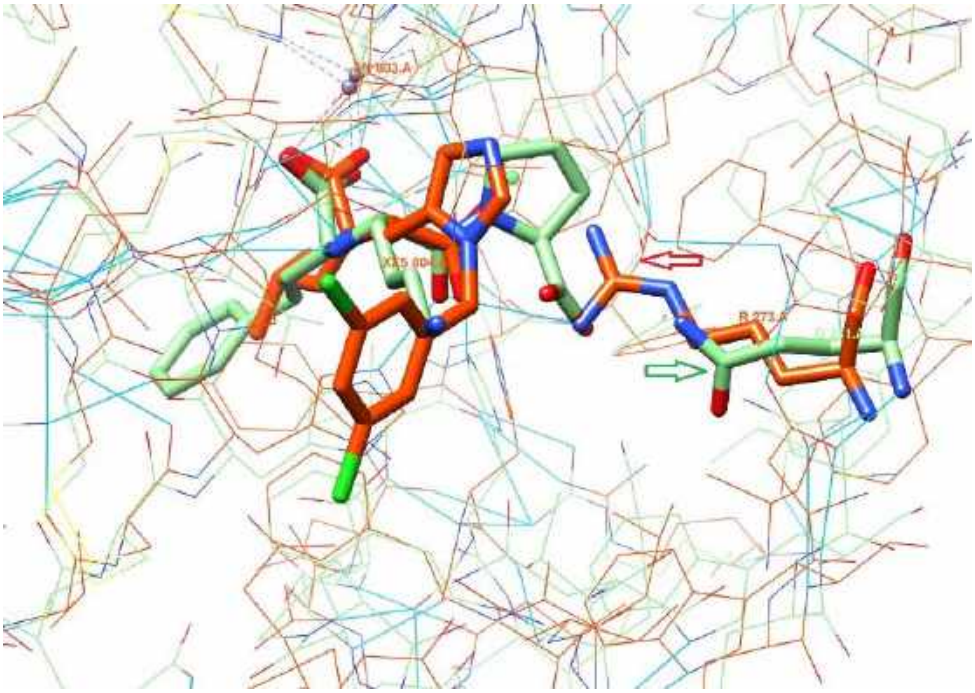


Рисунок 2.2.2. Порівняння сайтів зв’язування ACE2 і ACE. У зелені фрагменти - ACE з лігандом лізиноприлом (код PDB: 1O86/LPR), оранжеві - ACE2 з лігандом ORE-1001 (код PDB: 1R4L/XX5), синій — водневі контакти. Зелена та оранжева стрілки вказують на GLN281 та ARG273 у ACE та ACE2 відповідно.

Ця суттєва різниця між вищезгаданими залишками в гомологічно подібних ферментах допомагає пояснити, чому потужні інгібітори ACE, тобто лізиноприл, еналаприлат і каптоприл, неактивні проти ACE2 [37]. Взаємодія, визначена вище між ключовими залишками в активних сайтах ACE2 і ACE, очевидно, відіграє значну роль у спостережуваній невідповідності в специфічності субстрату та профілях зв'язування інгібіторів для цих гомологічних ферментів.

2.3. Розробка докінгової моделі.

Рентгенівську структуру цільового білка було обрано та підготовлено до докінгу за такими критеріями: якісна роздільна здатність (1,5–2,5 Å), наявність активного ліганду в кристалі, організм: Homo sapiens, дата видання та рейтинг журналу. Підготовка білка починалася з перетворення білка в об'єкт ICM. Тут об'єкт ICM - це конкретна «внутрішня» назва молекулярного об'єкта (використовується тільки в програмному забезпеченні MOLSOFT, Сан-Дієго, Каліфорнія, США), яке зазвичай утворюється після підготовки білкової структури для стикування. Ми видалили всі молекули води, а потім використали опцію «Оптимізувати водень», щоб уточнити орієнтацію та заряди залишків HIS, PRO, ASN, GLN та CYS. Структура білка була підготовлена (усі можливі стани генерувалися при pH = 7,4±0,2) та мінімізована в силовому полі розробленому Мерком (MMFF) [38] (важкі атоми зміщуються не більше ніж на 0,3 Å). Зрештою, ми створили докінгові моделі ACE2 та ACE та оптимізували їх з урахуванням наведених нижче налаштувань, детально пояснених нижче.

Критерії обмежень для ACE2:

(1) Перша модель:

- ARG273 - обмеження взаємодії: обов'язковий водневий зв'язок;
- область біля TYR510 є позиційним/дистанційним обмеженням сферичної форми з радіусом 2 Å;
- іонна взаємодія з Zn^{2+}.

(2) Друга модель:

- ARG273 - два обмеження положення/відстані - дві сфери радіусом 1 Å для позначення положень атомів кисню в протийонній карбоксильній групі;

- область біля TYR510 є позиційним/дистанційним обмеженням сферичної форми з радіусом 2 Å;

- іонна взаємодія з Zn^{2+}.

Критерії обмежень для ACE:

- іонна взаємодія з Zn^{2+};

- LYS511 - обов'язковий водневий зв'язок.

Детальні візуалізації отриманих моделей представлені на рисунках 2.3.1 і 2.3.2.

Для перевірки докінгових моделей були відібрані всі ліганди з бази даних ChEMBL (https://www.ebi.ac.uk/chembl/, доступ від 21 липня 2021 року) з експериментально виміряною активністю - Ki або IC50. Всього було 62 ліганди (див. Додаток 1).

Щоб налаштувати наші моделі стикування, ми скористалися безкоштовним онлайн-сервісом - каталогом корисних приманок (DUD) [32]. Для кожного відомого еталонного ліганду було відібрано 100 відповідних за властивостями «приманок»-молекул, що дало загалом 6200. Усі попередньо створені моделі були перевірені шляхом скринінгу *in silico* щодо наборів еталонних інгібіторів та відповідних приманок. В результаті ми отримали різні набори для налаштування моделей. Далі ми досліджували їхнє збагачення, зазвичай, дивлячись на криву ROC, криву logROC або LogAUC одного набору над іншими. Найпоширеніший метод використовує ліганди замість приманок, що відповідають властивостям. Якщо ціль працює добре, загальне ставлення полягає в тому, що майбутній віртуальний скринінг буде працювати добре [39].

Розрахунок збагачення лігандів і приманок було вибрано як кодове ім’я для способу оцінки того, наскільки добре працює програма стикування щодо цікавить цілі (або набору цілей). Приманки – це набір молекул, які (ймовірно) не зв’язуються з ціллю. Проте вони підібрані таким чином, щоб тісно відповідати фізико-хімічним властивостям еталонних молекул (наприклад, MW, LogP, HBA, HBD тощо).

Зрештою, якщо оцінка стикування лігандів перевершує оцінку стикування приманок, цей факт є хорошим показником того, що модель має певну силу прогнозування, що дозволяє розрізняти їх.

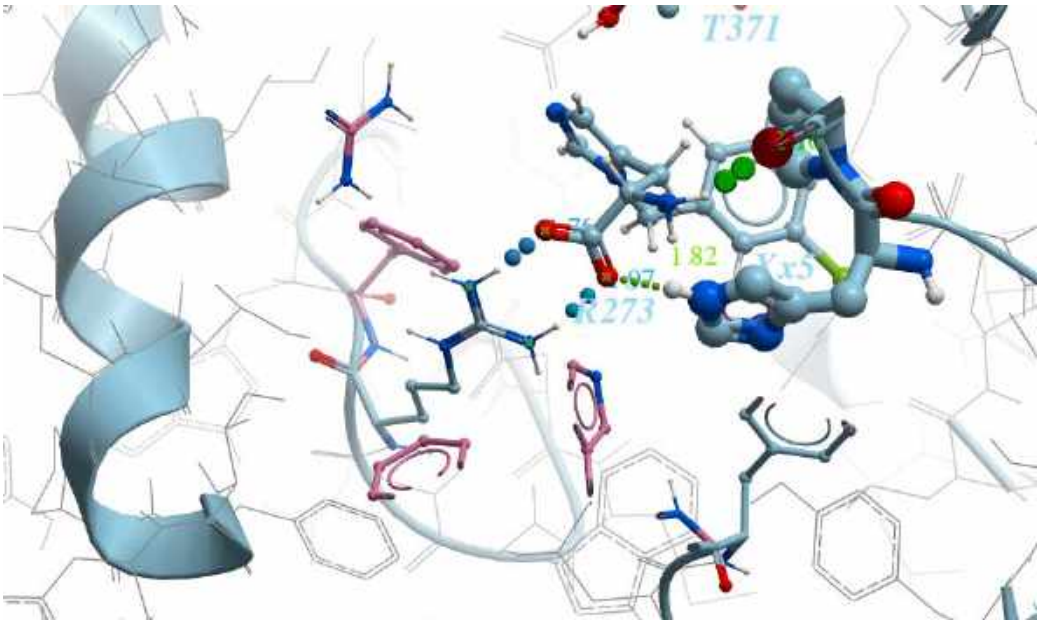


Рисунок 2.3.1. Модель сольового зв’язування ARG273 і карбоксильною групою (перша модель ACE2).

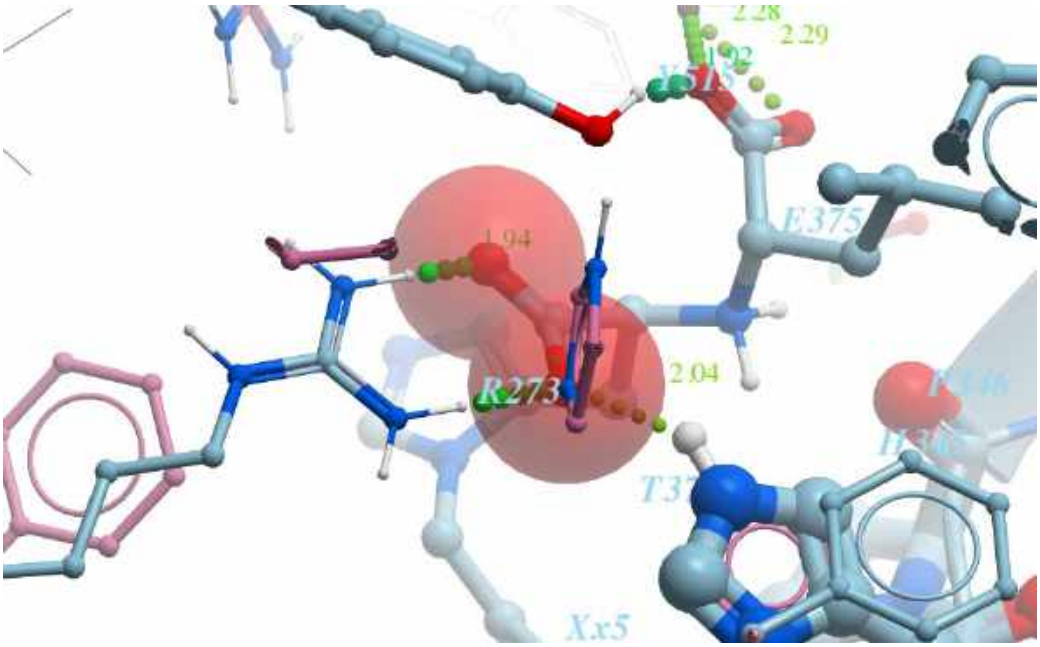


Рисунок 2.3.2. Обмеження відстані за допомогою двох сфер радіусом 1 Å, розміщених навпроти атомів азоту ARG273 (друга модель ACE2).

2.4. Молекулярний докінг, валідація докінгових моделей.

Ми виконали молекулярний докінг з низьким і стандартним рівнями зусиль за наведеними вище моделями (підрозділ 2.3), а саме:

1. Сфера поблизу TYR510 – з будь-яким гідрофобним атомом (20 патернів);

2. H-зв'язок Zn^{2+} - з будь-яким акцепторним атомом водню (30 патернів);

3. ARG273 - Перша модель (Grid-1), з будь-яким атомом-акцептором водневого зв'язку. Друга модель (Grid-2) має інший атом кисню в обох сферах.

Для моделювання було подано чотири набори параметрів:

Модель-1 і рівень зусилля докінгу 1.

Модель-2 і рівень зусилля докінгу 1.

Модель-1 і рівень зусилля докінгу 5.

Модель-2 і рівень зусилля докінгу 5.

Все це було додатково оцінено шляхом розрахунку коефіцієнта збагачення. Криві накопичення широко використовуються для відображення показників рейтингу. Нині використовується багато показників для оцінки ефективності методів ранжирування у віртуальному скринінгу (VS), наприклад, площа під кривою робочої характеристики приймача (ROC) і площа під кривою накопичення (AUAC). AUAC можна інтерпретувати як ймовірність того, що активні сполуки, визначені упорядкованим за рангом списком, будуть ранжовані перед сполукою, випадково обраною з рівномірного розподілу. Значення обмежене від 1 до 0, причому 1 є ідеальною продуктивністю скринінгу [40].

Далі ми проводили оцінку збагачення скринінгу з набором активних лігандів і набором приманок. Розрахована площа під кривою накопичення (AUAC = 0,94) вказує на те, що ми побудували майже оптимальні моделі. Порівнюючи результати, ми бачимо, що сферичні позиційні обмеження поблизу ARG273 призводять до більш точної моделі стикування порівняно з ARG273-H-зв’язком для обох зусиль докінгу. Тому, враховуючи це, ми обрали Модель-2 як найкращу модель для подальших масштабних скринінгових запусків (рисунок 2.4.1).

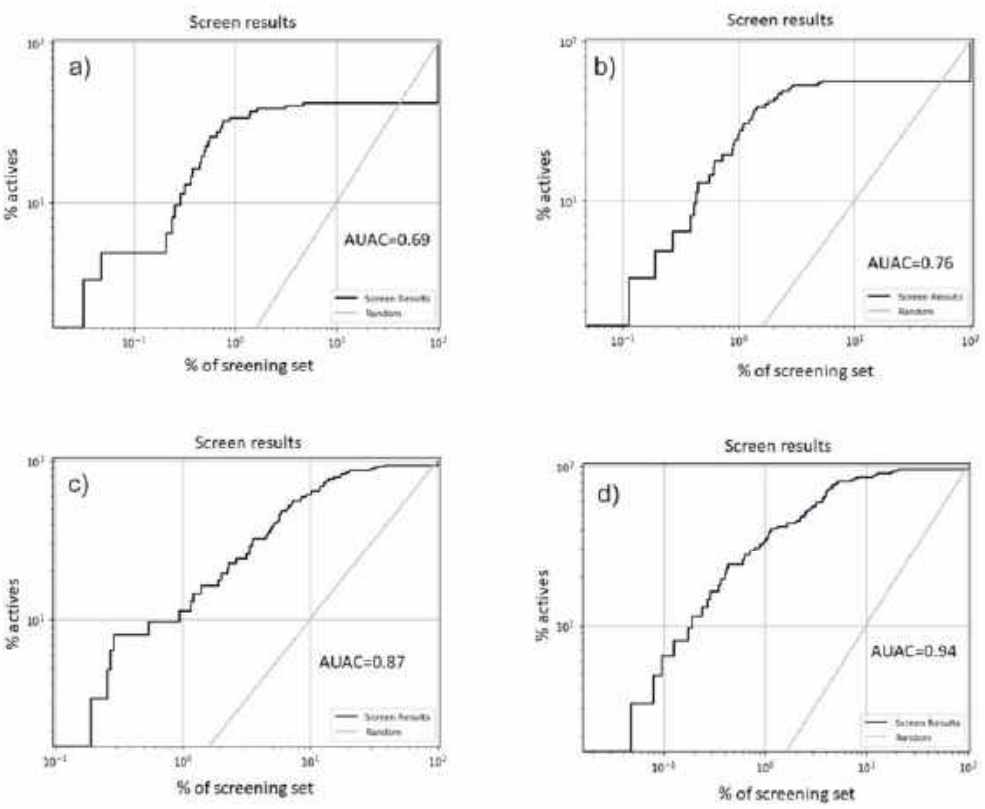


Рисунок 2.4.1. Криві ROC для чотирьох результатів стикування. (a) Перший набір: Модель-1 і рівень зусилля докінгу 1. Площа під кривою накопичення: 0,69. (b) Другий набір: Модель-2 і рівень зусилля докінгу 1. Площа під кривою накопичення: 0,76. (c) Модель-1 і рівень зусилля докінгу 5. Площа під кривою накопичення: 0,87. (d) Модель-2 і рівень зусилля докінгу 5. Площа під кривою накопичення: 0,94.

2.5. Робочий процес скринінгу для “Enamine Stock Compound Collection” (Enamine SCC, 3.2 Million Compounds)

З’єднання надвеликих бібліотек відкриває нові можливості і водночас несе нові виклики. Докінг перевіряє пристосування кожної молекули бібліотеки до сайту зв’язування білка в процесі, який часто включає вибірку від сотень тисяч до мільйонів можливих конфігурацій. Щоб бути здійсненним для бібліотеки з мільярдом молекул на комп’ютерних кластерах помірного розміру (наприклад, 500–1000 ядер), цей розрахунок має споживати не більше 1 с/молекулу/ядро. Ця потреба в швидкості означає, що обчислення не можуть дозволити собі рівень деталізації та кількість термінів взаємодії, які були б необхідні для досягнення

хімічної точності. [41] Ця частина роботи спрямована на розробку та тестування робочого процесу для бібліотеки середнього розміру на ресурсоємкість, для подальшої розробки ефективного підходу до великомасштабного стикування, у нашому випадку для перевірки набору баз даних Enamine REAL (1,4 млрд).

Під час роботи з величезними наборами даних, що є частиною цього віртуального скринінгового дослідження, оптимізація доступних обчислювальних ресурсів із збереженням точності передбачення стає вирішальним фактором у побудові робочого процесу проекту. У цьому дослідженні ми модифікували загальний підхід, нещодавно запропонований Халгреном (Halgren) та його співробітниками для скринінгу великої бази даних [42]. Тому для скринінгу Enamine SCC ми використали наступний покроковий алгоритм (Рисунок 2.5.1):

- Фільтрація за підструктурою SMARTS, пошук молекул принаймні з однією карбоксильною групою;
- Застосування набору стандартних мед-хімічних фільтрів: PAINS (фрагменти, зазначені як PAINS), BRENK (потенційні токсичні причини), NIH і ZINC (небажані функціональні групи) і LILLY (потенційно реактивні або неперспективні сполуки) [43,44];
- Виконання молекулярного докінгу на мінімальному рівні теорії з відстеженням умовної оцінки взаємодії для критичних амінокислотних залишків;
- Молекулярний докінг із середньою точністю, а потім результати ранжирування за енергією взаємодії лігандів з ключовими залишками мішені;
- Проведення візуального огляду поз і вибір набору з 100 молекул з найкращим розташуванням у кишені для скріплення.

Істотні моменти, які були враховані під час вибору найкращих кандидатів:

- Точність і відносна відстань до ARG273;
- Точність і відносна відстань до Zn^{2+};
- Положення гідрофобної частини ліганду в безпосередній близькості від TYR510 (рисунки 2.5.2 і 2.5.3);
- Наявність водневого зв'язку з PRO346.

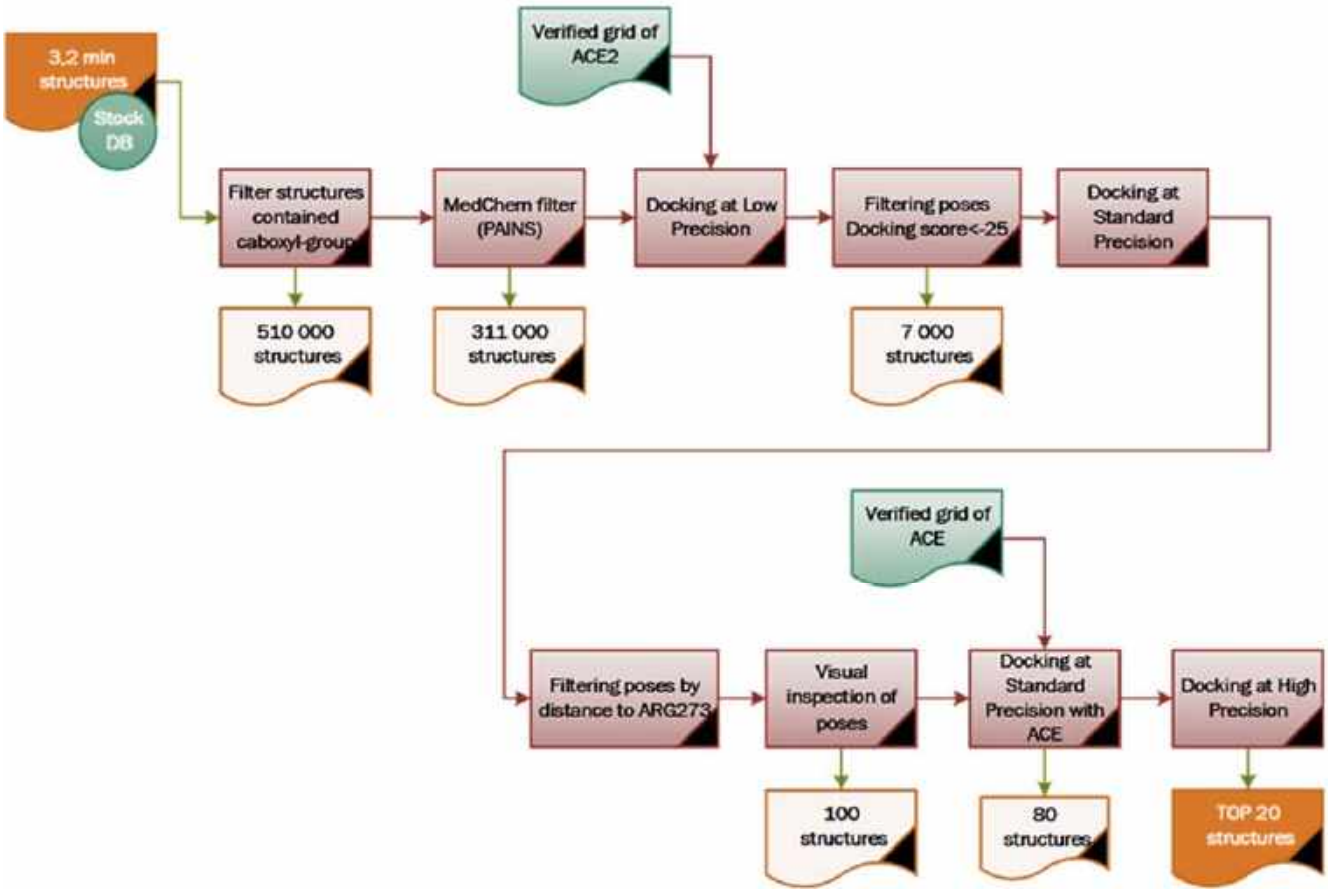
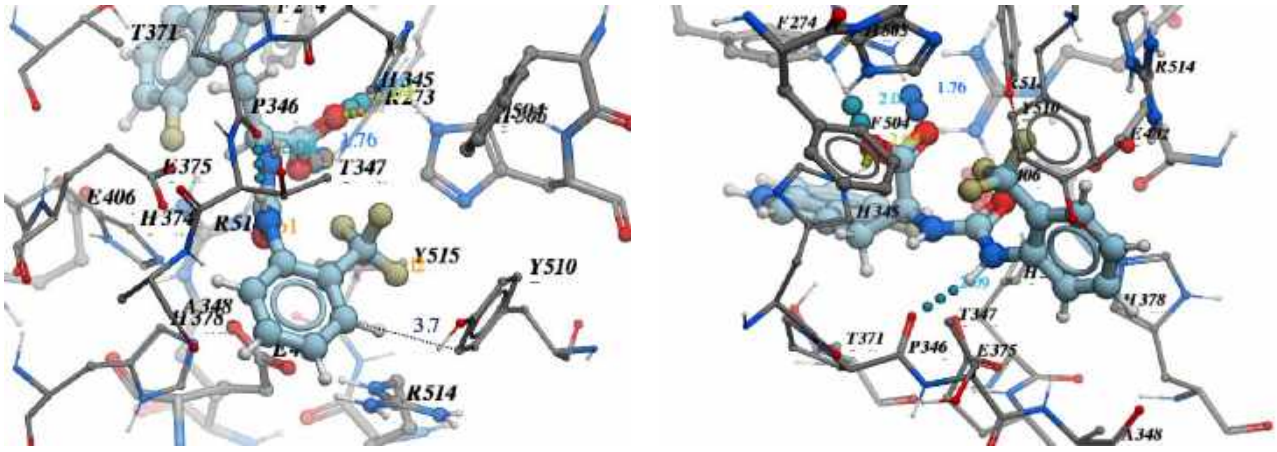


Рисунок 2.5.1. Робочий процес віртуального скринінгу для Enamine SCC (3,2 мільйона сполук).



(**a**) (**b**)

Рисунок 2.5.2. Важливі критерії відбору найкращих кандидатів: (a) положення гідрофобної частини ліганду поблизу TYR510; (b) наявність водневого зв'язку з PRO346.

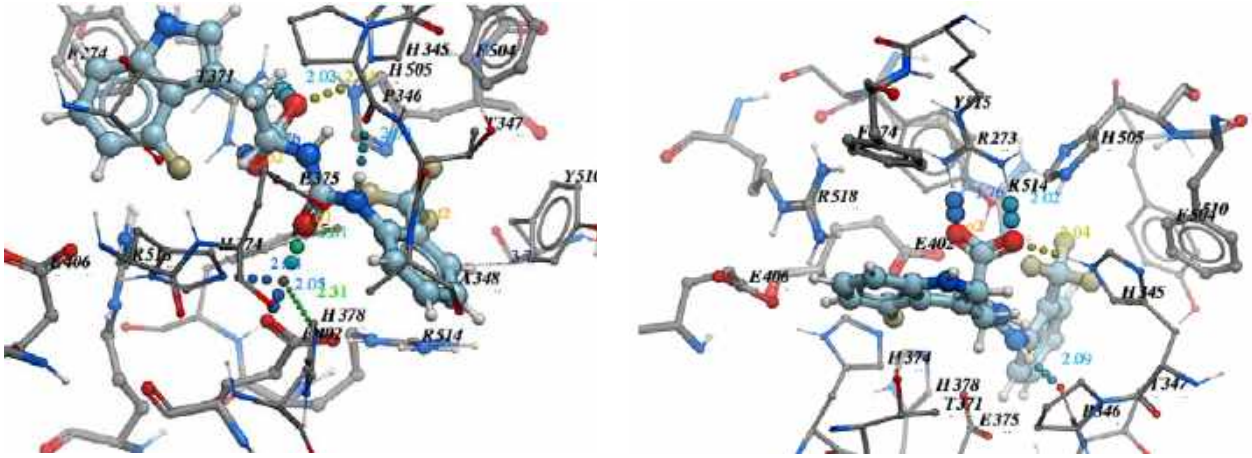


Рисунок 2.5.3. Важливі критерії відбору найкращих кандидатів: (a) точність відносно ARG273; (b) точність відносно Zn^{2+}.

У робочому процесі віртуального скринінгу з ESCC (3,2 мільйона сполук) 100 найкращих сполук були в кінцевому підсумку відібрані для приєднання до ACE. Оцінка селективності, що супроводжується ще одним раундом стикування на високому рівні точності, з подальшим візуальним оглядом, дозволила нам звузити вибір до 20 сполук-кандидатів (див. Додаток 2).

2.6. Робочий процес скринінгу для «Enamine REAL Database Set» (Enamine RDB, 1.4 Billion Compounds)

Методи віртуального скринінгу (VS) є сучасною тенденцією в медичних дослідженнях для відкриття нових лікарських засобів [45]. Широкомасштабні VS сьогодні є стандартним кроком перед експериментами в реальній лабораторії для виявлення ліків [46,47]. Широкомасштабні обчислювальні технології забезпечили високопродуктивний віртуальний скринінг із залученням від тисяч до мільярдів кандидатів. Однак для вчених-біохіміків непросто оцінювати технічні альтернативи та їх наслідки для проведення таких великих експериментів [46]. Важливо оптимально використовувати час обчислювальних команд і наявні обчислювальні ресурси. Коли ми плануємо кілька розумних робочих процесів і впорядковуємо процеси скринінгу, можна дати можливість хімікам і нашим обчислювальним засобами працювати розумніше, а не важче. Управління віртуальним скринінгом передбачає організацію, адміністрування та керування великими обсягами як структурованих, так і неструктурованих даних. Його мета -

забезпечити високий рівень результатів скринінгу за допомогою розумної кількості ресурсів.

Наші зусилля щодо управління віртуальним скринінгом з використанням експериментальних даних базувалися на наступному. Загальний час ЦП, витрачений на скринінг бібліотеки лігандів, можна покращити за допомогою оптимізації плану скринінгу шляхом комбінування різних методів та інструментів скринінгу. Ідея полягає в тому, щоб знайти тонкий баланс між точними, але дорогими в обчислювальному відношенні методами і грубими, але дешевими для обчислень.

Щоб порівняти наші розрахунки док-станції та оцінити потенціал масштабування, ми використали невеликий набір тестових молекул. Тому ми підключили набір із 250 з'єднань (підготовлених у форматі 3D-sdf), використовуючи лише одне ядро ЦП з трьома різними рівнями зусиль: низького рівня 1, стандартного рівня 5 та високого рівня 10. Результати тесту показані в Таблиця 2.6.1.

Таблиця 2.6.1. Результати вимірювань обчислювальних можливостей[1].

Level of Effort	CPU	Number of Ligands	Time, min	Min Per Ligand
1	1	250	31	0.124
5	1	250	110	0.44
10	1	250	220	0.88

[1] Технічна інформація робочої станції для тестування, на якій проводилися вимірювання: 1. ЦП: Intel (R) Core (TM) i5-9600K CPU @ 3,70 ГГц; 2. 16 ГБ оперативної пам'яті; 3. Операційна система: Ubuntu 20.04.3 LTS.

Крім того, ми спланували та оцінили час процесора, необхідний для реалізації кожного з трьох планів скринінгу. Детальний опис дорожніх карт RM1, RM5 та RM10 наведено в таблицях 2.6.2-2.6.4.

У таблиці 2.6.5 порівнюються переваги правильного планування сринінгової програми.

Як видно з розрахунків, правильна дорожня карта скринінгу та розумне управління можуть значно заощадити процесорний час (до 2000 разів). Тому ми обрали RM3, який показав найкращі витрати ресурсів та результативність. Використовуючи протокол скринінгу, RM3 дозволяє опрацьовувати ще більш

великі бібліотеки розміром до 40 мільярдів сполук. Наприклад, на звичайному обчислювальному вузлі з 40 ядер Enamine RDB з 1,4 мільярдами сполук було оброблено за 25 годин. Таким чином, приблизний час, необхідний для обробки бібліотеки з 40 мільярдів сполук, становитиме 721 годину (близько місяця). Цей термін повністю відповідає звичайній практиці широкомасштабних скринінгових кампаній з виявлення ліків. У той же час дотримання протоколу скринінгу RM1 на 40-ядерному вузлі займе приблизно 662 024 години (86 місяців), а за протоколом RM2 – 6213 годин (8 місяців) відповідно. Слід зазначити, що наведені вище розрахунки є оціночними і не враховують людський фактор і ризики технічних збоїв.

Таблиця 2.6.2. Базова дорожня карта RM1.

Description of the Step	Number of Structures Left	CPU time (min)
INPUT	1.41 bln	-
MedChem filter (PAINS, etc.)	1.2 bln	1800
Ligand docking at low effort (1.)	100000	148,800,000
Ligand docking at standard effort (5.)	10000	44,000
Ligand docking at standard effort (5.) with ACE	9000	4400
Ligand docking at high effort(10.)	200	7920
Sort pose by docking score and visual inspection	20	-
Total CPU time (min)	-	148,858,120

Таблиця 2.6.3. Поглиблена дорожня карта RM2.

Description of the Step	Number of Structures Left	CPU time (min)
INPUT	1.41 bln	-
Diversification 1/10	141 mln	1800
MedChem filter (PAINS, etc.)	120 mln	1800
Ligand docking at low effort (1.)	-	14,880,000
Sort poses by distance to ARG273, TYR510, PRO346	50,000	-
Ligand docking at standard effort (5.)	-	22,000
Sort poses by distance to ARG273, TYR510, PRO346	5000	-
Ligand docking at standard effort (5.) with ACE	4500	2200

Ligand docking at high effort(10.)	100	3960
Sort poses by docking score and visual inspection	20	-
Total CPU time (min)	-	14,909,960

Таблиця 2.6.4. Оптимальна дорожня карта RM3.

Description of the Step	Number of Structures Left	CPU time (min)
INPUT	1.41 bln	-
Filter structures contained carboxyl-group	141 mln	600
Diversification	120 mln	600
Ligand docking at low effort (1.)	-	3720
Sort poses by distance to ARG273, TYR510, PRO346	50000	-
Visual inspection of poses	-	-
Similarity searching by Morgan FP	5000	2250
Ligand docking at standard effort (5.)	4500	53,240
Sort poses by distance to ARG273, TYR510, PRO346	100	
Sort poses by docking score and visual inspection	20	-
MedChem filter (PAINS, etc.)		-
Ligand docking at standard effort (5.) with ACE		46.2
Ligand docking at the level of effort (10.)		92.4
Total CPU time (hours)	-	60,548.6

Таблиця 2.6.5. Переваги правильного планування скринінгової програми.

Comparison of the Estimations of CPU Time Required for Roadmaps	Difference (Number of Times)
RM1 vs. RM2	10
RM1 vs. RM3	2458
RM2 to RM3	246

Скринінг Enamine RDB проводили з використанням алгоритму, вибраного з верхньої оцінки. Це було виконано за аналогічним алгоритмом з незначними модифікаціями (Рисунок 2.6.1):

- Після першої SMARTS фільтрації (на наявність карбоксильних груп) було знайдено 29 мільйонів сполук. Враховуючи розмір набору, ми використовували підхід хімічного різноманіття (подібність Танімото між молекулами,

представленими за допомогою фінгерпринтів Моргана [49]). Це звузило набір до 30 000 речовин. Після виконання стикування тридцятитисячного набору було відібрано 50 сполук на основі їх оцінки стикування та результатів візуального огляду. Для цих сполук ми виконали пошук подібності на основі форми за допомогою методу USRCAT (Ultrafast Shape Recognition with Credo Atom Types) [50], а потім вибрали ті з подібністю Tanimoto 0,4 або вище. Наш набір для скринінгу на цьому етапі став більшим, близько 121 тис. сполук.

- Наступним кроком було молекулярне стикування на рівні низьких зусиль 1 з використанням перевіреної моделі. Результати відфільтровували за балом докингу < -25, залишаючи 28 000 лігандів.
- Наступним кроком у нашому скринінгу було молекулярне стикування на рівні стандартного зусилля 5 з використанням перевіреної моделі. Для більш продуктивного віртуального перегляду він також був спочатку відфільтрований за значенням найближчої відстані в аналізаторі контактів (ARG273), (TYR510), (PRO346). Потім бібліотека була відсортована за оцінкою стикування та «вибіркою» за тими ж критеріями цінності, що й для роботи з фондовою базою.
- Після розрахунку ChemFilters (PAINS, LILLY, IN, США) та скринінгу сполук у нас залишилося 105 лігандів.
- Для перевірки можливої неселективності лігандів по відношенню до ACE ми провели молекулярне сполучення отриманих сполук TOP105 з мішенню ACE. Лише одне з'єднання показало оцінку більше 25, але поза в ньому була неприродною. Тому ми не відкидали ці сполуки.
- 105 сполук було досліджено за допомогою молекулярного докінгу з високим рівнем зусилля (рівень 10) з високою точністю. Використана модель була такою ж, як та, що використовувалася раніше в цій роботі. Завдяки експертній оцінці, звернувши увагу на значення балів, було знайдено 20 провідних сполук для специфічних взаємодій з важливими залишками.

Нарешті, 105 найкращих сполук, відібраних з набору RDB, були оброблені, як описано вище, що призвело до 20 багатообіцяючих ударів (див. Додаткові матеріали, Таблиця S2).

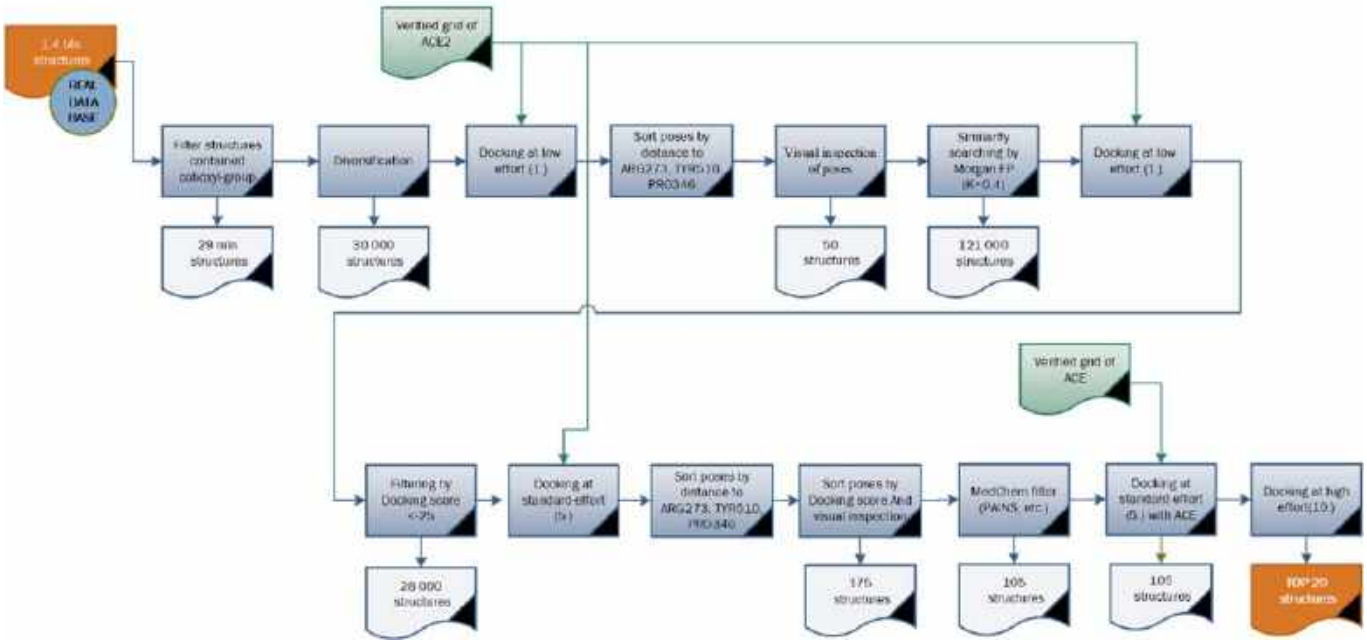


Рисунок 2.6.1. Робочий процес віртуального скринінгу для Enamine RDB (1,4 мільярда сполук).

2.7. Дослідження молекулярної динаміки.

Нарешті, молекулярно-динамічне моделювання відібраних лігандів тривалістю 10 нс показало хорошу стабільність комплексів господар-гість, що вказувало на значні шанси демонстрації активності in vitro. Схема моделювання молекулярної динаміки врахувала доступну обчислювальну потужність. Розмір моделювання (кількість частинок), крок у часі та загальна тривалість часу були обрані таким чином, щоб розрахунок можна було завершити протягом розумного періоду. Однак моделювання було достатньо тривалим, щоб відповідати часовій шкалі природних процесів, що вивчалися. Щоб зробити статистично обґрунтовані висновки з моделювання, час змодельованого періоду відповідав кінетиці природного процесу.

Тому ми вирішили провести молекулярно-динамічні розрахунки з тривалістю 10 нс. Метою було більш надійне обґрунтування відібраних лігандів і доказ того, що важливі взаємодії зберігаються протягом тривалого періоду в

процесі еволюції системи. Три найкращі ліганди були відібрані для молекулярно-динамічних досліджень.

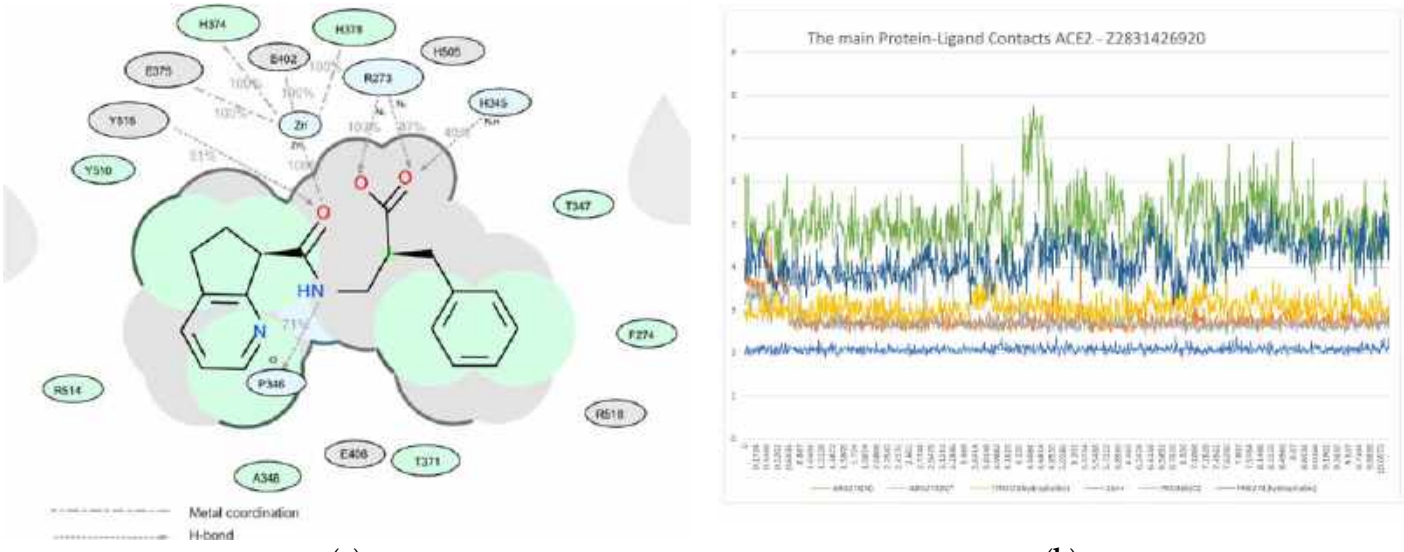
Під час аналізу траєкторії MD ми зосередилися на наступному:

(1) RMSD положення ліганду в комплексі під час виконання MD;

(2) Оцінка кількості ключових контактів між лігандом і білком у кожній точці протягом динамічного періоду; і

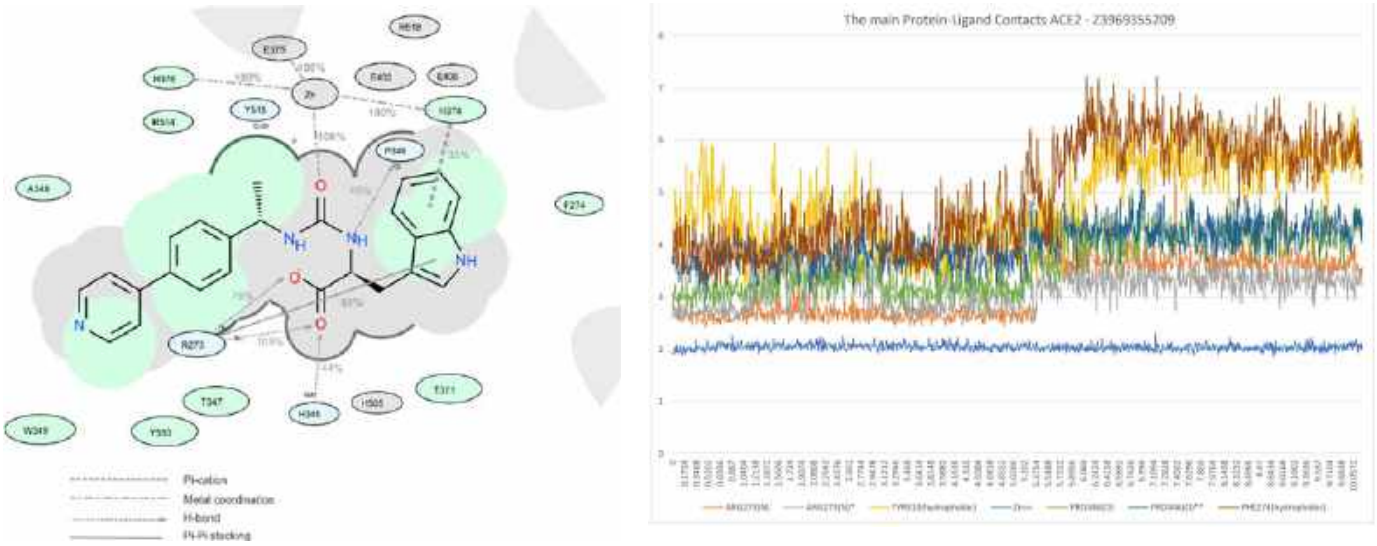
(3) Еволюція специфічних ліганд-білкових взаємодій за час життя вздовж траєкторії MD.

Серед усіх взаємодій протеїн-ліганд (або «контакти») ми зосередилися на наступних чотирьох типах: водневі зв'язки, координація металів, Pi–катіон та Pi–Pi стекінг. Складені стовпчасті діаграми нормалізуються по траєкторії; наприклад, значення 0,7 означає, що конкретна взаємодія присутня протягом 70% часу моделювання. Значення більше 1,0 можливі, оскільки деякі залишки білка можуть утворювати множинні контакти одного підтипу з лігандом. Схеми детальних взаємодій атомів ліганду із залишками білка нами представлені на малюнках 2.7.1-2.7.3. Встановлено, що взаємодії відбуваються протягом більше 30,0% часу моделювання на обраній траєкторії (від 0,0 до 10,2 нс).



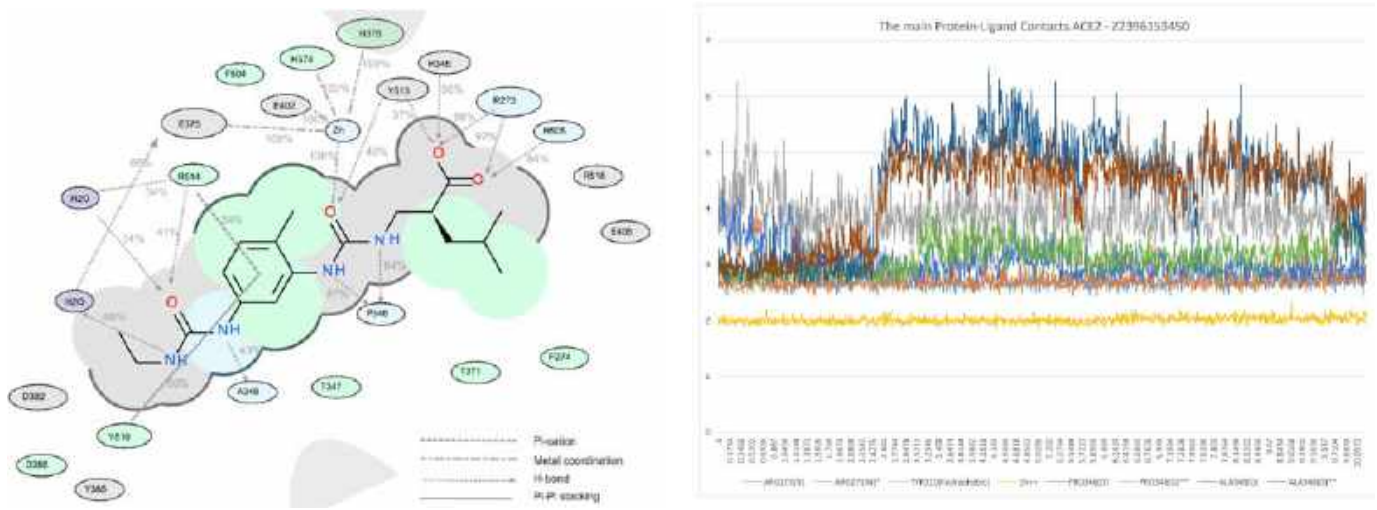
(**a**) (**b**)

Рисунок 2.7.1. Детальна схема взаємодії атомів ліганду (Z2831426920) із білковими залишками: (a) узагальнене графічне зображення взаємодій і контактів (H-зв'язки, гідрофобні, іонні, водневих містки); (b) схема, що показує еволюцію відстані (в Å) між лігандом і залишками.



(**a**) (**b**)

Рисунок 2.7.2. Детальна схема взаємодії атомів ліганду (Z3969355209) із білковими залишками: (a) узагальнене графічне зображення взаємодій та контактів (H-зв'язки, гідрофобні, іонні, водні містки); (b) схема, що показує еволюцію відстані (в Å) між лігандом і залишками.

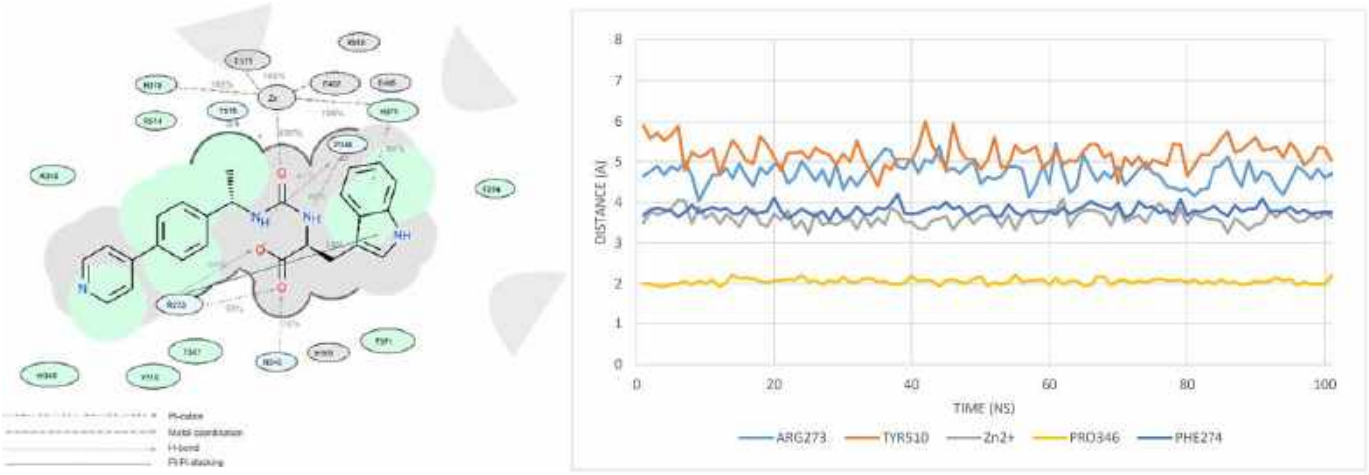


(**a**) (**b**)

Рисунок 2.7.3. Детальна схема взаємодії атомів ліганду (Z2396153450) із білковими залишками: (a) узагальнене графічне зображення взаємодій і контактів (H-зв'язки, гідрофобні, іонні, водні містки); (b) схема, що показує еволюцію відстані (в Å) між лігандом і залишками.

Ми вирішили підтвердити обґрунтованість нашого вибору для тривалості моделювання молекулярної динаміки обраних лігандів (10 нс). Для цього ми провели аналогічні дослідження тривалістю 100 нс з використанням одного з топ-лігандів (Z3969355209). Результати узагальнено на Рисунок 2.7.4.

Крім того, середньоквадратичне відхилення (RMSD) певних атомів у молекулі відносно еталонної структури було розраховано за допомогою підгонки структури до еталонної структури за методом найменших квадратів. Синій графік (P_RMSD) показує еволюцію RMSD білків. Усі білкові каркаси в першу чергу були вирівняні з каркасом, а потім було обчислено RMSD. Зміни порядку 1-3 Å цілком прийнятні для малих глобулярних білків. Ліганд RMSD (L_RMSD) вказує, наскільки стабільний ліганд щодо білка та його зв'язуючого кишені. Якщо спостережувані значення значно перевищують RMSD білка, то, ймовірно, ліганд дифундував зі свого вихідного сайту зв'язування. У нашому випадку значення RMSD білка та ліганду не перевищували 2,5-3 А від початкової рамки, що свідчить про стабільність комплексу (Рисунок 2.7.5) [51].



(a) (b)

Рисунок 2.7.4. Детальна схема взаємодії атомів ліганду (Z3969355209) із білковими залишками (100 нс): (a) узагальнене графічне зображення взаємодій та контактів (H-зв'язки, гідрофобні, іонні, водневі містки); (b) схема, що показує еволюцію відстані (в Å) між лігандом і залишками.

Крім того, ми розрахували середньоквадратичну флуктуацію (RMSF) як корисний індикатор локальних змін у положенні атомів ліганду та вздовж білкового ланцюга. Було побудовано стандартне відхилення (RMSF). Піки на цій діаграмі вказують на ділянки білка, які найбільше коливались під час моделювання [52]. Ліганд RMSF пояснює, як фрагменти ліганду взаємодіють з білком та їхню ентропійну роль у події зв'язування. На рисунку 2.7.6 показано ці зміни в білках (a) і лігандах (b) відповідно до атомної нумерації в ліганді.

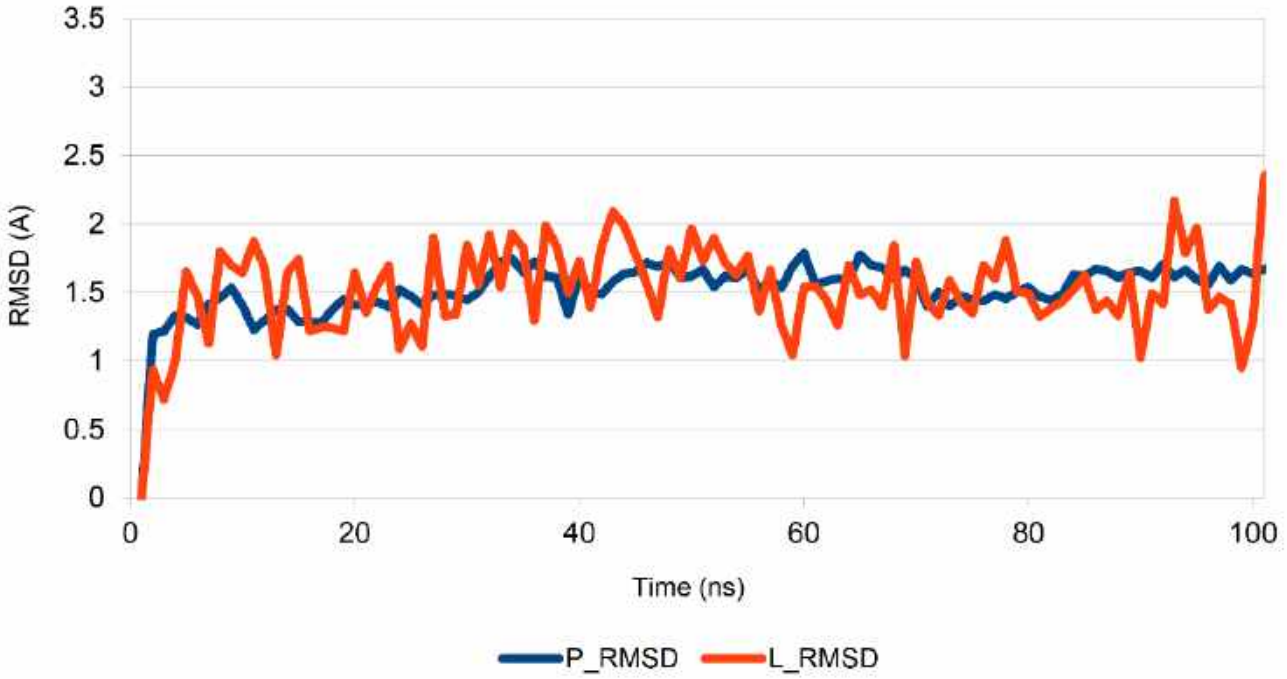


Рисунок 2.7.5. Ділянки білка та ліганду RMSD комплексу (ACE2-Z3969355209).

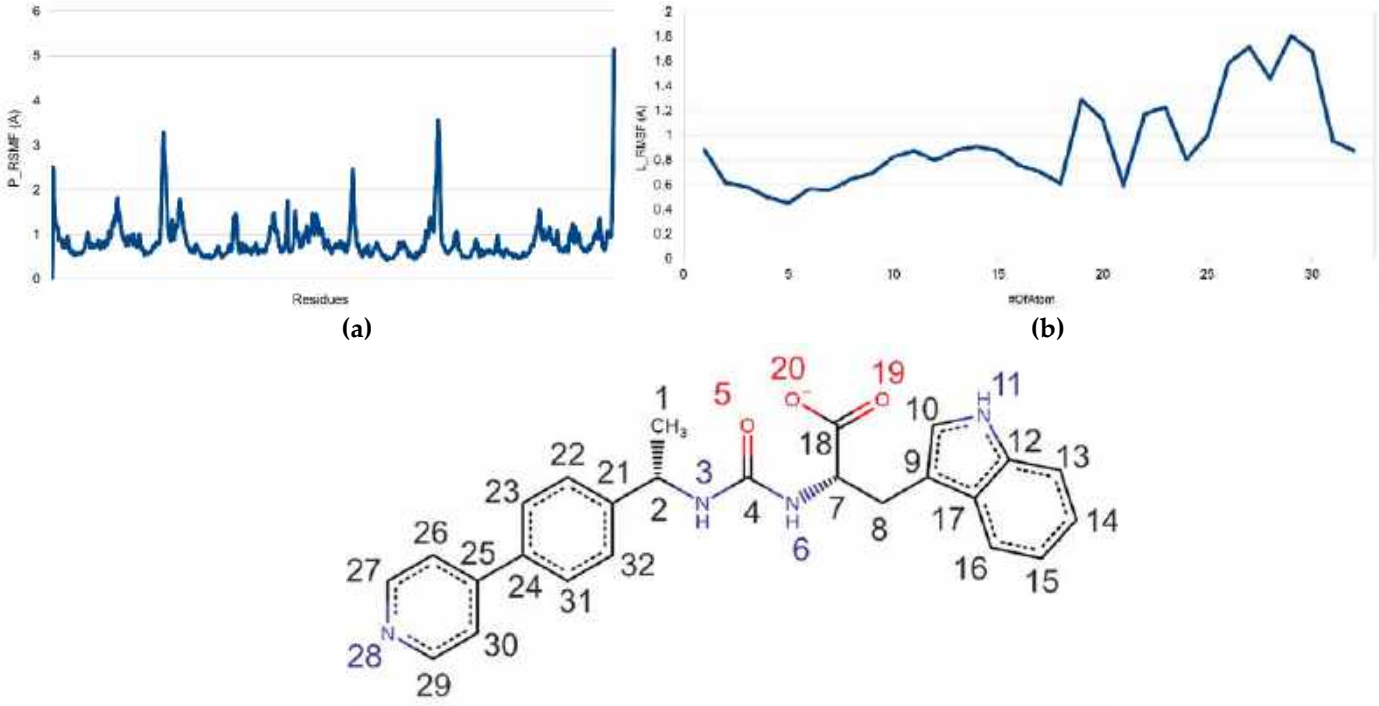


Рисунок 2.7.5. Графіки RSMF для (а) білка, (б) ліганду Z3969355209 та (в) відповідного перерахування атомів у ліганді.

Висновки:

5. Розроблено нові моделі рецепторів ACE2 і ACE, а отримані моделі продемонстрували велику силу прогнозування щодо набору

загальнодоступних активних до зв'язування речовин з відомою експериментальною активністю. Ці результати дозволили нам оцінити селективність ACE2/ACE *in silico*, що є важливою контрольною точкою для розробки хімічних зондів для ACE2.

6. Крім того, ми створили робочі процеси, що стосуються різноманітності хімічних речовин, що дозволили нам працювати з величезними колекціями сполук, що було продемонстровано на докінгу 1,4 мільярда сполук з високою виробничою та економічною ефективністю. Підхід, заснований на хіміотипах, дозволяє нам згенерувати невеликі набори молекулярних кандидатів з хорошим потенціалом для подальшої оптимізації *in vitro.*
7. Як продемонстрували наші дослідження MD, усі сполуки демонстрували стабільні взаємодії ліганд-білок. Тому ми виявили, що ці сполуки мають великий потенціал бути активними під час тестування *in vitro*.
8. Розглянуто можливі протоколи оптимізації для управління віртуальним скринінгом і використано експериментальні дані, щоб проілюструвати наступне: загальний час ЦП, витрачений на скринінг бібліотеки лігандів, можна покращити за допомогою оптимізації плану скринінгу як комбінації різні методи та інструменти скринінгу, включаючи як точні, так і більш поверхневі інструменти. Як бачимо з розрахунків, правильна дорожня карта скринінгу та розумне керування можуть скоротити процесорний час до 10 разів.
9. За матеріалами цього пункту досліджень опубліковано статтю у журналі першого квартілю з відкритим доступом – Molecules.

РОЗДІЛ 3. *IN VITRO* СКРИНІНГ ACE2 ІНГІБІТОРІВ З КОЛЕКЦІЙ КОМЕРЦІЙНО ДОСТУПНИХ СПОЛУК.

3.1. Методи та планування.

На даному етапі проекту було проведено скринінг сполук на активність щодо інгібування ACE2. Для скринінгової кампанії було in silico (див попередній розділ звіту, крім того використовувалися ще два підходи, деталі яких будуть описані у наступних звітах) відібрано 577 сполук. Для експериментальних досліджень було використано закуплені в рамках проекту набори Abcam, ab273373.

Принцип роботи набору ґрунтується на здатності активного ангіотензинперетворюючого ферменту (ACE2) розщеплювати синтетичний пептидний субстрат на основі МКА з вивільненням вільного флуорофору. Вивільнений флюорофор має підвищену флуоресценцію і його можна легко визначити кількісно за допомогою флуоресцентного зчитувача мікропланшетів.

Загалом ця частина роботи мала наступні етапи:

- Обрати оптимальні об’єми (25/40) без втрати продуктивності та контролю якості.
- Валідувати методику з обраними об’ємами реакції та концентрації реагентів.
- Обчисліти IC50 для інгібітора EBC-36033 (був синтезований в рамках проекта) та еталонного інгібітора, поліпептиду DX600 (Ac-GDYSHCSPLRYPWKCTYPDPEGGG-NH_2) в нових перевірених умовах.
- Провести первинний скринінг 577 сполук
- Провести валідацію знайдених хітів
- Виміряти дозо-залежні криві підтверджених хітів

3.2. Матеріали, реагенти та обладнання.

Тип плати: **3544** Corning, low volume, black clear bottom

Об’єм: 25/40 µл

Концентрації: *невідомі*, всі розчини були приготовані у відповідності до інструкції з набору

Буферні розчини: отримані від виробника (склад не розголошений)

Температура: 25ºC

Час інкубації: 15 хв

Вимірювання флуоресценції (Exc/Em 320/420nm) у кінетичному варіанті: 1 година

Приготування реагентів:

Ензим (*концентрація та молекулярна маса у отриманому розчині не розголошена*): розчинити 20 µл отриманого розчину ензиму у 198 µл відповідного буферного розчину для розведення ACE2. Відбиралися аліквоти по 25 µл та заморожувалися до -70ºC.

Субстрат (*концентрація та молекулярна маса у отриманому розчині не розголошена)*: Відбиралися аліквоти по 10 µл та заморожувалися до -70ºC

Для однієї лунки відбиралося: 0.5 µл розчину субстрату + 9.5 µл приготованого розчину ензиму

Референтний інгібітор: (DX600, концентрація не розголошена): 5 µл. Додати 50 µл відповідного буферного розчину для розведення ACE2 до вимірювань.

Протокол для вимірювань

Для 25/40 µл:

1) Додати 0.5/0.8 µл розчину ензиму до 12/19.2 µл відповідного буферного розчину для розведення ACE2, ретельно перемішати.

2) Використовувати 12.5/20 µл відповідного буферного розчину для розведення ACE2 як **Негативний контроль**.

3) Додати 2.5/4 µл розчину досліджуваної сполуки у відповідну лунку

Позитивний контроль (референтний інгібітор)

4) Додати 2.5/4 µл відповідного буферного розчину для розведення ACE2 у лунку для ензиму (**Позитивний контроль**)

5) Інкубувати 15 хв при кімнатній температурі

6) Додати 10/16 µл розчину субстрату до лунок **Негативний контроль**, **Позитивний контроль**, **Контроль інгібітора (EBC-36033)**

7) Виміряти флуоресценцію (Exc 320 нм, Em 420 нм) у **кінетичному** варіанті: 1 година при кімнатній температурі.

Загалом дизайн експерименту можна зобразити наступною схемою:

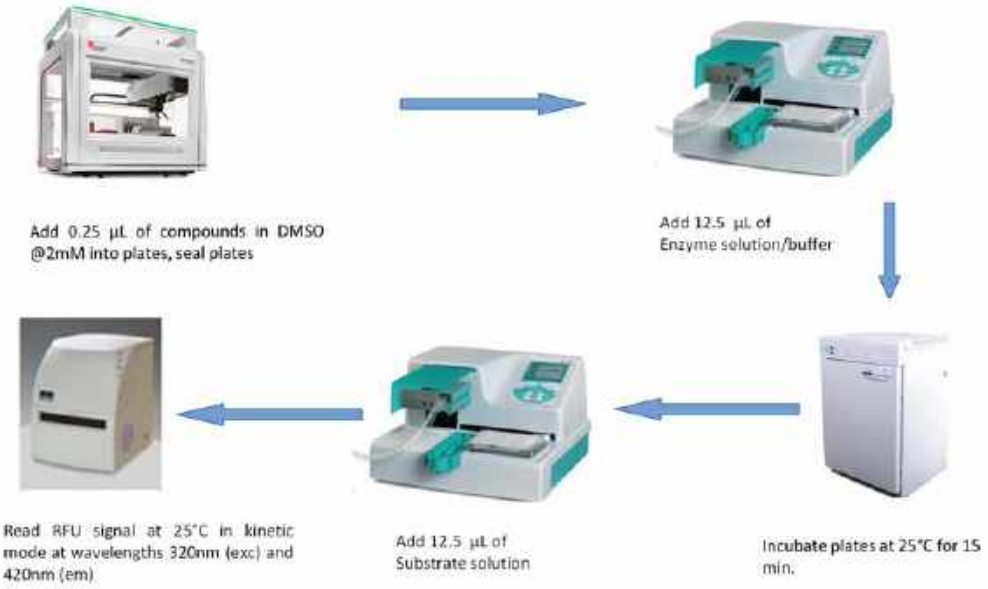


Рисунок 3.1. Схематизована послідовність дій для вимірювання інгібуючих властивостей щодо ACE2 досліджуваних сполук.

3.3. Оптимізація методу.

Серія попередніх оптимізаційних експериментів показали що:

1. Метод демонструє добру відтворюваність: значення Z-фактору, що були розраховані зі значень швидкості знаходились в межах 0.6 – 0.8, значення S/B, розраховані з RFU (recommendation for use, інструкції для набору) – 25-30 для 25 µл та 40 – 50 для 40 µл.

2. Швидкість реакції зменшується за період інкубації. Це може бути пояснено незначним збільшенням температури з 25ºС при 10 хв до 27ºС при 70 хв.

Подальші оптимізації концентрації (тобто розведення) ензиму та субстрату зведені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Оптимізація концентрації (тобто розведення) ензиму та субстрату.

Substrate	**1:1**		**1:2**		**1:4**		**1:8**	
Enzyme	**S/B**	**Z-prime**	**S/B**	**Z-prime**	**S/B**	**Z-prime**	**S/B**	**Z-prime**
1:1	**24.29**	**0.92**	**13.14**	**0.87**	**7.26**	**0.80**	4.44	0.82
1:2	**13.61**	**0.90**	**7.68**	**0.94**	4.46	0.90	2.97	0.79
1:4	**6.77**	**0.94**	4.09	0.87	2.62	0.78	1.92	0.82

1:8	4.56	0.89	2.87	0.80	1.96	0.73	1.56	0.60

Як видно з таблиці якість методу у всіх розведеннях відповідають вимогам високо пропускного скринінгу (значення Z-фактору> 0,5), але при низьких концентраціях ферменту або субстрату значення S/B значно зменшилися. Таким чином, бажано вибрати **не більше 1: 4 розведення як для ферменту, так і для субстрату**.

3.4. Скринінг винайдених в результаті докінгу хітів.

Отже з використанням оптимізований параметрів було проведено скринінг 577 сполук, результати якого наведені на Рисунку 3.2.

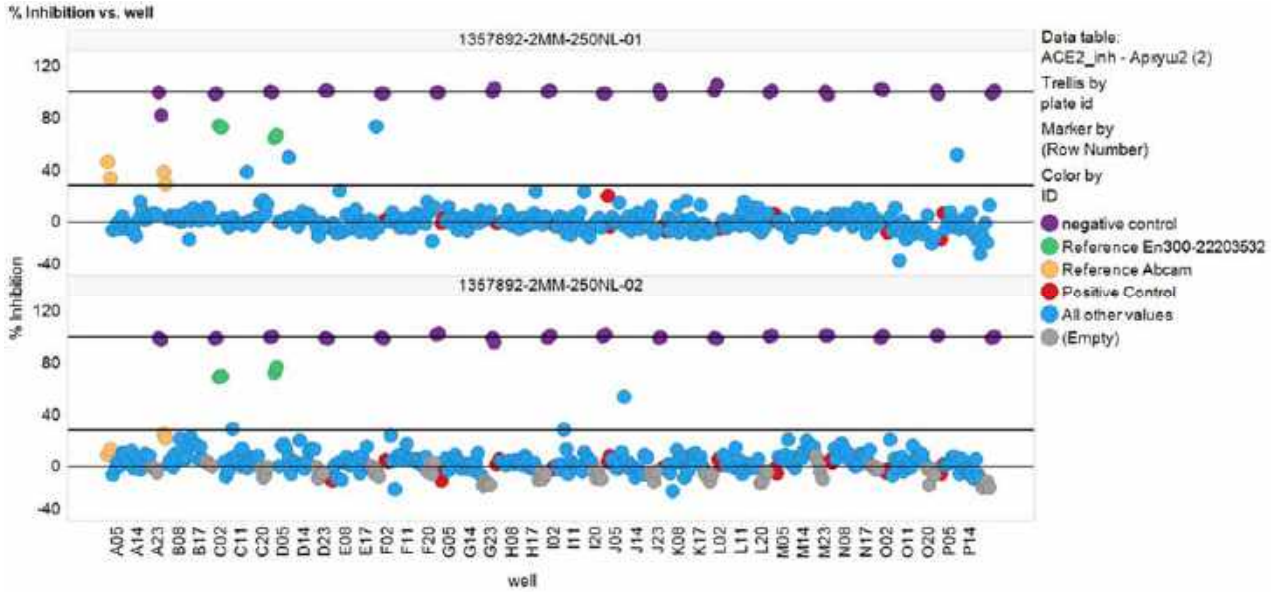


Рисунок 3.2. Скринінг 577 сполук щодо інгібуючої активності до ACE2.

Параметри «якості» при порівнянні результатів двох плат задовольняли сучасним критеріям та наведені у Таблиці 3.2.

Таблиця 3.2. Порівняльні характеристики скринінгових плат.

Parameter	**Плата 1**	**Плата 2**
Z"	0.84	0.82
S/B	5.54	5.2
%inh_ DX600	37.5	17.9
SD_%inh DX600	7.2	7.4
%inh_Ref EBC-36033	69.9	72.2
SD_%inh EBC-36033	4.8	3.7

За результатами скринінгу 577 сполук було відібрано 7, що відповідали критеріям хітів (Inh% > 3*SD+Avg, що дорівнювало 28.2 (перша плата) та 28.8 (Друга плата). Дані наведені у Таблиці 3.3. Слід відмітити, що 5 сполук 5 з 7 мали свою інтенсивну флуоресценцію при 320exc/420em, однак це не завадило розрахунку %inhibition тому що додатково використовувався критерій ΔRFU/Δ та параметри «якості» задовольняли критеріїї скринінгу (Z-prime <0.5).

Таблиця 3.3. Сполуки, що були ідентифіковані як хіті згідно критерію Inh% > 3*SD+Avg.

Плата	Лунка	ID сполуки	Inhibition%
1	E21	Z57410403	74.1
2	J08	Z1459912954	54
1	P08	Z3488516360	52.1
1	D07	Z2301748685	50.1
1	C13	Z2504126907	38.8
2	C07	Z95185503	29.8
2	I06	Z85905794	28.9

Останнім кроком даного етапу дослідження було вимірювання дозо залежних кривих для всіх сполук, що були ідентифіковані як хіти. Отримані дані наведенні на Рисунку 3.3.

Структури ідентифікованих хітів наведені нижче. Слід відмітити, що підхід віртуального скринінгу, направлений на різноманіття (**i**), розроблений саме для цього проекту і описаний в даному звіті дав лише один хіт (скринувалося 200 сполук). Інші два підходи, більш класичні, що будуть описані в наступних звітах, а саме ті що базуються на 3D фармокофорних моделях (177 сполук, **ii**) та generative topographic mapping (GTM) (200 сполук, **iii**) виявилися «більш ефективними». Хоча таке твердження при достатньо малому розмірі скринінгової кампаніїї не є науково обґрунтованим (Рисунок 3.4.)

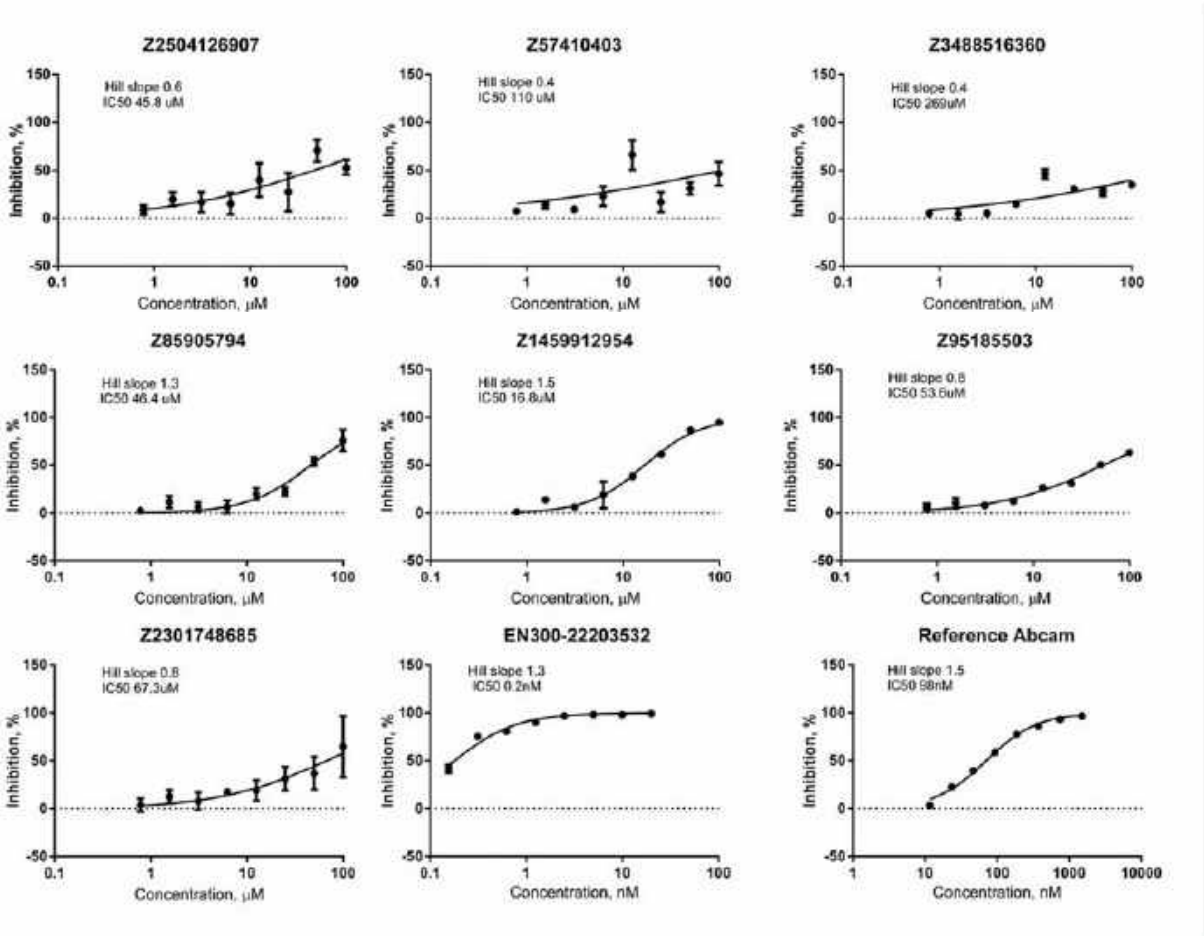


Рисунок 3.3. Дозозалежні криві винайдених хітів та референсних сполук.

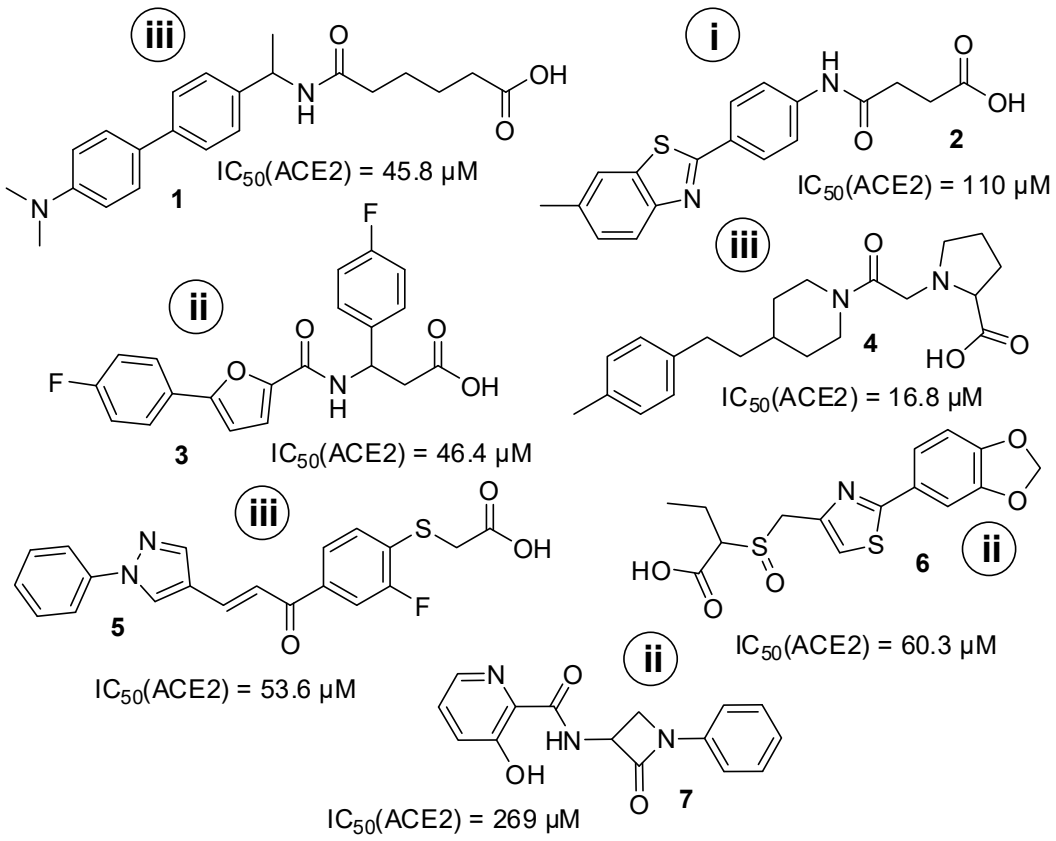


Рисунок 3.4. Структури винайдених хітів.

Висновки:

1. Використовуючи результати комп’ютерного докінгу на розробленій та двох стандартних моделях проведено in vitro скринінг сполук наявних у Enamine SSC (сполуки, що виявилися відсутніми було досинтезовано в рамках виконання проекту).
2. Оптимізовано процедуру скринінгу для використання активного ангіотензинперетворюючого ферменту (ACE2).
3. В результаті скринінгової програми винайдено 7 сполук хітів, що можуть бути використані для оптимізації в молекули лідери на наступному етапі дослідження.
4. За матеріалами цього пункту досліджень підготовлено до друку публікацію в журналі першого квартілю з відкритим доступом – International Journal of Molecular Science.

РОЗДІЛ 4. ПЛАНУВАННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ СИНТЕЗУ СПОЛУК-ЛІДЕРІВ ОТРИМАНИХ В РЕЗУЛЬТАТІ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ БАЗИ ВІРТУАЛЬНИХ СПОЛУК RDB.

4.1. Підготовка реагентів та розчинників для проведення синтезу. Підтвердження структури та аналітичні дані отриманих сполук.

Проводилися за методами та за допомогою інструментів, що викладені в пп. 1.1-1.2.

4.2. Докінг Enamine RDB за «класичним підходом».

Будь-які обчислення, пов'язані із дослідженням та аналізом природних об'єктів, це зручний, швидкий та ефективний шлях оцінки і передбачення ступеня прояву певних властивостей як хімічних, так і біологічних. Два найбільш поширених алгоритми подібних досліджень, це молекулярний докінг і молекулярна динаміка. Вони здатні відобразити процес зв’язування (формування білок-білкового, білок-лігандного комплексів) та стабільності і міцності (власне, процес дисоціації). Якість результатів цих симуляцій залежить від вихідних конформації молекул учасників, адже припускається знаходження конформацій в одному з можливих локальних енергетичних мінімумів і тому вся система виявляється чутливою до початкових координат. До того ж, на даний час можна дослідити та інтерпретувати більш специфічні процеси, такі як механізми утворення чи розриву молекулярних зв’язків. За таких умов, система здатна вийти за межі енергетичного мінімума. В цілому, нас цікавлять дві білкові молекули із вивченими властивостями і визначеними структурами та їх взаємодія із різними молекулами лігандів.

4.2.1. Матеріали та методи.

Для симуляції молекулярної динаміки ми використовували пакет GROMACS 2018 та вбудовані інструменти аналізу даних. Для підтримки температури і тиску (термо- і баростат Парінелло-Рахмана) у системі були встановлені значення у 310 К та 1 бар, відповідно [53,54]. Для пришвидшення розрахунків ми виставили радіус кулонівських та Ван дер Ваальсових взаємодій довжиною в 1.1 нм (дистанція, на якій враховуються навколишні атоми). Оптимізація геометрії та мінімізація енергії

системи без позиційних стримувань була виконана протягом 20000 кроків алгоритму крутого спуску та 10000 кроків методом спряженого градієнту. Врівноваження системи, а саме молекул води, тривало 50 пс. Уникаючи колапсу системи, ми перейшли від ансамбля NVE до NVT, коли об'єм системи залишався сталим, а значення енергія та температура залишалися змінними. Для розрахунків довгих електростатичних взаємодій між атомами і підтримання рівноваги в системі після кожної ітерації розрахунків, застосовувався алгоритм PME (Particle mesh Ewald) [55]. Вільна молекулярна динаміка білка у водному оточенні (модель молекул води TIP3P) тривала 100 нс. Цього має бути достатньо для релаксації вторинних структур білка в цілому та орієнтації бічних радикалів амінокислотних залишків сайту зв'язування. Через відсутність необхідності у довготривалих симуляціях для вивчення конформаційних змін, пост-трансляційні модифікації глюкозамінування не враховувались. Атом цинку використовувався в якості координаційного металу. Всі дисульфідні зв'язки між цистеїнами були збережені для забезпечення стабільності структури білкової молекули.

Спираючись на показники RMSD для кожного окремого амінокислотного залишку, ми провели конформаційний аналіз з метою вивчення стабільності ротамерів у середині сайту. Створивши окремий список амінокилот, що формують порожнину сайту ми включили їх до аналізу методом кластеризації. В результаті аналізу до кластерів потрапляли лише конформації, що характеризувалися кроком зміщення в 0.05 нм для атомів бічних радикалів амінокислот сайту зв'язування. На виході ми отримали набір центральних структур кластерів та повний опис характеристик цих кластерів (розмір, ступінь девіації від початкових координат, часовий проміжок). Основним методом оцінки розміру, глибини та форми сайту є візуальний аналіз та дослідження поверхневих амінокислот. Для цього використовувався ліцензований пакет PyMol 2.3, що дозволяє швидко та якісно порівняти між собою всі центроїди кластерів.

Референтні сполуки, що депоновані в базі CHEMBL Database, були конвертовані у тривимірні структури та продоковані у сайті зв'язування. Створення моделей для докінгу проводилось в програмах Dock 6 та Chimera UCSF. Беручи до

уваги великий розмір сайту зв’язування, достатню кількість референсних речовин та низький коефіцієнт подібності в межах цього набору, ми визначили які амінокислотні залишки є важливими для зв'язування лігандів. Формування водневих зв‘язків та розташування функіональних груп було визначено завдяки наявним кристалічним структурам та продокованим референтним структурам [PDBID: 1R4L, 1R42, 2XY9, 1O8A, 4BZR, та ін.].

Подальша обробка багатомільйонної бази речовин зводилась до фільтрації за медико-хімічними та PAINS фільтрами для відсіву небажаних, з біологічної та хімічної точки зору, структур. Ці процедури, написання фільтрів SMART, робота із списком сполук та фінгерпринтами була проведена за допомогою програми DataWarrior та набору скриптів RDKit. Для цього всі сполуки були протоновані, мінімізуючи розподіл зарядів. Надалі молекули опрацьовувались у формату *.mol2 із згенерованими тривимірними структурами. В результаті, секція кожної молекули включала набір фізико-хімічних дескрипторів, а також згенеровані конформери. До того ж для кожної конформації було додано електростатичну мапу поверхні, що збільшує якість докінгу за допомогою програми MOPAC [56].

Підготовка структури білка для високопропускного скринінгу багатомільйонної бази проводилась в програмному пакеті Chimera, що є візуальною оболонкою для коду Dock 6. Для створення моделей використовувались існуючі комплекси із накладеними референтними лігандами. Таким чином ми перекрили хімічний простір, що був сформований референсними сполуками, та відтворили всі можливі білок-лігандні взаємодії. Далі порожнина сайту була заповнена зондами різного розміру для детального опису поверхні. Електростатична мапа сайта зв’язування була згенерована на основі результатів зондування молекулою води. Розмір сайту був указаний виходячи із максимальних довжин відомих інгібіторів.

4.2.2. Результати.

Молекулярні взаємодії молекул в емпіричних силових полях при розрахунках існують на основі параметрів силового поля [57]. В свою чергу, силове поле описує різні взаємодії між атомами, які поділяються на два типи: ковалентні (ковалентні

зв’язки, кути, обертання) та нековалентні (ван-дер-ваальсові та електростатичні взаємодії). Для вивчення протеїнів та лігандів ми використали силове поле AMBER [58]. Побудувавши систему ACE2 без ліганду у сайті зв’язування із атомом цинку всередині, ми провели молекулярну динаміку довжиною 100 нс для визначення ступеню рухливості бічних ланцюгів в середині сайту. Проте, використовували для аналізу лише перші 50 нс, адже за відсутності ліганду сайт зв’язування поступово відчинявся. Потім, за допомогою кластеризації молекулярної динаміки, ми продемонстрували стабільність цих амінокислотних залишків (Рисунок 4.2.1), провівши індексацію атомів поверхні сайту зв’язування. В результаті цього аналізу, що базується на детальному аналізі показників RMSD, ми отримали три основних кластери, в яких конформація білка залишалась стабільною протягом довгого часу та повторювалась у певних проміжках часу. Ці кластери є досить близькими між собою, особливо, що стосується амінокислот сайту зв’язування. Проте, більш за все нас цікавила різниця між сайтами зв’язування ACE та ACE2, а саме механізм селективності певних лігандів по відношенню до ACE2.

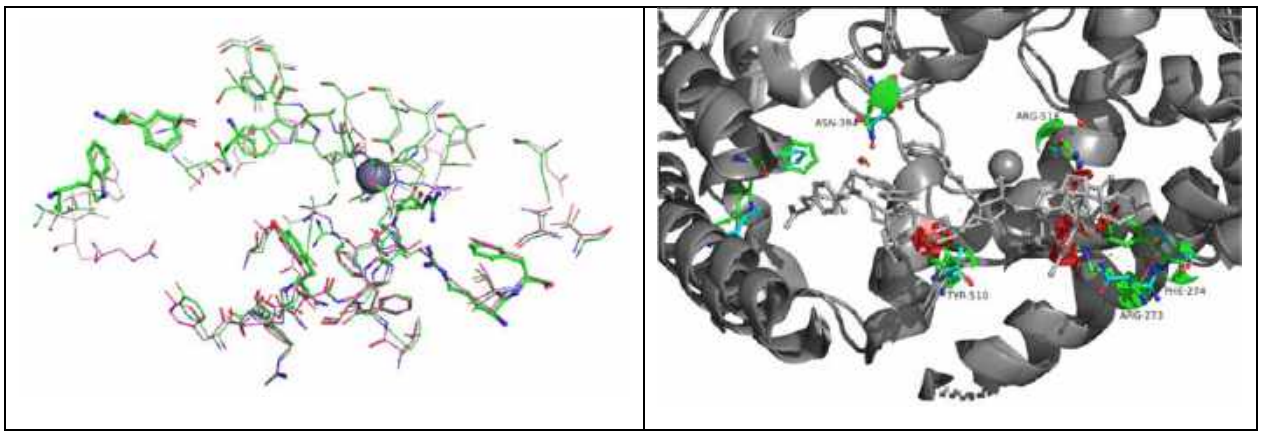


Рисунок 4.2.1. Приклад вирівнювання двох центроїдних конформацій із траєкторії молекулярної динаміки (А). Вирівнювання сайтів зв’язування ACE/ACE2 із лігандами (сірим) та відміченими амінокислотами (зеленим), що стерично заважатимуть (червоним) зв’язуванню лігандів проти ACE.

Намагаючись визначити основи такої селективності, ми порівняли референтні сполуки, що мають доведену активність проти ACE та ACE2. Як виявилось для ACE відомо близько 700 речовин із різною активністю, що могли б бути використанні у дослідженні. В свою чергу, проти ACE2 було показано існування лише 67 активних

речовин. Для цього ми розрахували значення звичайних дескрипторів (кількість ароматичних атомів, кількість обертових зв'язків, значення розчинності, тощо). Окрім того, ми зробили спробу визначити чи є серед них речовини повністю селективні та високо активні проти ACE2 та чи є речовини, що проявляють різну активність проти кожного з білків. Таким чином, серед 67 речовин проти ACE2 активність проти обох була доведена для 49 з них (Рисунок 4.2.2).

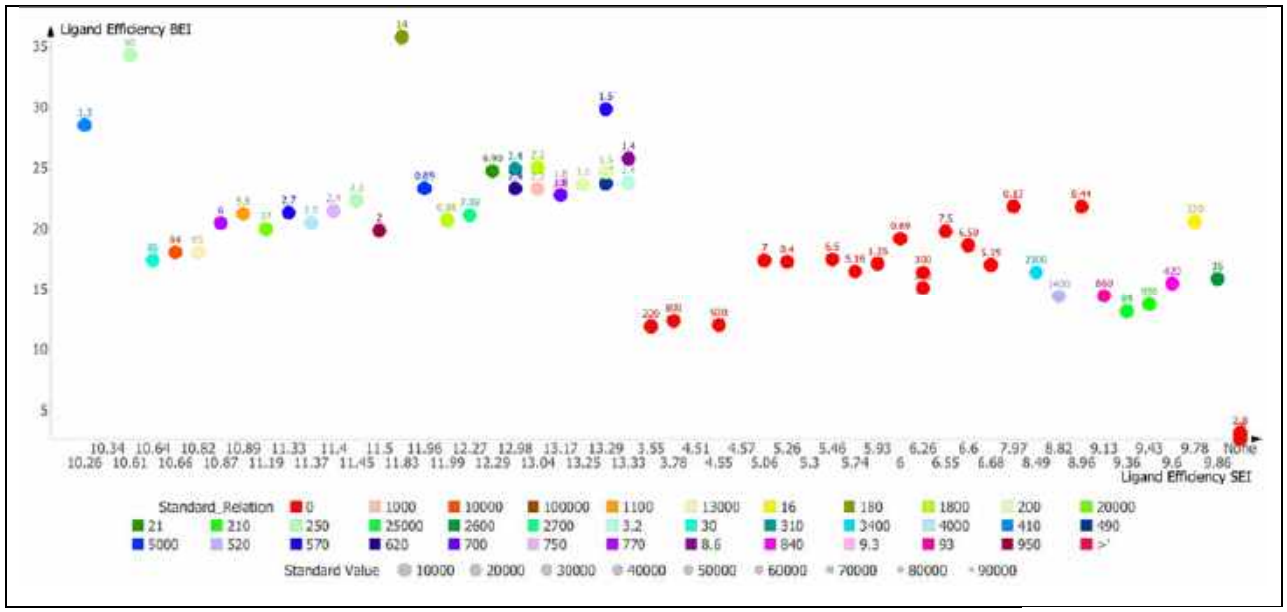


Рисунок 4.2.2. Плот, що демонструє розподіл інгібіторів ACE2 за Binding Efficiency Index та Surface Efficiency Index. В той же час маркери розфарбовані за значенням активності проти ACE (Standard relation), а значення активності проти ACE2 підписані коло маркерів.

SEI = (-log10(активність*10^-9))*100/PSA;

BEI = (-log10(активність*10^-9))*1000/MW.

Упевнившись в жорсткості амінокислотних залишків сайту зв'язування, навіть після молекулярної динаміки, ми перейшли до створення моделі молекулярного докінгу. Перший запуск молекулярного докінгу був проведений у сайт зв'язування для оцінки варіабельності положень референсних сполук. В процесі підбору параметрів докінгу (положення якірних часток, потенційних водневих зв'язків) ми визначали, яка із моделей буде пропускати менше неселективних лігандів. Зрозуміло, що саме ті ліганди, які мають найкраще значення активності проти ACE2, та найгірше, або зовсім не демонстрували

активність, проти ACE, мають бути еталоном якості селективної моделі. Найкращою показала себе модель, що передбачала розташування ароматичної групи ліганду, один водневий зв'язок із Arg273 та донор електронів поблизу атома металу. За результатами цієї моделі з 67 інгібіторів проти ACE2 38 молекул які або не мали зовсім, або мали занизьку активність проти ACE, потрапили в сайт зв'язування (Рисунок 4.2.3).

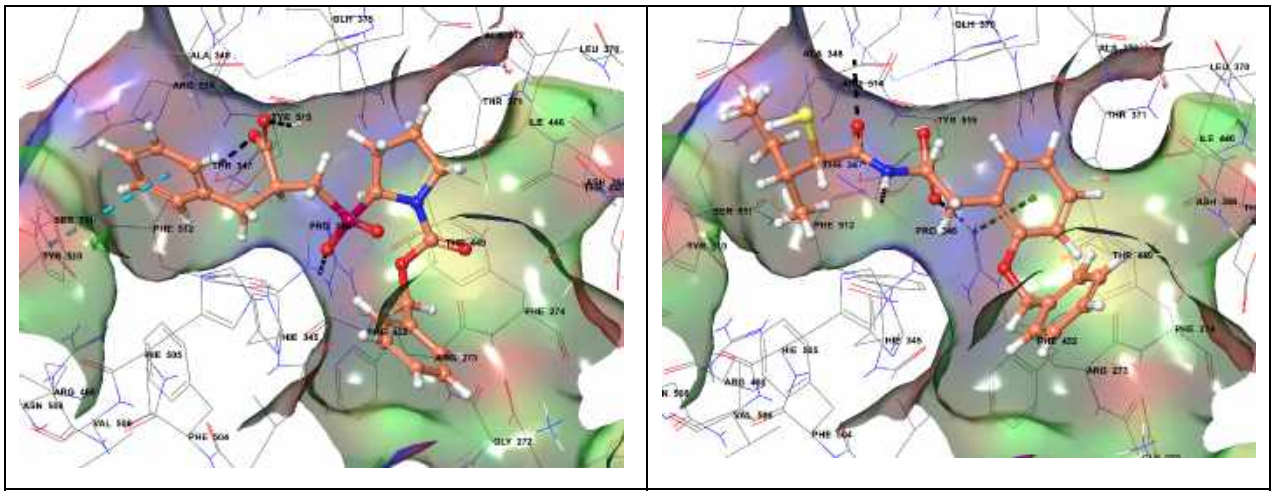


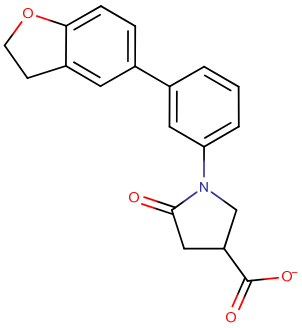
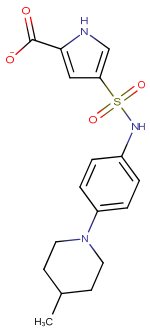
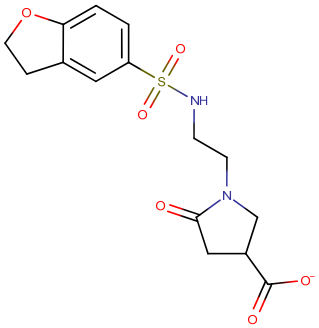
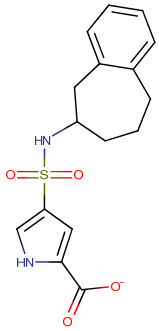
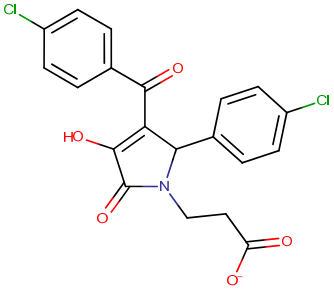
Рисунок 4.2.3. Результати підготовки докінгової моделі - CHEMBL260677 (ACE1 – 0, ACE2 – 300 нМ) та CHEMBL429844 (ACE1 – 0, ACE2 - 0.44 нМ)

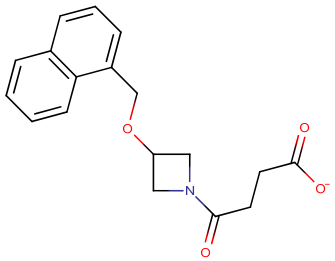
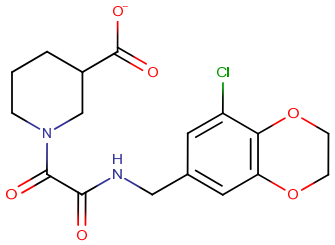
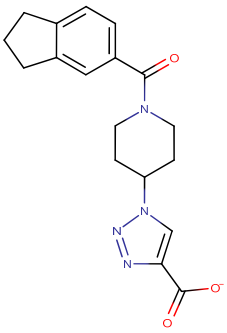
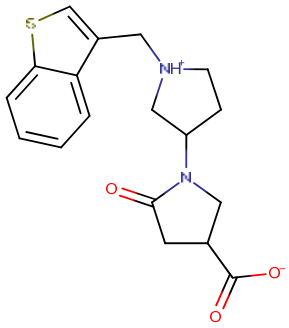
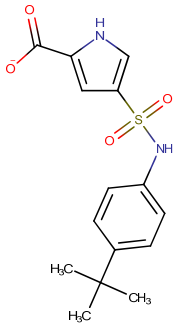
Після аналізу результатів всіх запусків докінгу ми визначили розташування функціональних груп, що відрізнялися формою, довжиною та орієнтацією в сайті зв'язування. Спираючись на ці дані ми запустили високоефективний скринінг бібілотеки речовин.

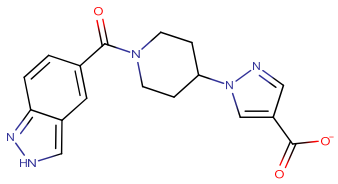
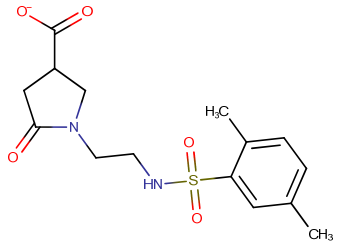
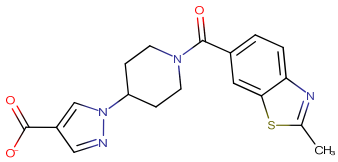
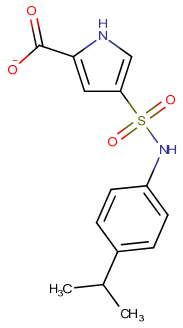
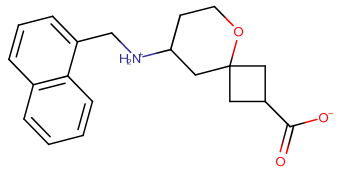
Таким чином в результаті високопропускного скринінгу бібліотеки молекул на основі «світової колекції скринінгу» (joint world screening collection) [13], нами було отримано масив молекул, що містив більше 10 тисяч записів. З даного масиву нами було обрано 1000 сполук з найбільшими передбаченими значеннями зв'язування з мішенню (докінговим скором). 20 перших структур із значеннями активності наведено у Таблиці 4.2.1.

Таблиця 4.2.1. Перші 15 молекул-кандидатів, отриманих в результаті докінгу масиву молекул зі «світової колекції скринінгу» на моделі ACE2 рецептора.

#	Структура	Молярна Маса	Формула	Д. Скор

1		322.34	$C_{19}H_{16}NO_4$	-12.32
2		362.42	$C_{17}H_{20}N_3O_4S$	-11.85
3		353.37	$C_{15}H_{17}N_2O_6S$	-11.82
4		333.38	$C_{16}H_{17}N_2O_4S$	-11.74
5		419.23	$C_{20}H_{14}Cl_2NO_5$	-11.64

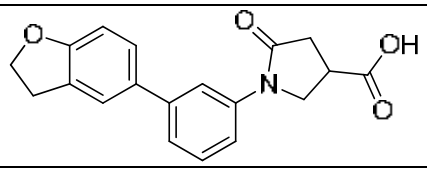
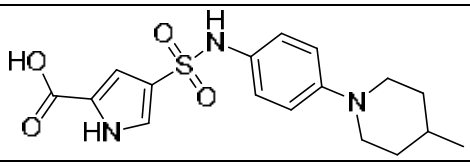
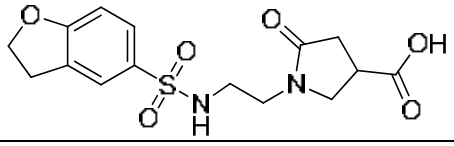
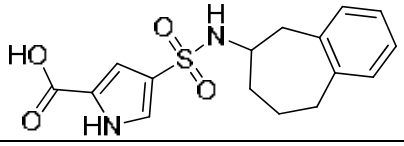
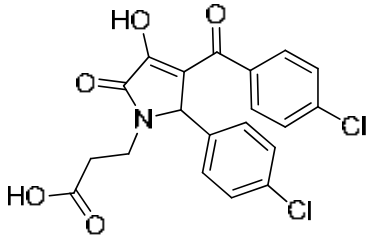
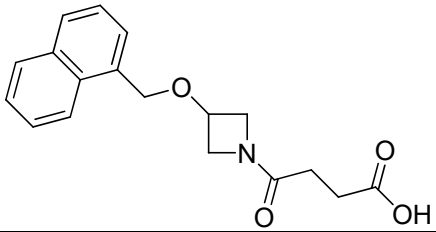
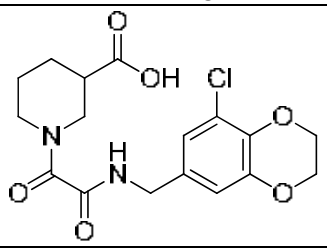
6		312.35	$C_{18}H_{18}NO_4$	-11.59
7		381.79	$C_{17}H_{18}ClN_2O_6$	-11.58
8		339.38	$C_{18}H_{19}N_4O_3$	-11.58
9		344.43	$C_{18}H_{20}N_2O_3S$	-11.58
10		321.37	$C_{15}H_{17}N_2O_4S$	-11.51

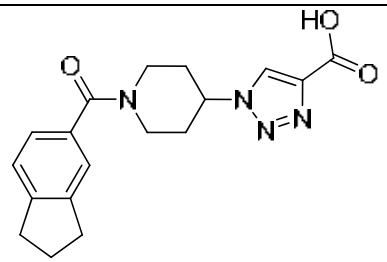
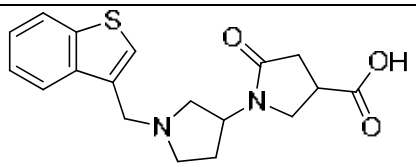
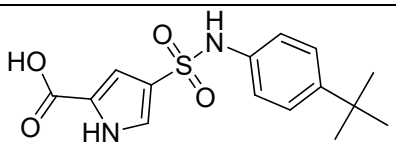
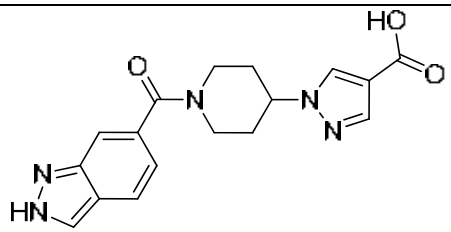
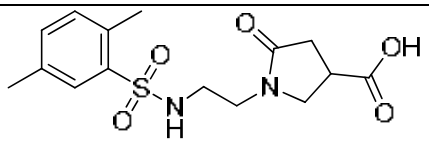
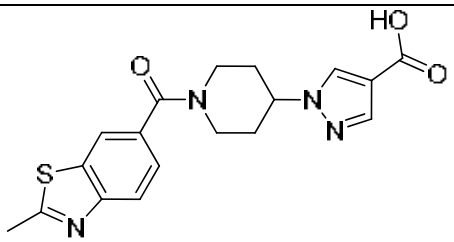
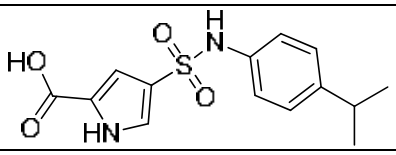
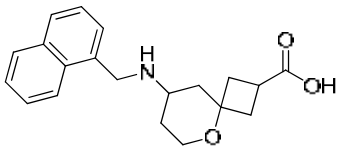
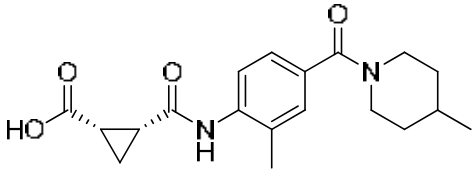
11		338.35	$C_{17}H_{16}N_5O_3$	-11.51
12		339.39	$C_{15}H_{19}N_2O_5S$	-11.50
13		369.42	$C_{18}H_{17}N_4O_3S$	-11.49
14		307.34	$C_{14}H_{15}N_2O_4S$	-11.48
15		325.41	$C_{20}H_{23}NO_3$	-11.46

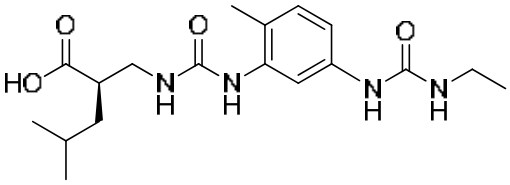
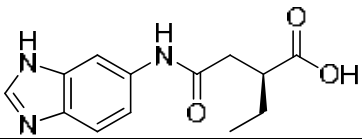
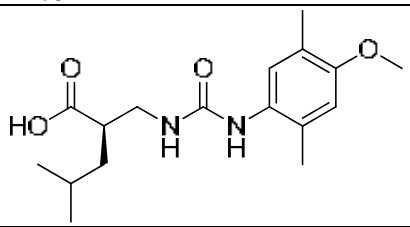
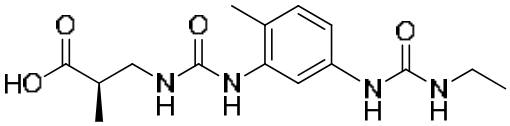
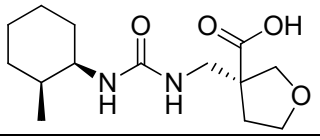
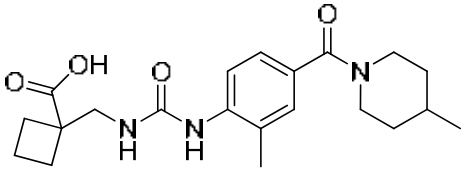
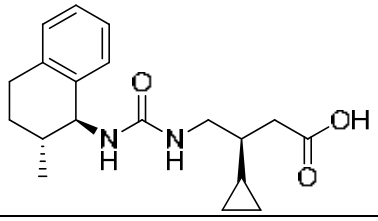
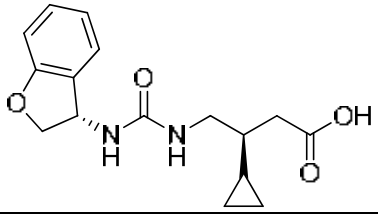
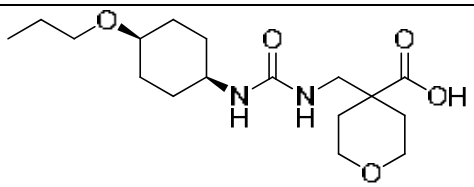
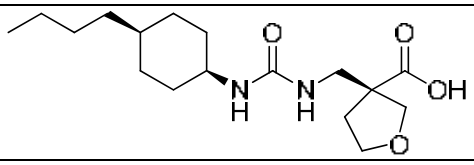
4.3. Стуктури хітів та їх синтезу.

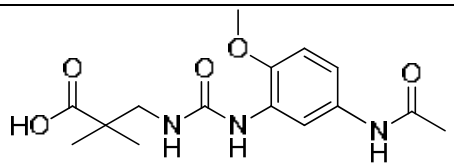
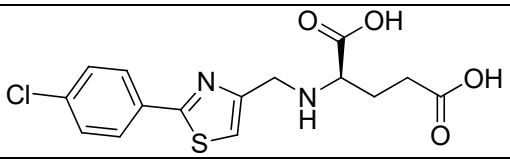
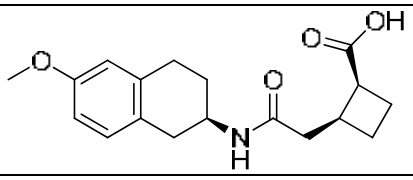
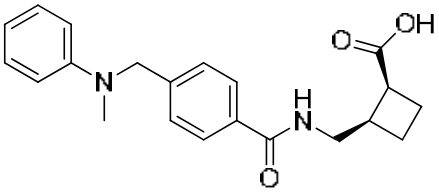
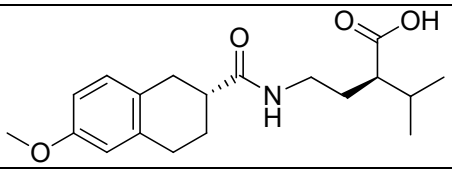
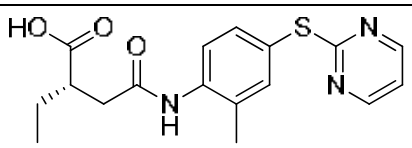
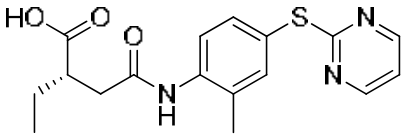
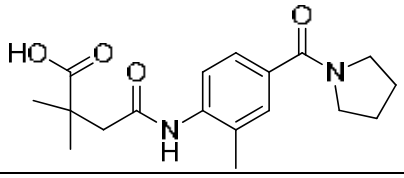
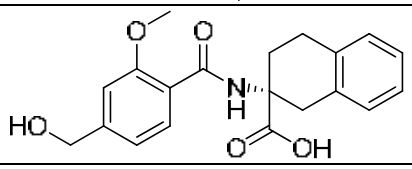
На даному етапі до синтезу були обрані сполуки з бази віртуальних сполук RDB, що були відібрані в результаті докінгу за двома різними підходами (з розділу 2 та підрозділу 4.2.). Усі сполуки були отримані в міліграмових кількостях використовуючи методи комбінаторної хімії та паралельного синтезу та базу доступних білдінг блоків компанії «Єнамін». Усі результати наведені в таблиці 4.3.1.

Таблиця 4.3.1. Сполуки, що сгенеровані в результаті докінгу на моделях ACE2 рецептора, та синтезовані у кількостях 5-10 мг методами паралельного синтезу.

#	Структура	Молярна Маса	Формула	Метод
1		322.34	$C_{19}H_{16}NO_4$	Гетероциклізація
2		362.42	$C_{17}H_{20}N_3O_4S$	Сульфацилювання
3		353.37	$C_{15}H_{17}N_2O_6S$	Сульфацилювання
4		333.38	$C_{16}H_{17}N_2O_4S$	Сульфацилювання
5		419.23	$C_{20}H_{14}Cl_2NO_5$	Гетероциклізація
6		312.35	$C_{18}H_{18}NO_4$	Ацилювання
7		381.79	$C_{17}H_{18}ClN_2O_6$	Ацилювання

8		339.38	$C_{18}H_{19}N_4O_3$	Ацилювання
9		344.43	$C_{18}H_{20}N_2O_3S$	Гетероциклізація
10		321.37	$C_{15}H_{17}N_2O_4S$	Сульфацилювання
11		338.35	$C_{17}H_{16}N_5O_3$	Ацилювання
12		339.39	$C_{15}H_{19}N_2O_5S$	Сульфацилювання
13		369.42	$C_{18}H_{17}N_4O_3S$	Ацилювання
14		307.34	$C_{14}H_{15}N_2O_4S$	Сульфацилювання
15		325.41	$C_{20}H_{23}NO_3$	Амінування
16		344,40	$C_{19}H_{24}N_2O_4$	Ацилювання

17		364,44	$C_{18}H_{28}N_4O_4$	Карбамоїлювання
18		261,28	$C_{13}H_{15}N_3O_3$	Ацилювання
19		322,40	$C_{17}H_{26}N_2O_4$	Карбамоїлювання
20		322,16	$C_{15}H_{22}N_4O_4$	Карбамоїлювання
21		284,35	$C_{14}H_{24}N_2O_4$	Карбамоїлювання
22		387,47	$C_{21}H_{29}N_3O_4$	Карбамоїлювання
23		330,42	$C_{19}H_{26}N_2O_3$	Карбамоїлювання
24		304,14	$C_{16}H_{20}N_2O_4$	Карбамоїлювання
25		342,43	$C_{17}H_{30}N_2O_5$	Карбамоїлювання
26		326,43	$C_{17}H_{30}N_2O_4$	Карбамоїлювання

27		323,34	$C_{15}H_{21}N_3O_5$	Карбамоїлювання
28		354,81	$C_{15}H_{15}ClN_2O_4S$	Амінування
29		317,38	$C_{18}H_{23}NO_4$	Ацилювання
30		352,43	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	Ацилювання
31		333,42	$C_{19}H_{27}NO_4$	Ацилювання
32		345,42	$C_{17}H_{19}N_3O_3S$	Ацилювання
33		352,43	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	Ацилювання
34		332,39	$C_{18}H_{24}N_2O_4$	Ацилювання
35		355,38	$C_{20}H_{21}NO_5$	Ацилювання

На даному етапі досліджень сполуки були отримані в міліграмових кількостях результаті звичайних комбінаторних реакцій ацилювання, сульфацильвуння, амінування, карбамоїлювання та гетероциклізації за допомогою стандартних розроблених нами раніше методологій. [59] В якості вихідних сполук ми використали мікрокількості наявних в компанії Enamine будівельних блоків, що

були нам надані в рамках договорів про наукове співробітництво між останньою та Київським національним університетом імені Тараса Шевченка.

Через брак часу на виконання проекту ми не встигли зробити in vitro скринінг даного набору сполук, але залишаємо це як перспективу подальшого розвитку проекту.

Висновки

1. Використовуючи результати комп'ютерного докінгу на розробленій та стандартній моделях сполук наявних у Enamine RDB було обрано перспективний сет для подальшого скринінгу in vitro.
2. За допомогою методів паралельного синтезу було синтезовано відповідні сполуки в кількостях 5-10 мг.
3. Результати «класичного» докінгу було використано для підготовки публікації в журналі першого квартілю з відкритим доступом – International Journal of Molecular Science.

РОЗДІЛ 5. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ СПОЛУК – ІНГІБІТОРІВ ACE2 НА ФУНКЦІЇ ТОВСТОГО КИШЕЧНИКА.

На сьогодні в структурі доклінічних досліджень окрім застосування стандартних експериментальних моделей патологій, в яких використовуються лабораторні тварини, в основному гризуни, широкого розповсюдження набули альтернативні методи скринінгу *in vitro*. З цією метою для досліджень залучають панелі стандартизованих імморталізованих ліній клітин, для яких властиві певні молекули-мішені, присутні в патологічній тканині. Такими можуть бути поверхневі рецепторні молекули, внутрішньоклітинні сигнальні каскади, ядерні рецептори, транскрипційні фактори і т.п. З огляду на світову пандемію COVID 19, всебічно розвиваються стратегії прямого та опосередкованого впливу на різні фармакологічні мішені, задіяні в прогресуванні/пригніченні даної вірусної інфекції. Перспективними мішенями є трансмембранні рецептори ACE2 (Ангіотензинперетворюючий фермент 2), які експресуються на багатьох типах клітин, через які вірус проникає в клітини. Присутність даного рецептору на нервових, гліальних клітинах може бути пов’язано з рядом побічних негативних ефектів у хворих на короновірусну інфекцію. В даному дослідженні основною метою було вивчення впливу новосинтезованих сполук – інгібіторів ACE2. З цією метою було використано клітини мікроглії миші BV2 та клітини епітелію кишківника CACO2.

5.1. Матеріали і методи вивчення впливу на імморталізованих клітинах мікроглії BV-2 та клітинах товстого кишечника CACO2.

Клітинні лінії

BV-2 (0356), гліальні клітини мишей лінії C57BL/6, ростуть на високоадгезивному субстраті, проте в популяції присутні і суспензійні клітини, які можуть утворювати багатошарові скупчення (Рисунок 5.1.1) Клітини BV-2 експресують ядерний v-myc та цитоплазматичний v-raf продукти онкогену, а також антиген env gp70 на поверхневому рівні. Клітини BV-2 мають морфологічні, фенотипові та функціональні маркери макрофагів (Рисунок 5.1.1).

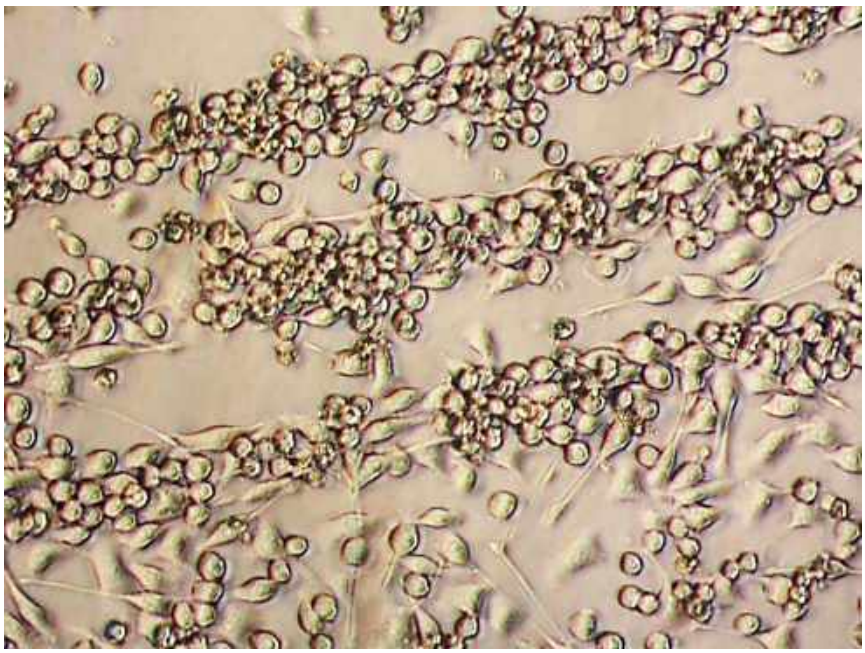


Рисунок 5.1.1. Клітини лінії BV-2, культивування 2 доби за стандартних умов.

CACO-2 – аденокарцинома товстої кишки людини є широко використовуваною моделлю *in vitro* для досліджень проникності кишечника в скринінгу допоміжних речовин у лікарських формах.

Тест-агенти В дослідженнях використано новосинтезовані сполуки (925 та 219) – потенційно активні інгібітори ACE2.

Умови культивування. Клітини інкубували за стандартних умов при 37^0 С, 100% вологості, 5% CO_2 в середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) з 10% FBS (Sigma, США), 1% суміші антибіотик-антимікотик. Для культивування клітин використовували шафу-ламінар (LS, ламінарні системи), CO_2-інкубатор (Medcenter Einrichtungen GmbH MMM-Group). Для оцінки та візуалізації результатів дослідження - мультилунковий спектрофотометр (Labsystems Multiscan MS). Прижиттєве спостереження, оцінку морфологічних параметрів та візуалізацію клітинних популяцій буде оцінено за використання інвертованого мікроскопу Axio Vert (Carl Zeiss), обладнаного програмним забезпеченням Axio Vision. По досягненню моношару клітини відкріпляли від субстрату за допомогою розчину трипсину (0,25%) підраховували концентрацію клітин в камері Горяєва та висівали в 96-лункові планшети в концентрації $1x10^5$-$3x10^5$ /мл в об'ємі 100 мкл. Після адаптаційного періоду протягом 12-15 годин до клітин додавали тест-агенти в

діапазоні концентрацій 0,1-100 мкМ (діапазон розведень з шагом 2). Клітини культивували протягом доби за тих же умов.

Цитотоксичний/цитостатичний скринінг. Для визначення дії новосинтезованих 925 та 219 речовин застосовували МТТ-тест. За 4 години до закінчення терміну інкубації клітин із досліджуваними сполуками до культурального середовища вносили МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромід) в об'ємі 20 мкл в лунку 96 лункового планшету до кінцевої концентрації 0.6 мМ. Після інкубації з МТТ (Рисунок 5.1.2.) центрифугування протягом 10 хвилин при 450 g на центрифузі К-26, обладнаній підставками для планшет відбирали середовище культивування, а утворені кристали формазану в клітинах розчиняли у 100 мкл диметилсульфоксиду і вимірювали оптичне поглинання на мультилунковому спектрофотометрі (Labsystems Multiscan MS) при довжині хвилі 540 нм (Рисунок 5.1.3).

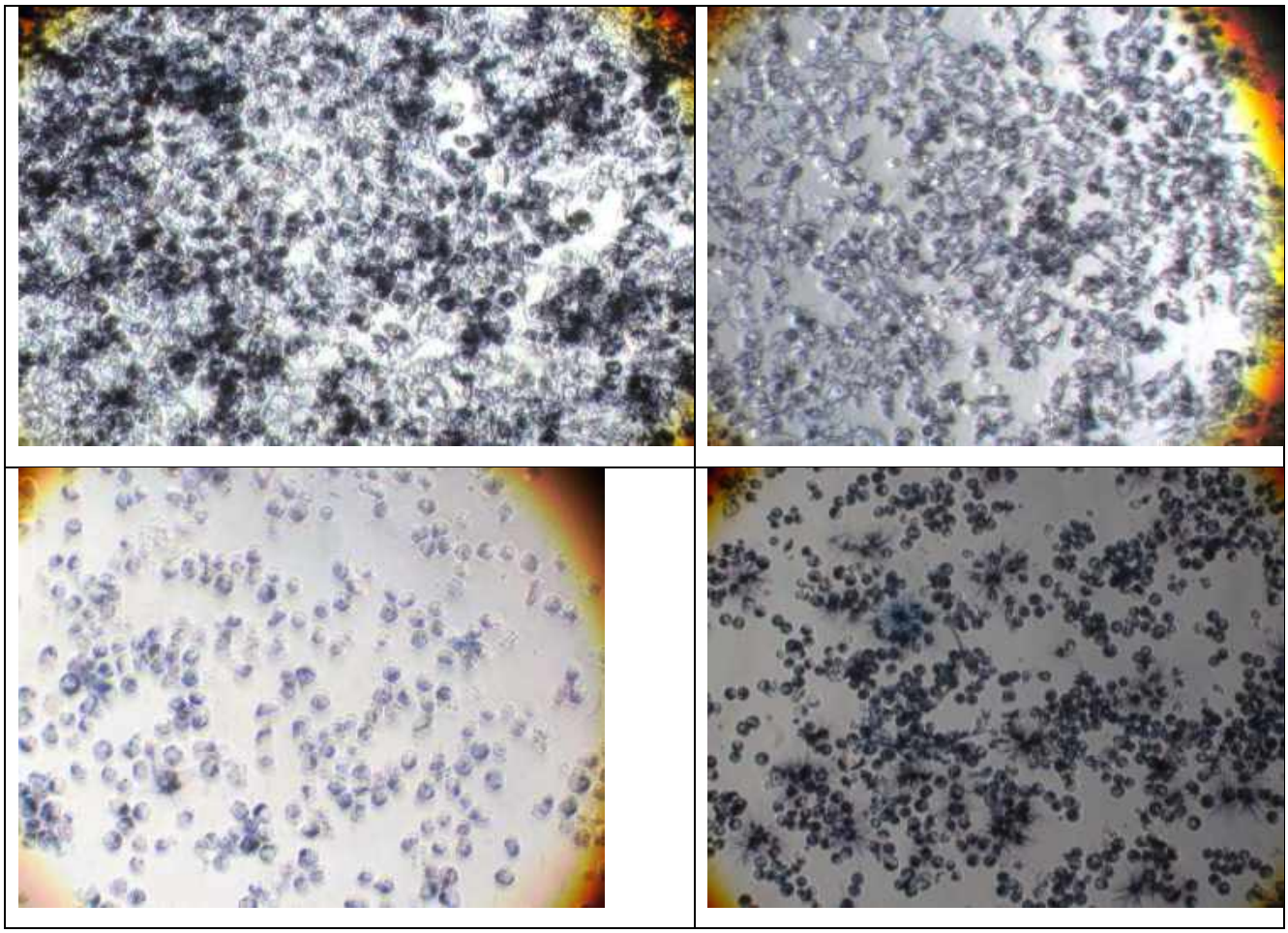


Рисунок 5.1.2. Типові фото відновлення солі 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду до кристалів формазану мітохондріями живих клітин.

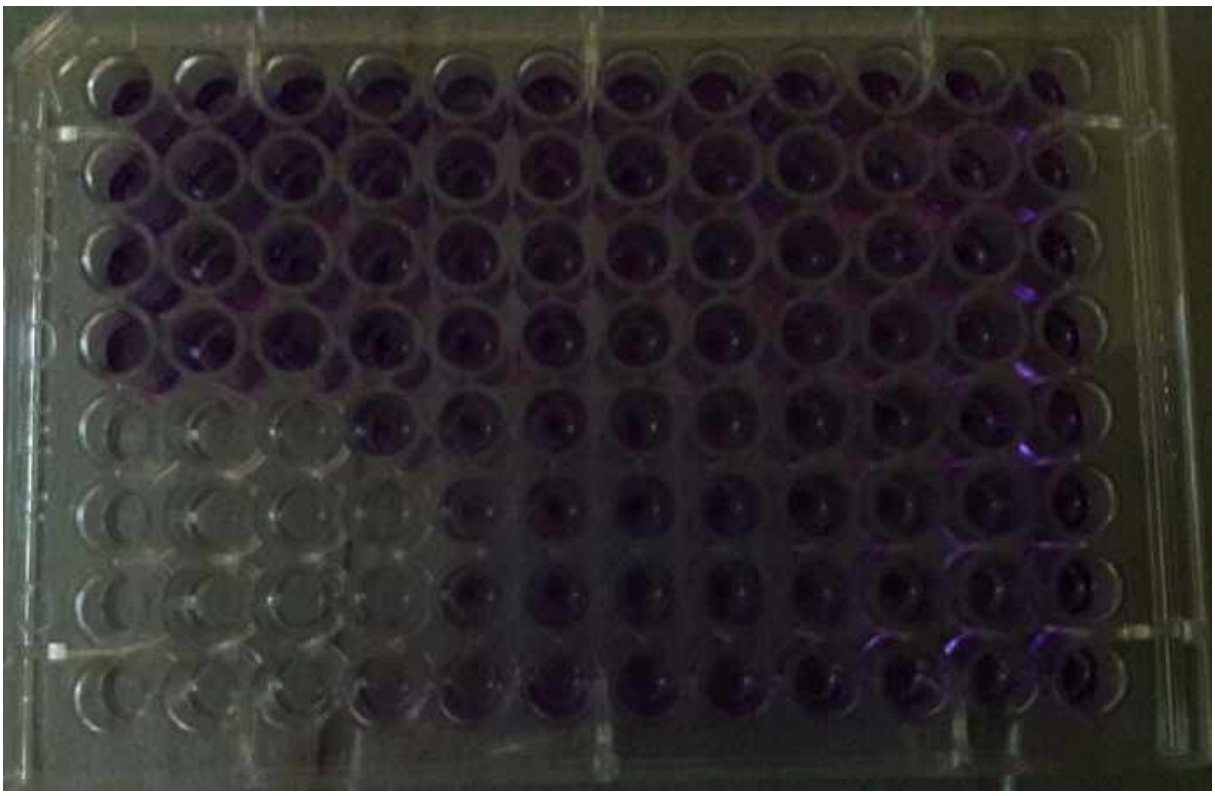


Рисунок 5.1.3. Фото 96-лункового планшету після інкубації клітин BV-2 з інгібіторами та розчинення кристалів формазану в ДМСО.

Інтенсивність оптичного поглинання корелювала з кількістю живих клітин як функція активності мітохондріальних ферментів (сукцинатдегідрогенази). Результати вимірів при дії інгібіторів порівнювали з відповідним контролем (без речовин).

Статистичний аналіз

Аналіз результатів проводили з використанням програми Statistica 8.0. Розрахунки проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. Значення представлені у вигляді середнього значення ± стандартне відхилення (M±SD). Критичний рівень вірогідності нульової статистичної гіпотези (p) приймався рівним 0,05.

5.2. Дослідження змін кишкової бар'єрної функції, епітеліального транспорту, протизапальних ефектів.

Запальне захворювання кишечника (ЗЗК) – це шлунково-кишкове захворювання, яке викликає хронічне запалення шлунково-кишкового тракту, переважно товстої та тонкої кишки.

Симптоми ЗЗК включають сильну діарею, біль, втому та втрату ваги, а тривале запалення шлунково-кишкового тракту, пов'язане з ЗЗК, може призвести до виснажливих, а іноді й смертельних ускладнень, кишкову закупорку, перфорацію кишечника та злоякісне новоутворення.

Порушення регуляції імунних функцій кишечника при ЗЗК призводить до хронічного коліту та несприятливих змін у структурі та функції кишечника. Двома основними типами IBD є хвороба Крона та виразковий коліт [60].

Нещодавно в багато центрових дослідженнях на когорті пацієнтів із ЗЗК (n = 495 з хворобою Крона; n = 387 за виразковим колітом; n = 94 умовно здоровий контроль) було встановлено, що у пацієнтів з активним перебігом ЗЗК спостерігається підвищення рівня експресії ACE2 в товстій кишці на відміну від тонкої кишки. Нормалізація експресії ACE-2 спостерігалася на фоні анти запальної терапії з використанням анти TNF-α та IL12/IL23 терапії [Potdar AA et ak 2021]. Аналогічно іншими дослідниками показано, що підвищений рівень експресії ACE2 у пацієнтів з хворобою Крона вірогідно підвищує потребу у хірургічному втручанні [Toyonaga et al 2021].

В імуногістохімічних дослідженнях на зразках неураженої тканини товстої кишки пацієнтів з раком товстої кишки, було показано позитивне ACE2 забарвлення переважно на мембрані і в цитоплазмі келихоподібних клітин, які продукують слиз та на апікальній vs. базолатеральної мембрани колоноцитів [An X et al 2021]. Враховуючі той факт, що експресія ACE-2 була показна в різних відділах шлунково-кишкового тракту з найбільшим рівнем в товстій кишці, було логічно обрати даний об'єкт для тестування ефектів ново синтезованих інгібіторів ACE-2 [An X et al 2021, Uhlen et al 2015].

Лабораторні тварини та досліджувані речовини

Дослідження проводили на самцях білих лабораторних нелінійних щурів (160-200 г), які утримувались в акредитованому віварії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за стандартних умов щодо температури (21-23°C), освітлення (12/12 год), вологості (30–35%), раціону харчування та з вільним

доступом до води згідно з нормами, встановленими законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 21.02.2006 №3447-IV. А також «Європейською конвенцією з захисту прав хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей від 20.09.1985», Страсбург [61]. Проведення експериментів здійснювали згідно Наказу про порядок проведення науковими установами дослідів та експериментів на тваринах та вимог біоетичної комісії ННЦ «Інститут біології та медицини».

Схема проведення дослідження

Експериментальний коліт викликали на першу добу експерименту одноразовим ректальним введенням (7 см від анального отвору за допомогою гумового катетеру S8 (Rüsch, Німеччина) 0,1 мл 6% розчину йодоацетаміду розчиненого в 1% розчині метилцелюлози [62]. Щурам контрольної групи вводили 0,1 мл 1% розчину метилцелюлози. Тварин розділили на 6 груп:

1 - **контроль**, яким впродовж 7 діб (2-8 доба) вводили воду для ін'єкцій (інтраперитніально) та 1% метилцелюлозу (ректально) на 1 добу експерименту;

2 – **коліт,** яким вводили воду для ін'єкцій (2-8 доба) та 6% йодоацетамід (ректально) на 1 добу експерименту;

3 – **контроль -** сполука 567, якій вводили сполуку 567 в дозі 100 мг/кг (інтраперитніально) впродовж 7 діб (2-8 доба) та 1% метилцелюлозу на 1 добу експерименту;

4 - **контроль -** сполука 219, якій вводили сполуку 219 в дозі 100 мг/кг (інтраперитніально) впродовж 7 діб (2-8 доба) та 1% метилцелюлозу на 1 добу експерименту;

5 – **коліт -** сполука 567**,** якій вводили сполуку 567 в дозі 100 мг/кг (2 – 8 доба) та 6% йодоацетамід на 1 добу експерименту.

6 - **коліт -** сполука 219, якій вводили сполуку 219 в дозі 100 мг/кг (2 – 8 доба) та 6% йодоацетамід на 1 добу експерименту.

Щурів умертвляли шляхом інгаляції CO_2 з подальшою цервікальною дислокацією через 9 днів після ректального введення йодоацетаміду або метилцелюлози.

Тварин зважували на 1й, 5й та 9й дні експерименту. Аутопсію проводили на 9-ту добу від початку дослідження методом цервікальної дислокації. Вирізали і визначали масу органів (сліпої кишки, селезінки і тимусу) у перерахунку на 100 г маси тіла тварини (Рисунок 5.2.1)

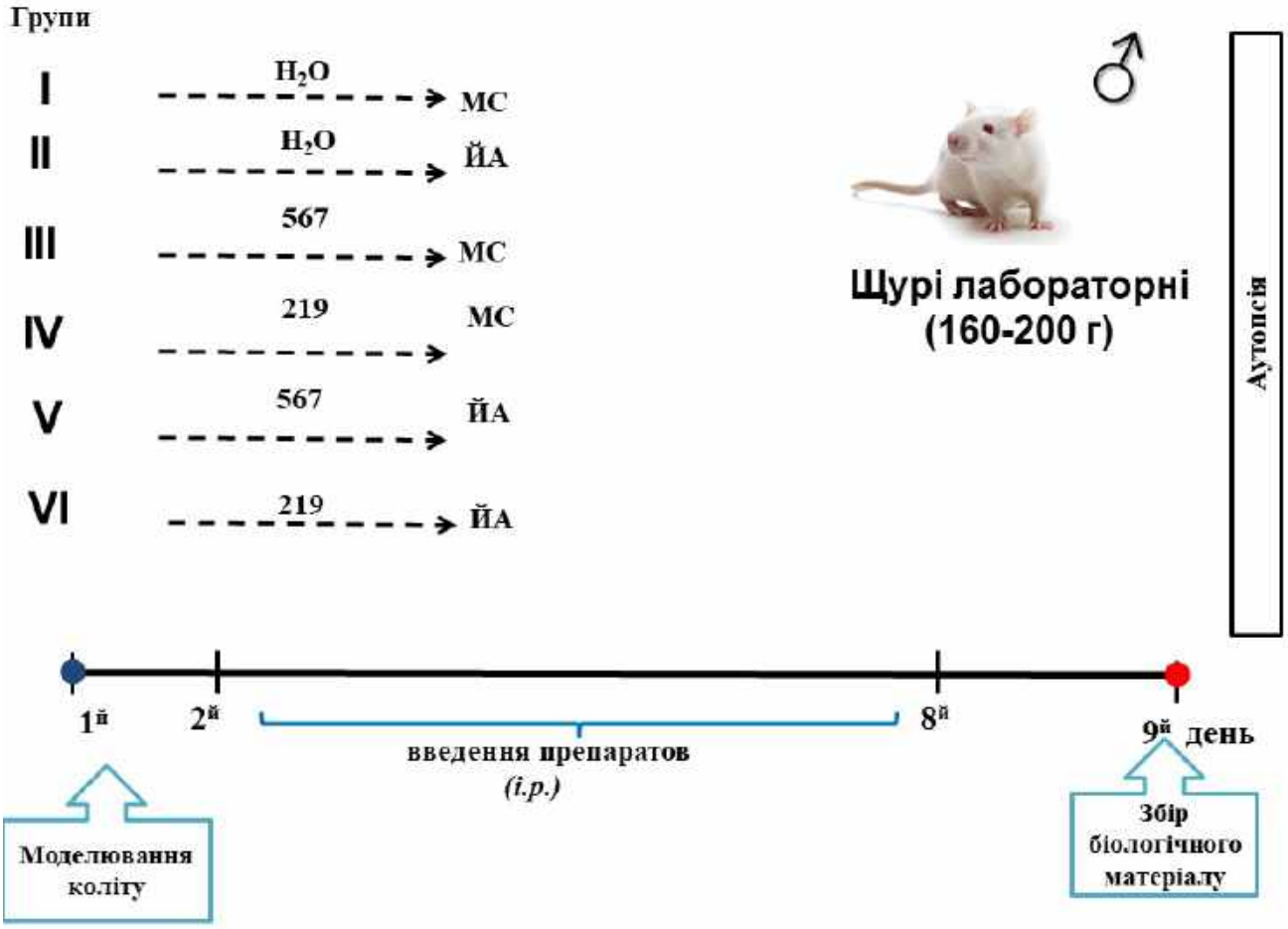


Рисунок 5.2.1.

Моделювання йодоацетамід-викликаного коліту у щурів

Моделювання коліта. Білих лабораторних щурів поміщали по-одній в спеціально-сконструйований пристрій (виготовлений із прозорого пластика) з плоским дном, який обмежує рухи тварини і має отвір, що дозволяє вільний доступ до анального отвору тварини. Після чого, чекали декілька хвилин, поки тварина випорожнить пряму кишку.

Виразковий коліт викликали одноразовим ректальним введенням 0,1 мл 6%-го розчину йодоацетаміду (Sigma, США), розчиненим в 1%-ному розчині метилцелюлози (Sigma, США) (7 см від анального отвору, використовуючи гумовий катетер S8 (Rüsch, Німеччина). Тваринам контрольної групи вводили 0,1

мл 1%-го розчину метилцелюлози. Щурів умертвляли шляхом цервікальної дислокації через 8 днів після введення йодоацетаміду (9 день експерименту), видаляли ділянку товстої кишки довжиною 7 см від анального отвору зважували масу кишки в перерахунку на 100 г маси тварини (мг/100г тіла) та оцінювали набряк. Тупим скальпелем обережно зішкрябували поверхневі шари кишки, залишаючи серозну оболонку, та переносили слизову оболонку в чисті пробірки, зважували і заморожували. Проби залишили на зберігання при -80ºС для подальшого визначення рівня МРО, активності каталази, ТБК-активних сполук і тіолових груп зішкрябану слизову оболонку товстої кишки щурів гомогенізували в 0,9% розчині NaCl.

Для оцінки макроскопічних ураженнь, видалену ділянку товстої кишки (від анального отвору), розрізали з антимезентерального боку, промивали в фізіологічному розчині. Вимірювали: площу ураження ($мм^2$), поперековий переріз стінки товстої кишки (мм), площу ділянки, що втратила складки ($мм^2$), масу кишки в перерахунку на 100г маси тварини (мг/100г тіла), а також загальний ступінь ураження товстої кишки за шкалою 0-3 (0 - норма, 1 – ураженно 1-10% товстої кишки, 2 – уражено 11-30%, 3 - уражено більше ніж 30%).

Визначення вмісту води у фекаліях

Для визначення частки води, у фекаліях (ознака діареї), на 9й збирали, фекалії, зважували та висушували протягом 24 години в термостаті при 60ºС. Відсотковий вміст води у фекаліях визначали за різницею між їх вологою та сухою масами. Розрахунок вмісту води проводили за формулою:

W = 100 - (md * 100%/mw).

Визначення активності мієлопероксидази у слизовій оболонці товстої кишки

Активність мієлопероксидази (МПО) вимірювали за реакцією з перекисом водню [63]. Зразки слизової оболонки товстої кишки, отримані під час умертвління, гомогенізували, перетираючи в ступці з рідким азотом до утворення порошку, для попередження розморожування. В ступку до прогомогенізованого зразку додавали 1 мл НТАВ буферу. Переносили 1 мл суміші гомогенату та НТАВ буфера в

мікропробірку. Мікропробірки зі зразками проводили через 3 цикли: 1 хв в рідкому азоті, 10 хв на водяній бані при Т=37 ºС. Потім зразки сонікували протягом 10 с на ультразвуковому дезінтеграторі при вихідній силі струму – 0,5 А. Після сонікації проби центрифугували впродовж 15 хв (14 000 rpm, Т=4 ºС). Як стандарт використовували розчин МПО (Sigma-Aldrich) в розчині НТАВ в концентраціях, що відповідають активності 0,5 U/мл, 0,25 U/мл, 0,125 U/мл, 0,06 U/мл, 0,03 U/мл, 0,015 U/мл. В лунки 96-луночної плашки вносили по 50 мкл калібрувальних розчинів різної концентрації. Для аналізу завантажували в лунки по 14 мкл супернатанту з процентрифугованих мікропробірок з досліджуваними зразками. У всі лунки вносили по 200 мкл реакційного буфера (6,1 мл розчину 66 H2O2, 4,1 мл розчину ODHC і 4,4 мл фосфатного буфера (pH=6). Через 5-10 хв міряли оптичну густину при довжині хвилі 450 нм на спектрофотометрі для мікропланшетів (Bio-Rad, США). Активність МПО розраховували на г тканини, досліджуваного зразку. Дані представляли у вигляді – активність МПО U/г.

Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Вміст ТБК-активних продуктів оцінювали згідно методу Стальної. [64]. Аліквоту клітинної суспензії, що містила 0,5 мг білку доводили до загального об'єму 0,5 мл буфером (мМ): KCl - 175, трис-HCl - 25, pH=7,4, об’єм проби становив 0,5 мл. Після цього відразу додавали 0,2 мл 20% трихлороцтової кислоти (ТХО). Денатурований протеїн осаджували центрифугуванням (1000 g, 15 хв). До 0,5 мл отриманого супернатанту додавали додавали 0,25 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти (ТБК), суміш інкубували на киплячий водяній бані 10 хв для розвитку забарвлення. Визначення забарвлення проводили на спектрофотометрі Synergy HT (BioTek Instruments, USA) при λ=532 нм.

Вміст ТБК-активних продуктів на 1 мг білка розраховували на основі значення молярного коефіцієнта екстинкції комплекса малонового діальдегіду з 2-тіобарбітуровою кислотою: $\varepsilon = 1{,}56 \times 10^5$ см$^{-1}$х М$^{-1}$

Визначення активності каталази

Принцип методу полягає в тому, що каталаза руйнує субстрат H_2O_2, незруйнована частина пероксиду водню при взаємодії з солями молібдену утворює стійкий забарвлений комплекс.

У пробірки вносили 2 мл 0,03 % розчину пероксиду водню. Реакцію починали додаючи 0,1 мл гомогенату (0,1 мг білка) до необхідної концентрації доводили за допомогою H_2O дистильованої. У холосту пробу додавали 0,1 мл дистильованої води. Проби витримували при кімнатній температурі 10 хв, реакцію зупиняли додаванням 1 мл 4%-го розчину молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі-46 при λ=410 нм проти контрольної проби, у яку замість пероксиду водню додавали 2 мл H_2O.

Активність каталази розраховували за формулою:

$$E = (\frac{Ахол - Адосл}{а\ мг\ білка * t * 22,2 * 10^3}) * 10^9 нмоль H_2O_2/мг білка * хв$$

де, Е – активність каталази, $А_{хол}$ і $А_{досл}$ - екстинція холостої та дослідної проб, К – коефіцієнт мілімолярної екстинкції перекису водню, що дорівнює $22,2*10^3 мМ^{-1}*см^{-1}$, t – час інкубації 10 хв., а – вміст білку в пробі, мг. Активність визначали у нМоль H_2O_2/ хв*1 мг білка [65].

Реєстрація електрофізіологічних характеристик у камері Уссінга

Для дослідження бар'єрних властивостей епітелію товстої кишки щурів використовували метод реєстрації електрофізіологічних параметрів за допомогою камер Уссінга [65].

Систему камер Уссінга (Physiologic Instruments, США), яка складається з двох півкамер, встановлювали у кріплення на водяній сорочці, яка підключена до циркуляційної водяної бані, для того, щоб забезпечити сталу температуру розчину в середині півкамер на рівні 37°С, оксигенацію та постійне значення pH тканини карбогеном (95% O_2, 5% CO_2) (рис. 2.2).

Трансепітеліальна різниця потенціалів вимірювалась за допомогою каломельних (Hg_2Cl_2) електродів у насиченому хлориді калію, пов'язаних із середовищем для занурення тканин за допомогою агар-KCl-містків. Серозна сторона тканини позначається як позитивна. Струм пропускали через електроди зі

срібла/хлориду срібла в насиченому розчині KCl, які аналогічним чином з'єднували з рідиною для занурення тканин через агарові містки [66, 67].

Перед початком кожного експерименту зібрану установку без тканини заповнювали розчином Кребса-Рінгера (117 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 1,2 мМ $MgCl_2*6H_2O$ (1М), 25 мМ $NaHCO_3$, 1,2 мМ $NaH_2PO_4*2H_2O$ (0,1М), 2,5 мМ $CaCl_2$) і калібрували в умовах, що повторювали експериментальні (температура розчину становила 37˚С, була наявна постійна оксигенація карбогеном). Під час налаштування виконували компенсацію різниці потенціалів на електродах напруги і компенсацію електричного опору розчину. Після цього відбувався повторний збір установки вже із досліджуваним зразком.

Під час аутопсії у тварин вирізали товсту кишку (на відстані 1 см від анального отвору до цекуму), розрізали вздовж по брижейці та промивали в оксигенованому охолодженому розчині Кребса-Рінгера. У цьому ж розчині проводили відділення м’язового шару, залишаючи лише слизовий та підслизовий шари. У роботі використовували фрагменти дистального відділу товстої кишки. Фрагменти тканини (0,5 $см^2$) кріпили на слайдери так, щоб тканина була достатньо натягнута, але при цьому залишалась цілою. Для виключення пошкоджених зразків, цілісність тканини перевіряли додатково за допомогою бінокуляра.

Слайдери вмонтовували вертикально між півкамерами з однаковою орієнтацією мукоза-сероза в усіх дослідах. Півкамери заповнювали розчином Кребса-Рінгера (по 5 мл у кожній). До півкамери, у якій омивалась латеральна сторона, додавали 10 мМ глюкози для осмотичної рівноваги та живлення тканини, а до півкамери, у якій омивалася апікальна сторона, – 10 мМ маніту.

Реєстрацію струму короткого замикання проводили в умовах фіксації напруги на 0 мВ. Трансепітеліальну резистентність реєстрували як відповідь на імпульс току величиною 10 мкА. З огляду на площу досліджуваної тканини, отримані величини унормовували, розраховуючи їх на площу в один квадратний сантиметр тканини (μА/$см^2$ та Ом*$см^2$ відповідно).

Після того, як слайдер із фрагментом кишечника було вмонтовано в камеру, тканині давали ~20 хвилин для адаптації до умов експерименту та стабілізації електрофізіологічних параметрів.

На 41-й хвилині до латеральної сторони додавали 100 мкМ 1%-го розчину карбахоліну для дослідження Ca^{2+}-залежної секреції йонів.

Визначення парацелюлярної проникності серо-мукозального препарату товстої кишки щурів

Для визначення парацелюлярної проникності епітеліального бар'єру використовували маркер флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC)-декстран масою 4 кДа (Sigma, США).

Після стабілізації тканини з апікальної сторони камери відбирали 500 мкл розчину і додавали 500 мкл FITC-декстрана (фінальна концентрація 1 мг/мл). Після завершення запису з латеральної сторони відбирали по 100 мкл і переносили на чорну плашку. Визначення інтенсивності сигналу FITC-декстрану у зразках здійснювали з допомогою спектрофотометра Synergy HT (BioTek Instruments, США) за довжини хвилі збудження 485 нм та довжини хвилі поглинання 528 нм. Значення коефіцієнта проникності (P_{app}) виразили з рівняння Фіка та розраховували за наступною формулою [68]:

$$P_{app} = \frac{J}{\Delta C}, \quad (1)$$

Оскільки:

$$J = \frac{\vartheta}{A*t}, \quad (2)$$

$$\vartheta = \frac{C_1}{V}, \quad (3)$$

$$\Delta C = (C_0 - C_1), \quad (4)$$

то:

$$P_{app} = \frac{C_1}{V*S*t*(C_0 - C_1)}, \quad (5)$$

Де: J – густина потоку речовини (моль/см^2*с);

C_0 – концентрація FITC-декстрану в розчині з серозного боку в початковий момент часу (моль/л);

C_1 – концентрація FITC-декстрану в розчині з мукозальної сторони через відповідний проміжок часу інкубації (моль/л);

V – об'єм розчину з мукозальної сторони мембрани (л);

S – площа досліджуваної ділянки тканини ($см^2$);

t – час перенесення декстрану через мембрану.

З огляду на співвідношення 1 л = 1000 $см^3$, розмірність проникності виражається в см/с.

Статистична обробка результатів

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою пакету програми Prism v.9 (GrapfPad Software, США). За допомогою критерію Шапіро-Уїлка була перевірена гіпотеза нормальності розподілу. У випадках, коли гіпотеза нормальності відкидалася, показник вірогідності (P) розраховували на основі рангового непараметричного критерію Манна-Уітні. В інших випадках розрахунок проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. Отримані результати представлені у вигляді середнього (M) ± стандартне відхилення (SD). Критичний рівень вірогідності нульової статистичної гіпотези (p) приймався меншим за 0,05.

5.3. Результати та обговорення вивчення впливу на імморталізованих клітинах мікроглії BV-2 та клітинах товстого кишечника CACO2.

Згідно даних MTT-тесту по відношенню до клітин BV-2 не зафіксовано цитотоксичного/цитостатичного ефекту інгібітора 925 в широкому діапазоні концентрацій, проте є достовірне збільшення проліферації/активації мітохондріальних ферментів як функції відновлення формазану сукцинатдегідрогеназою (Рисунок 5.3.1). Інгібітор 219 розчинний в ДМСО, тому в найбільших концентраціях даної речовини (25 мкМ, 50 мкМ та 100 мкМ) пригнічувальний ефект пов'язаний з високим вмістом ДМСО в середовищі інкубації (12,5%, 25% та 50%, відповідно). При зменшенні вмісту ДМСО в середовищі культивування клітин з інгібітором 219 достовірної різниці в дії даної сполуки відносно відповідного контролю не зафіксовано (Рисунок 5.3.2). Таким чином, при визначенні дії інгібіторів – потенційними мішенями яких є рецептор

ACE2 на клітинах мікроглії не зафіксовано. Більше того, виявлено тенденцію, а за деяких концентрацій і достовірну активацію проліферації.

Оскільки клітини BV-2 мають фенотипові та морфофункціональні ознаки макрофагів в подальших дослідженнях перспективним є визначення змін в даних клітинах під впливом інгібіторів, які стосуються фагоцитарної активності, проангіогенного фенотипу і т.д.

Наступним важливим етапом клітинно-біологічних досліджень було визначення дії інгібіторів на лінії клітин CACO2, яка є моделлю для визначення проникності клітин кишківника. Спочатку також варто було з'ясувати проліферативні/антипроліферативні ефекти інгібіторів за допомогою МТТ-тесту. Як по відношенню до клітин мікроглії, так і для клітин CACO2 не зафіксовано пригнічувальної дії досліджуваних сполук відносно контролю, проте і не виявлено стимулюючого ефекту на проліферацію цих клітин (Рисунок 5.3.3 та Рисунок. 5.3.4)

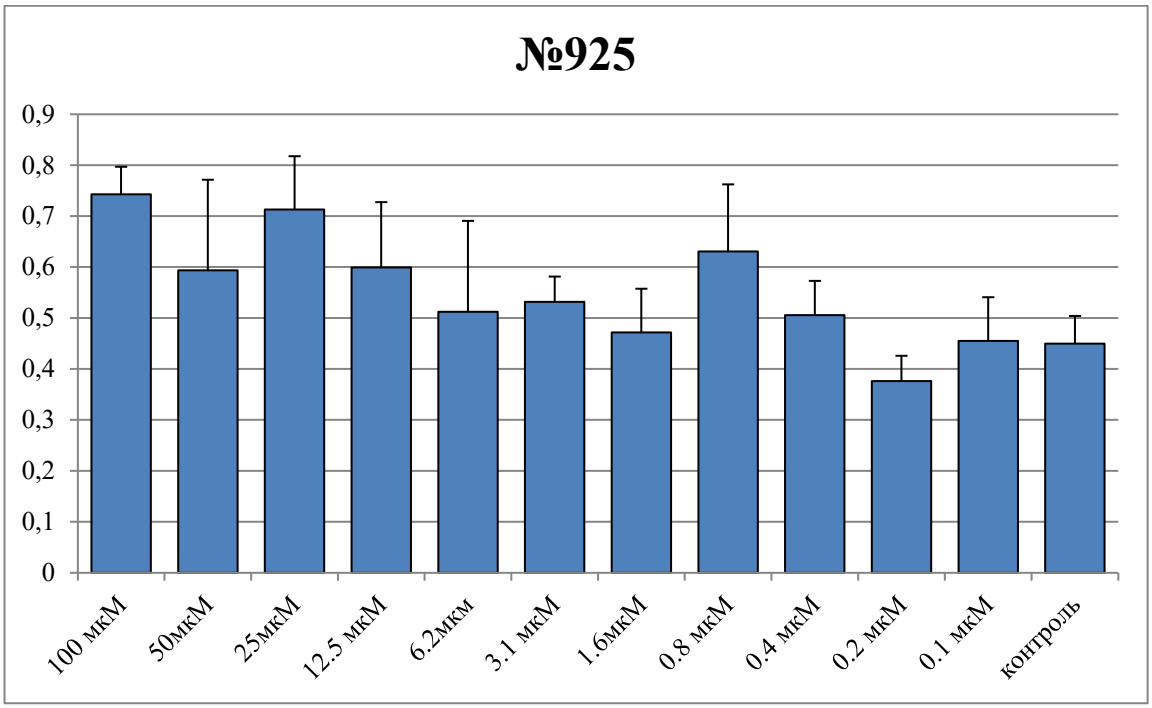


Рисунок 5.3.1 Відновлення солі 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду до кристалів формазану мітохондріями клітин мікроглії лінії BV-2 за дії сполуки №925.

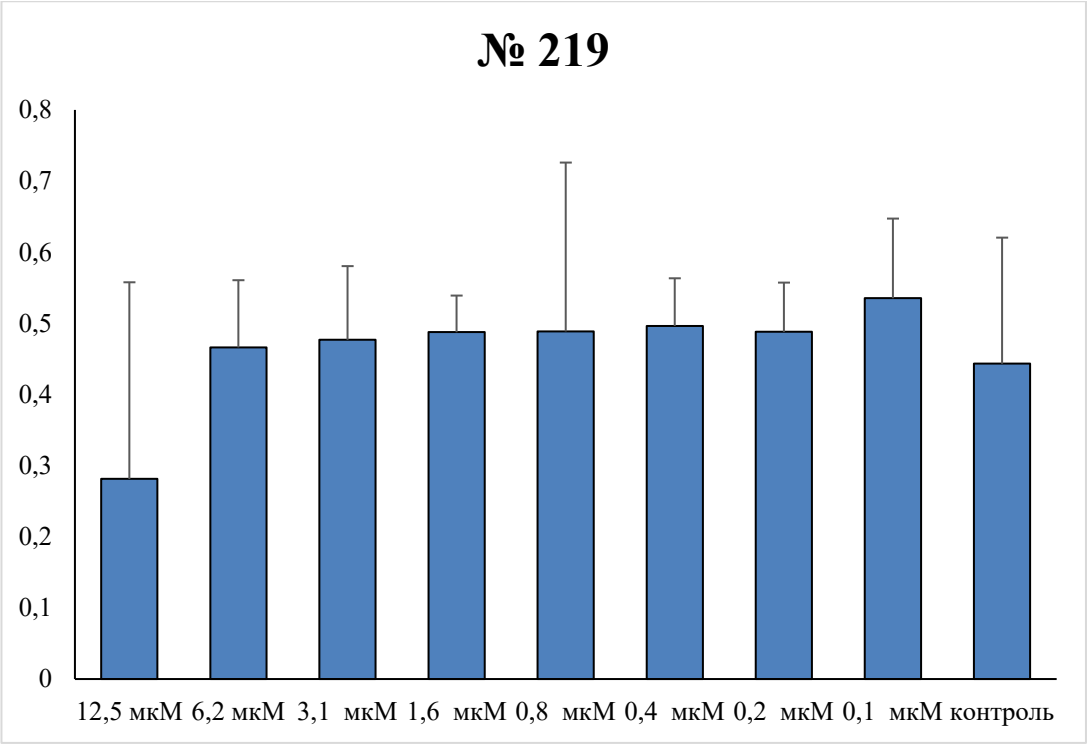


Рисунок 5.3.2 Відновлення солі 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду до кристалів формазану мітохондріями клітин мікроглії лінії BV-2 за дії сполуки №219.

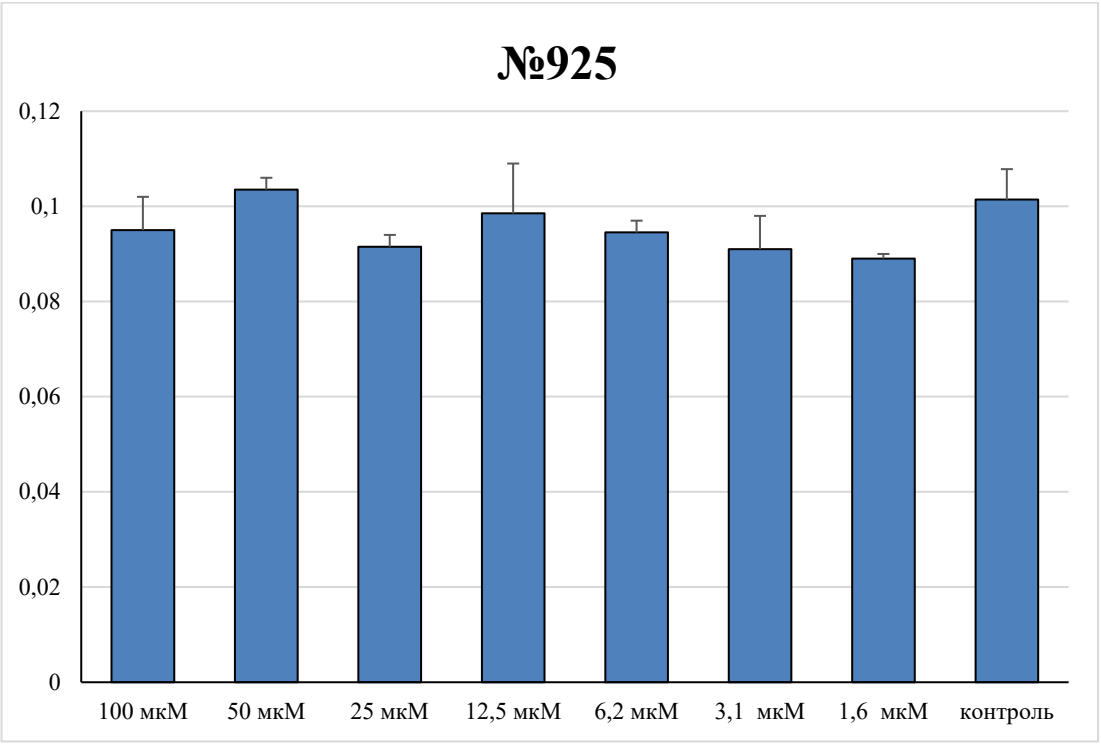


Рисунок 5.3.3 Відновлення солі 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду до кристалів формазану мітохондріями клітин мікроглії лінії CACO2 за дії сполуки №925

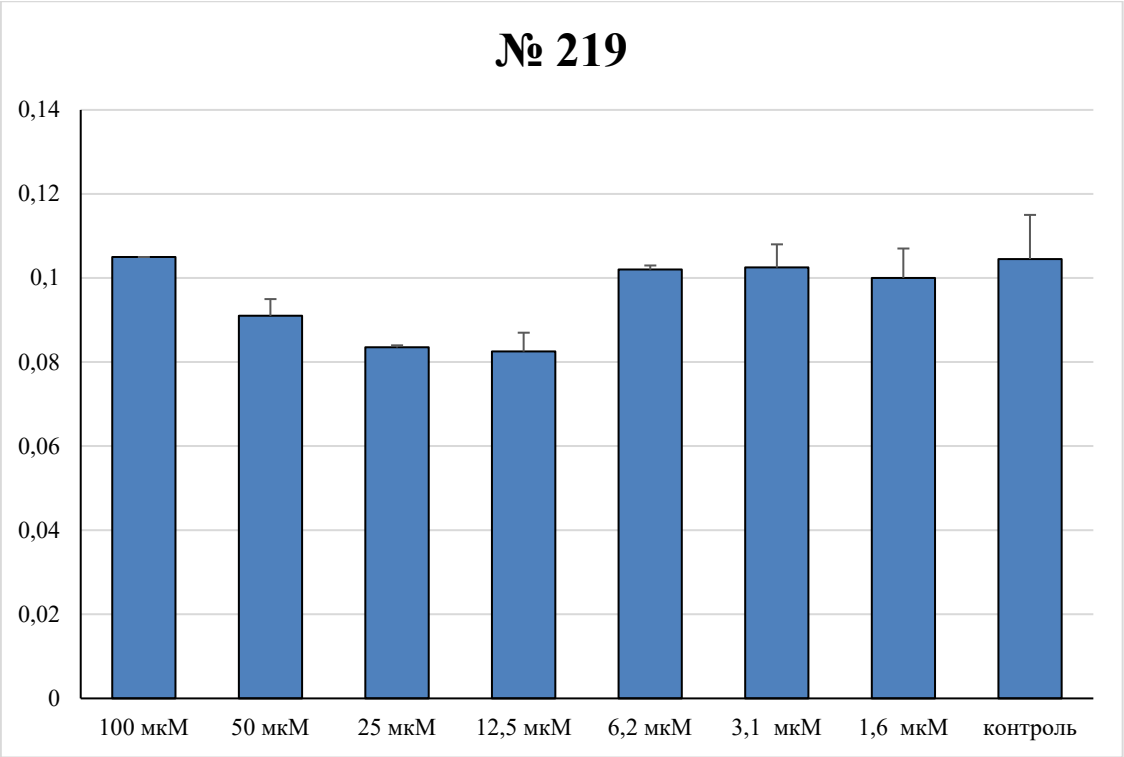


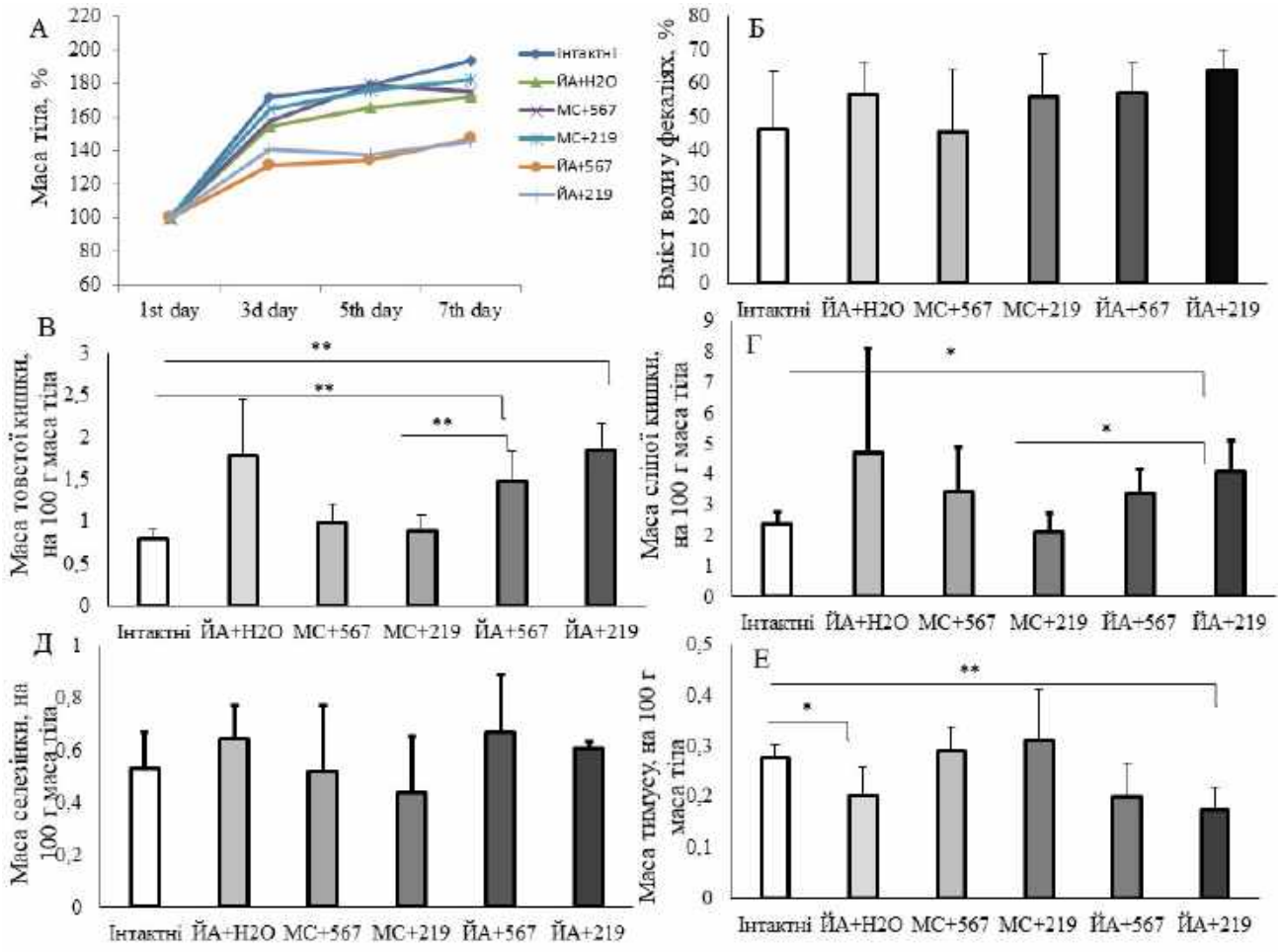
Рисунок 5.3.4 Відновлення солі 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду до кристалів формазану мітохондріями клітин мікроглії лінії CACO2 за дії сполуки №219.

5.4. Результати досліджень змін кишкової бар'єрної функції, епітеліального транспорту, протизапальних ефектів.

5.4.1. Дослідження впливу синтезованих хімічних зондів 567 та 219 на фізіологічні показники у щурів при моделюванні виразкового коліту

Ми дослідили зміни маси тіла та імунних органів (товста кишка, цекум, тимус, селезінка), а також відсоткові зміни кількості води у фекаліях щурів на фоні перебігу запальних процесів в товстій кишці, а також ефекту синтезованих хімічних зондів 567 та 219, які пригнічують активність ACE2.

Як видно з рисунку 5.4.1. розвиток йодоацетамід викликаного коліту зумовлював достовірне збільшення маси товстої кишки, що є ознакою інфільтрації лейкоцитів, набряку та перебігу інших запальних процесів. Крім того спостерігалася тенденція до збільшення маси селезінки і зменшення маси тимуса, що свідчить про системне запалення та загальний стресовий вплив.



* - p<0,05, ** - p<0,01

Рисунок 5.4.1. Зміна фізіологічних показників у щурів з індукованим колітом після 7 денного введення новосинтезованих інгібіторів ACE-2 219 та 567 (100 мг/100 г маси тіла тварини, i.p., n = 4) або 0,1 мл дистильованої води (n = 4). А – маси тіла щурів, виражена у відсотках; Б – частка води у фекаліях щурів. В – зміна маси товстої кишки у перерахунку на 100 г маси тіла тварини; Г – маса сліпої кишки у перерахунку на 100 г маси тіла тварини; Д – маса селезінки у перерахунку на 100 г маси тіла тварини Е – маса тимусу у перерахунку на 100 г маси тіла тварини. Значення представлені як середнє значення ±SD.

Слід зауважити, що системне введення щурам плацебо (без коліту) обох сполук 567 та 219 не мало ефекту на вимірювані показники у порівнянні з інтактним контролем. Цікавим є лише одне спостереження – це збільшення маси тимусу, особливо після введення сполуки 219 (рис 5.4.2. Е). Вилочкова залоза (тимус) є головним лімфоїдним органом, який регулює функції імунної та ендокринної систем шляхом контролю рівня гормонів і цитокінів. Вилочкова

залоза захищає від різних внутрішніх і зовнішніх стресів за допомогою імунорегуляторних властивостей, нервової системи та ендокринних шляхів. Вилочкова залоза контролює проліферацію клітин, апоптоз, гормони та нейропептиди, а також регулює диференціацію Т-клітин і вироблення репертуару Т-клітин. З віком розмір тимусу зменшується, що одною із гіпотез більшою схильності до COVID19 у літніх людей. Цей ефект викликаний пригніченням ACE2 потребує більш детального дослідження.

Зауважимо, що введення обох сполук 567 та 219 справляло негативний вплив на загальний стан щурів з експериментальним колітом**,** що відображалося у меншій масі тіла тварин навіть на 7й день експерименту у порівнянні з групою тварин яким вводили дистильовану воду на фоні експериментального коліту (рис. 5.4.1 А).

Решта показників (рис. 5.4.1) достовірно не відрізнялися від таких, які спостерігалися за розвитку коліту.

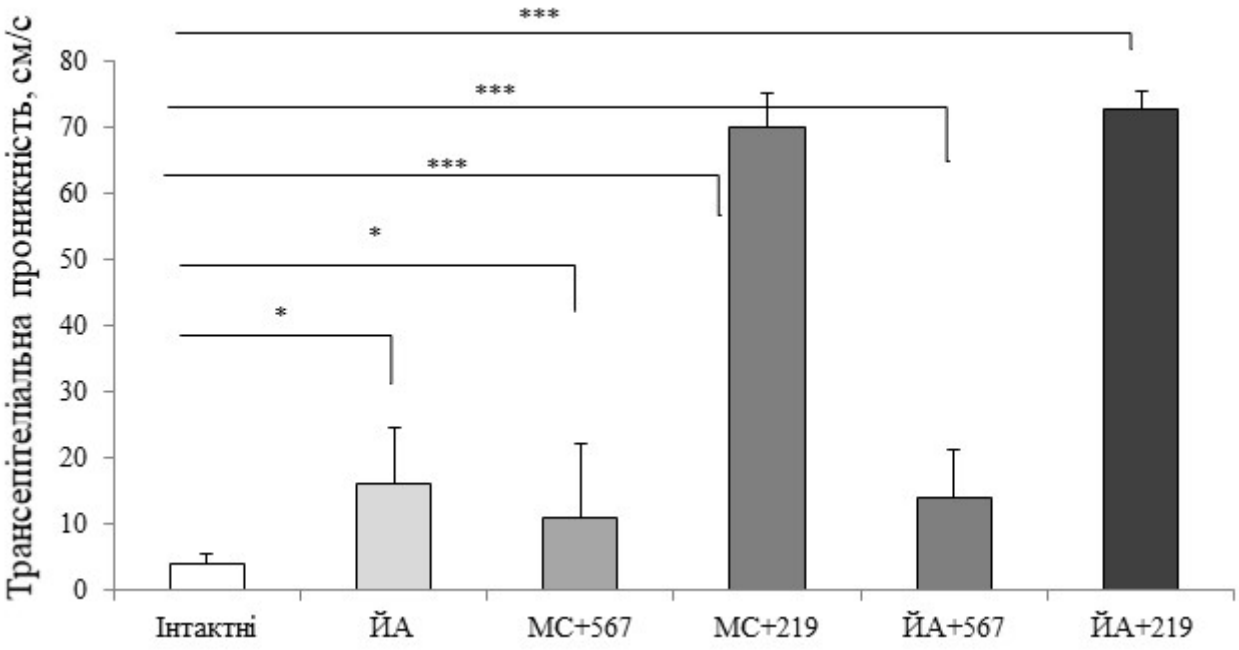
Отримані нами дані не підтримують раніше опубліковані щодо лікувального ефекту блокатора ACE2 рецептора на перебіг експериментального колту. В опублікованих дослідженнях були використані щури самки, яким індукували коліт введенням протягом 5 днів 5% DSS у питній воді. Протягом наступних 9 днів тварин двічі на день вводили підшкірно GL1001 (30, 100, 300 мг/кг). Ефект порівнювали з референс речовиною сульфасалазином (150 мг/кг, перорально) або плацебо. Високі дози GL1001 покращували спричинену DSS активність захворювання, включаючи пролапс прямої кишки та кишкові кровотечі. Найбільш стійкий ефект GL1001 спостерігався через 48-96 годин після лікування DSS і був порівнянний за величиною з ефектом сульфасалазину.

5.4.2. Вплив синтезованих хімічних зондів 567 та 219 на трансепітеліальну проникність епітелію товстої кишки щурів

Проникність кишкового бар’єру – важливий показник, що вказує на інтегративну цілісність кишкового барєру і відповідно захист організму від розвитку запалення, спричиненого проникненням бактеріальних антигенів і їх контакту с імунною системою кишечника. Парацелюлярну проникність FITC-

декстрану через серозно-мукозну частину товстої кишки вимірювали: до додавання FITC-декстрану та через 10, 20, 30 та 40 хв [69].

Дослідження трансепітеліальної проникності епітелію товстої кишки щурів показало, що після 7 денного введення ново синтезованої сполуки 567, епітелій ставав достовірно більш проникним для проходження FITC-декстрану – показник збільшився у 3 рази, щодо речовини 219 показники збільшилися у 17,5 разів (рис. 5.4.2). На фоні змодельованого експериментального коліту за дії речовини 567 не мала вірогідних відмінностей у порівнянні з контрольною групою з модельованим колітом (16,04±0,9 см/с та 13,99±2,73 см/с відповідно). Щодо речовини 219 показники збільшувалис 4,5 рази порівнянноз контрольною групою з модельованим колітом. Це може свідчити про активну дію сполуки 219 щодо ефекту на проникність епітелію



* - p<0,05, *** - p<0,001

Рисунок 5.4.2. Зміна трансепітеліальної проникності мукозо-серозних препаратів епітелію товстої кишки експериментальної групи щурів з модельованим колітом (n = 4) та без коліту (n = 4) після 7 денного введення ново синтезованих речовин 567 та 219 (100 мг/100 г маси тіла тварини, і.р.). Контроль без коліту (n = 4), контроль з модельованим колітом (n = 4), M±SD.

5.4.3. Електрофізіологічні характеристики епітелію товстої кишки у щурів із коліт-індукованим колітом за дії синтезованих хімічних зондів 567 та 219.

Показали, що 7-денне введення речовини 567 були нижчими початкові показники струму короткого замикання у порівнянні з контролем (рис. 5.4.3 А). Групі якій моделювали йодоацетамід-індукований коліт та вводили дистильовану воду, мала найвищі початкові та кінцеві значення 34,79±9,9 μA/см^2 та 42,55±11,3 μA/см^2 відповідно. Щодо дії 219 речовини ми спостерігали стрімке зростання струму короткого замикання на 40 хвилині порівняно з контрольною групою тварин.

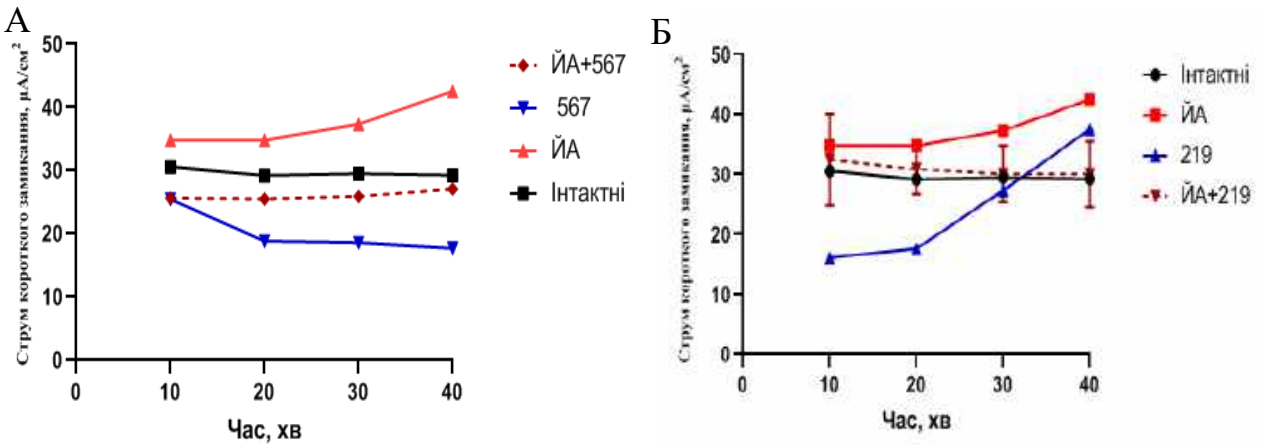


Рисунок 5.4.3. Зміна струму короткого замикання мукозо-серозних препаратів епітелію товстої кишки щурів з йодоацетамід-індукованим колітом після 7 денног введення речовин 567 та 219 (100 мг/100 г маси тіла тварини, і.р.) (n = 4) або 0,1 мл дистильованої води (n = 4).

5.4.4. Визначення ТБК активних продуктів у слизовій оболонці товстої кишки щурів при моделюванні виразкового коліту.

В результаті проведених досліджень встановлено, що в нормі (група щурів, що отримувала воду) рівень ТБК становить 128,83 ±30,76 нмоль/мг, після 7 денного ведення синтезованих хімічних зондів 567 та 219 ці показники незначно знижувалися 95,82±1,57 та 64,49±8,65 нмоль/мг відповідно (рис.3.4.). За дії сполук 567 та 219 при виразковому коліті ТБК-активні сполуки незначно збільшувалися порівняно з контрольними значеннями 151,05±26,91 та 141,45±34,39 нмоль/мг

відповідно та не достовірного зниження порівняно з групою коліту 249,13±68,97 нмоль/мг.

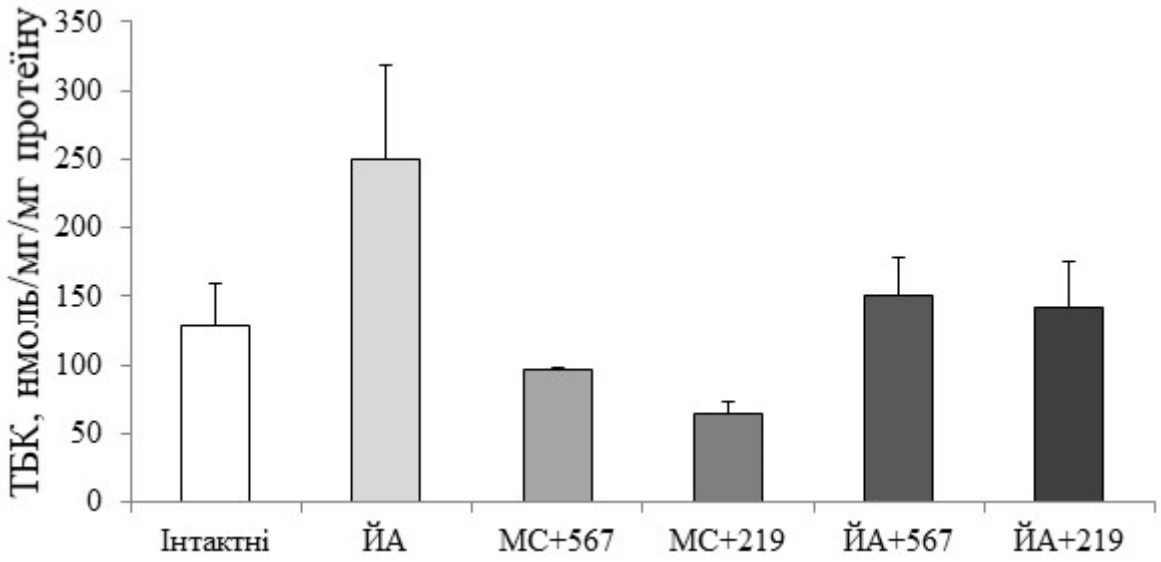
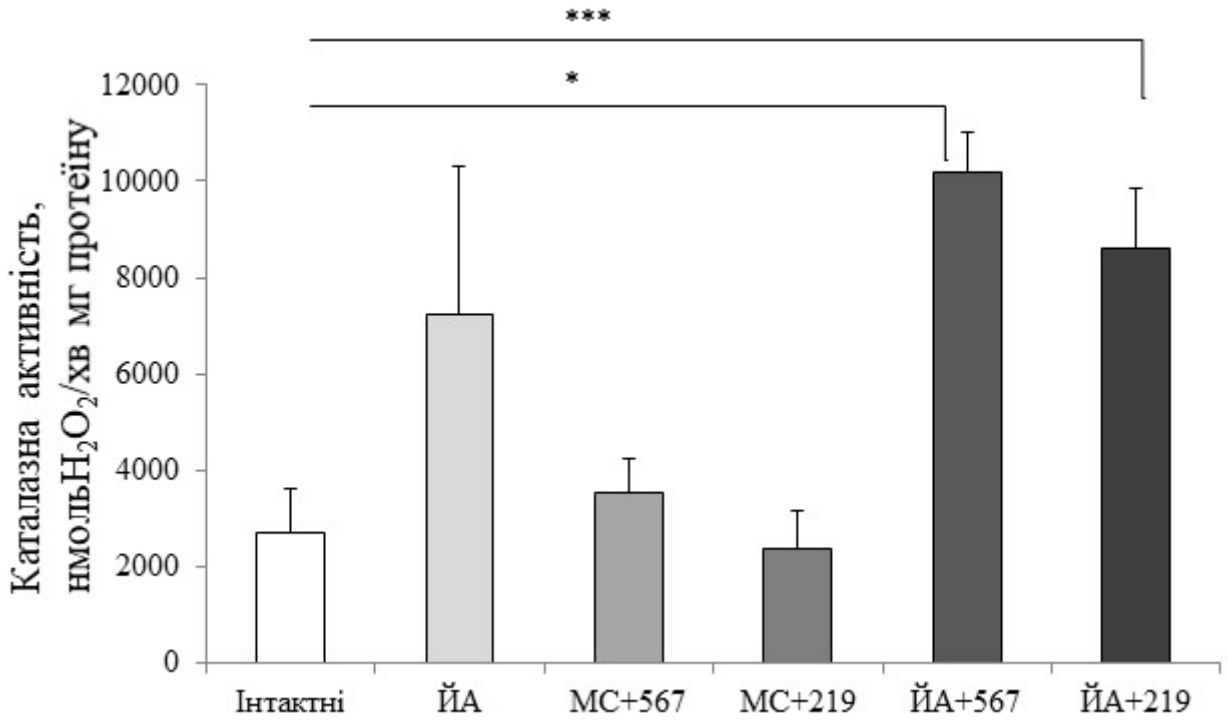


Рисунок 5.4.4. Рівень ТБК у слизовій оболонці щурів за дії синтезованих хімічних зондів 567 та 219 (100 мг/кг, і.р.). M±SD. n=4.

5.4.5. Визначення активності каталази у слизовій оболонці товстої кишки щурів при моделювання виразкового коліту

В результаті проведених досліджень встановлено, що в нормі (група щурів, що отримувала воду) рівень активності каталази становить 2714,79±899,69 нмоль H_2O_2/хв*мг, групі тварин яким вводили синтезовані речовини 567 та 219 при викликаному йод ацетамід-викликаному коліті, активність каталази становила 10170,19±833,33 H_2O_2/хв*мг та 8614,39±1248,60 відповідно, що значно збільшувалися показники в порівнянні з контрольними значеннями (рис. 5.4.5).



* - p<0,05, *** - p<0,001

Рисунок 5.4.5. Активність каталази в слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення нових синтезованих хімічних зондів 567 (n=4) та 219 (n=4) (100 мг/100 г маси тіла тварини, і.р.)

Описані зміни свідчать про порушення окисно-антиоксидантного балансу клітин слизової оболонки товстої кишки після введення новинтезованих речовин 567 та 219 та можуть призводити до незворотного пошкодження клітин. Наслідком такого впливу є порушення бар'єрної функції, яке, зокрема, може спричинити підвищення проникності слизової оболонки товстої кишки із наступним розвитком запалення [70]. Показано, що оксидативний стрес є одним з основних механізмів, залучених в патогенез запальних захворювань кишечника [71].

5.4.6. Визначення рівня мієлопероксидазної активності у слизовій оболонці товстої кишки щурів при моделювання виразкового коліту.

Запальне захворювання кишечника (ЗЗК) - це виснажливий розлад, що включає запалення шлунково-кишкового тракту. Захворюваність на ЗЗК зростає у всьому світі. Імунологічні реакції шлунково-кишкового тракту (ШКТ) на змінену мікробіоти кишечника , пошкодження слизової оболонки та втрату функції

епітеліальних клітин кишечника – все це сприяє складний механізм, що лежить в основі патогенезу ЗЗК.

Для визначення рівня МРО, як маркера інфільтрації лейкоцитів і ступеня запального процесу, ми визначали МРО за дії синтезованих речовин 567 та 219 в нормі та при експериментальному виразковому коліті. Нами була обрана модель йодацетамід-викликаного коліту, яка чітко характеризується визначеним запальним процесом.

Рівень активності МРО у щурів, що ректально отримували 1%-вий розчин метилцелюлози становив 1,55±0,17 U/г, що інтраперитоніально отримували дистильовану воду (рис. 3.6). Ректальне введення йодоацетаміду зумовлювало підвищення активності МРО (2,25±1,06 U/г). При введенні речови 567 та введення речовини на фоні йодацетамід-індукованого коліту зумовлювало підвищення активності МРО 3,48±0,06 U/г та 3,91±1,56 U/г відповідно).

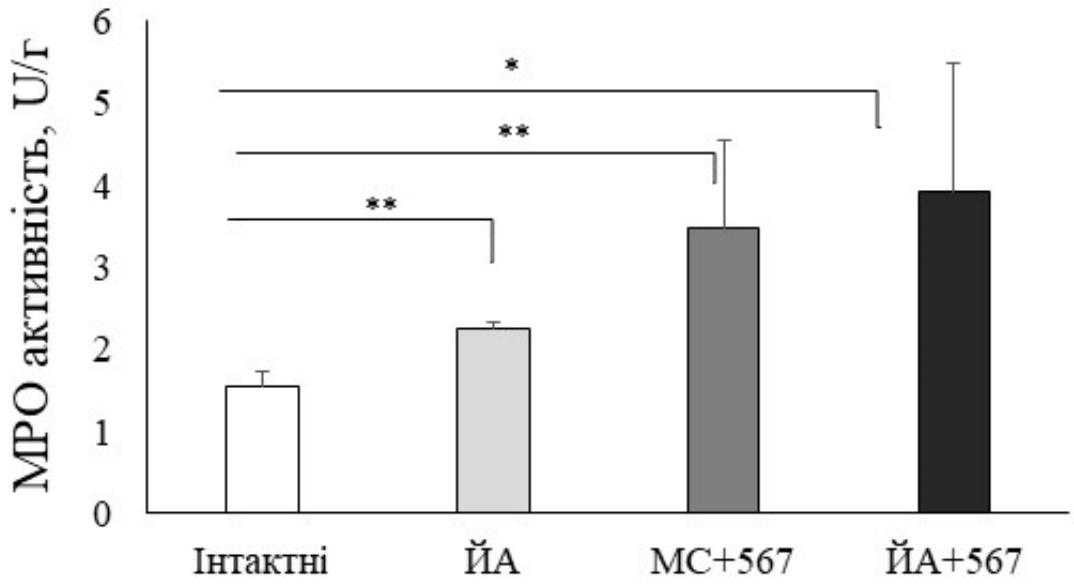


Рисунок 5.4.6. Мієлопероксидазна активність у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення нових синтезованих хімічних зондів 567 (n=4) (100 мг/100 г маси тіла тварини, і.р.), M±SD, * – P<0,05, ** - P<0,01.

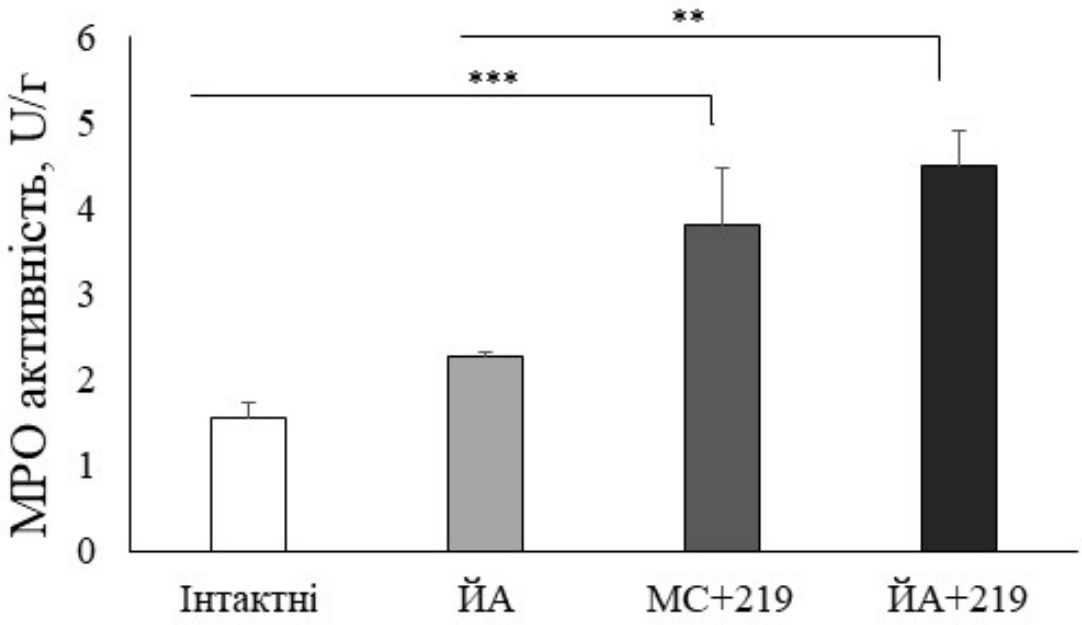


Рисунок 5.4.7. Мієлопероксидазна активність у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення нових синтезованих хімічних зондів 219 (n=4) (100 мг/100 г маси тіла тварини, і.р.), M±SD, ** – P<0,01, *** - P<0,001.

Аналогчічну ситуацію ми спостерігали при введенні новосинтезованої речовини 219.

Отримані нами дані, підтверджують роль МРО як адекватного маркеру розвитку запального процесу та інфільтрації нейтрофілів.

Висновки

1.Семиденне інтраперитоніальне введення новосинтезованих речовин 567 та 219, в дозі 100 мг/100 г маси тіла щура призводило до поглиблення негативнго ефекту йодоацетамід-викликаного коліту у щурів, що відображалося на подальшому збільшенні трансепітеліальної проникності.

2. 7-ми денне інтраперитоніальне введення новосинтезованих речвин 567 та 219, в дозі 100 мг/100 г маси тіла щура викликало порушення окисно-антиоксидантного балансу в слизовій оболонці товстої кишки щурів. Збільшення вмісту калазно-активних сполук асоціювалось з дисбалансом активності ферментів антиоксидантного захисту.

РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ СКОРОЧУВАЛЬНИХ РЕАКЦІЙ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ СУДИН У ВІДПОВІДЬ НА ГУМОРАЛЬНУ СТИМУЛЯЦІЮ В УМОВАХ ДІЇ БЛОКАТОРІВ АСЕ 2..

Ендотеліальна дисфункція відноситься до системного стану, при якому ендотелій втрачає свої фізіологічні властивості, включаючи тенденцію сприяти розширенню судин, фібринолізу та антиагрегації. Дані, отримані у пацієнтів з COVID-19 (наприклад, високий кров'яний тиск, тромбоз, емболія легеневої артерії, запальні зміни в ендотелії) свідчать про те, що вірус націлений на ендотелій, один з найбільших органів людського організму [Celestino Sardu, Jessica Gambardella, Marco Bruno Morelli Xujun Wang, Raffaele Marfella, ; Gaetano Santulli, Preprints (www.preprints.org) |s COVID-19 an endothelial disease? Clinical and basic evidence NOT PEER-REVIEWED | Posted: 13 April 2020 doi:10.20944/preprints202004.0204]

У людини ідентифіковані і найбільш повновивчені два підтипа, пов'язаних з G-білком рецепторів ангіотензину II - АСЕ і АСЕ2. АСЕ рецептори локалізовані в різних органах і тканинах, переважно в гладких м'язах судин, серці, печінці, корі надниркових залоз, нирках, легенях, в деяких областях мозку. Більшість фізіологічних ефектів ангіотензину II, включаючи і несприятливі, опосередковується АСЕ рецепторами:

- артеріальна вазоконстрикція, в т.ч. вазоконстрикция артеріол ниркових клубочків, підвищення гідравлічного тиску у ниркових клубочках,
- посилення реабсорбції натрію в проксимальних ниркових канальцях,
- секреція альдостерону короюнаднирників,
- секреція вазопресину, ендотеліну-1,
- вивільнення реніну, - посилення вивільнення норадреналіну з симпатичних нервових закінчень, активація симпатоадреналовоїсистеми,
- проліферація гладких м'язів судин, гіперплазія інтими, гіпертрофія кардіоміоцитів, стимуляція процесів ремоделювання судин і серця.

При артеріальній гіпертензії на тлі надмірної активації РАС опосередковувані АСЕ рецепторами ефекти ангіотензину II прямо або побічно

сприяють підвищенню артеріального тиску. Крім того, стимуляція цих рецепторів супроводжується шкідливою дією ангіотензину II на серцево-судинну систему, включаючи розвиток гіпертрофії міокарда, потовщення стінок артерій, тощо.

Ефекти ангіотензину II, опосередковані ACE2 рецепторами, були виявлені лише в останні роки. Велика кількість ACE2 рецепторів виявлено у тканинах плоду (в т.ч. і в мозку). У постнатальному періоді кількість ACE2 рецепторів у тканинах людини зменшується. Експериментальні дослідження, зокрема у мишей, у яких був зруйнований ген, що кодує ACE2 рецептори, дозволяють припустити їх участь у процесах росту і дозрівання, включаючи проліферацію і диференціювання клітин, розвиток ембріональних тканин, а також формування дослідницького поведінки.

ACE2 рецептори знайдені в серці, судинах, надниркові залози, нирки, деяких областях мозку, репродуктивних органах, вт.ч.вматці, фолікулах яєчників, а також в ранах шкіри. Показано, що кількість ACE2 рецепторів може збільшуватися при пошкодженні тканин (вт.ч.судин), інфаркті міокарду, серцевої недостатності. Припускають, що ці рецептори можуть бути залучені в процеси регенерації тканині та програмованої загибелі клітин (апоптоз).

Дослідження останніх років показують, що кардіоваскулярні ефекти ангіотензину II, опосередковані ACE2 рецепторами, протилежні ефектам, обумовленим порушенням ACE рецепторів, і є відносно слабко вираженими. Стимуляція ACE2 рецепторів супроводжується вазодилатацією, пригніченням клітинного росту, в т.ч. придушенням проліфераці їклітин (ендотеліальних і гладком'язових клітин судинної стінки, фібробластів і ін.), гальмуванням гіпертрофії кардіоміоцитів. Фізіологічна роль рецепторів ангіотензину II другого типу (ACE2) у людини і їх зв'язок з кардіоваскулярним гомеостазом на даний час до кінця не з'ясовані. Синтезовані високоселективні антагоністи ACE2 рецепторів (CGP 42112A, PD 123177, PD 123319), які використовуються в експериментальних дослідженнях РААС. Інші ангіотензинові рецептори і їх роль в організмі людини та тварин мало вивчені.

6.1. Матеріали та методи

Дослідження проводили на дорослих щурах самцях Вістар з віварію ДУ ІФТ АМНУ. Евтаназію тварин проводили під CO_2-наркозом. Усі процедури з тваринами виконували відповідно до правил поводження та захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях.

Судини видаляли у щурів відразу після евтаназії і зберігали в охолодженому розчині Кребса такого складу (мМ): 132 NaCl, 4,7 KCl, 1,4 NaH_2PO_4, 1,0 $MgCl_2$, 1,8 $CaCl_2$, 25 $NaHCO_3$, 6,5 глюкози, pH 7,4 підтримували за допомогою газової суміші 5% CO_2/95% O_2. Ізольовані фрагменти торакальної аорти (ТА) очищували від жирової та сполучної тканини, фрагменти легеневої артерії (ЛА) залишали у нативному стані із збереженням периваскулярної жирової тканини (ПВЖТ), розрізали на кільця (до 2 мм). Кільця ТА і ЛА розміщували у проточній камері з розчином Кребса (36 ^{0}C) і розтягували на металевих гачках з попереднім навантаженням 1 та 0,5 г (10 і 5 mN), відповідно. Реакції кілець ТА і ЛА реєстрували в ізометричному режимі за допомогою тензодатчиків (FTK-0.1, Україна), використовуючи адаптер LabTrax 4-CDA (WPI, США) та програмне забезпечення DataTrax 2 (WPI, США).

Дослідження проводили на фрагментах судин після стабілізації їх скоротливої активності протягом 40-60 хв, а максимальну відповідь під дією 60 мМ KCl у розчині Кребса приймали за 100% у подальших розрахунках амплітуди скорочень (% KCl). Реакцію ТА і ЛА досліджували згідно трьох експериментальних протоколів. По-перше, вимірювали амплітуду скорочення кілець під дією фенілефрину (PE, 10^{-6} М). По-друге, вимірювали рівень ендотелій-залежного розслаблення PE-скорочених кілець (% PE) під дією ацетилхоліну (кумулятивний доза-ефект). По-третє, вимірювали амплітуду фазної реакції кілець ЛА (скорочення-розслаблення) у відповідь на зниження вмісту кисню у розчині Кребса. Судини, попередньо скорочені в присутності PE (10^{-6} М), послідовно витримували 10 хв в оксигенованому розчині Кребса (pO_2 ~135 мм р. ст.) за рахунок продування газової суміші 5% CO_2/20% O_2/75 % N_2, а потім витримували 50 хв у гипоксичному розчині Кребса (pO_2 ~5-6 мм р. ст.) за рахунок продування газової суміші 5% CO_2/95% N_2).

В роботі використовували солі кваліфікації х.ч. і ч.д.а., вітчизняного виробництва. Ацетилхолін (АХ) та фенілефрин (РЕ) виробництва Sigma (США). Достовірність результатів оцінювали за t–критерієм Стьюдента, розбіжності вважали значними за умови $p \leq 0,05$. Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою Origin Pro 8.1 (OriginLab Co, США) і Exel (Microsoft, США).

6.2. Результати та обговорення.

Дослідження проведені на фрагментах ТА не виявили будь-яких змін в ендотелій-залежних реакціях судин під впливом речовин 942 і 962 (до концентрації 10^{-4} М), як показано на Рисунку 6.2.1.

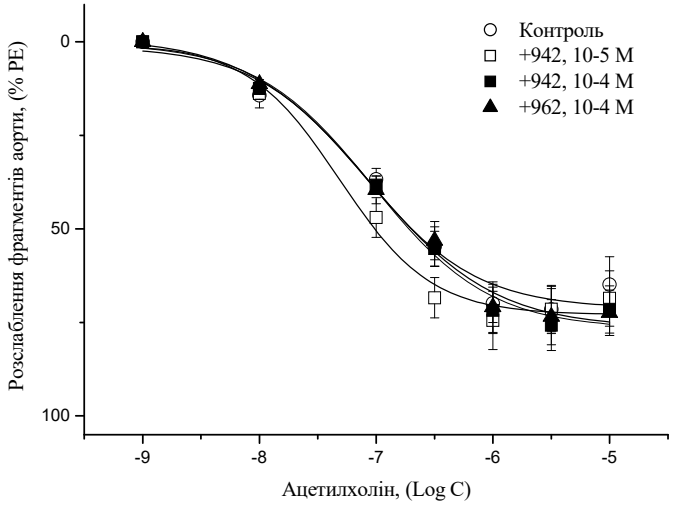


Рисунок 6.2.1. Доза-залежний ефект ацетилхоліну (АХ) на розслаблення РЕ-скорочених кілець (% РЕ) торакальної аорти (ТА) щурів. Реакції судин досліджували окремо (Контроль), а також в присутності речовини 942 (10^{-5} і 10^{-4} М) та речовини 962 (10^{-4} М). (n = 4-6).

Фрагменти внутрішньої легеневої артерії (ЛА) демонстрували виразну чутливість до речовин 942 і 962 (10^{-4} М), а саме досліджені речовини знижували рівень ендотелій-залежних реакцій судин у відповідь на ацетилхолін (зсув кривої доза-ефекту праворуч і зменшення амплітуди реакції), як представлено на Рисунку 6.2.2.

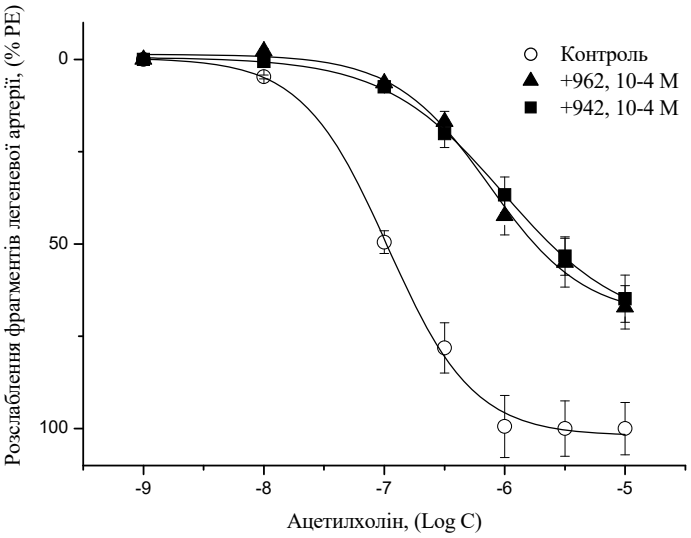


Рисунок 6.2.2. Доза-залежний ефект ацетилхоліну (АХ) на розслаблення РЕ-скорочених кілець (% РЕ) внутрішньої легеневої артерії (ЛА) щурів. Реакції судин досліджували окремо (Контроль), а також в присутності речовини 942 (10^{-4} М) і речовини 962 (10^{-4} М). (n = 5-8).

Разом з тим, фазні реакції фрагментів ЛА на гіпоксію суттєво змінювались в присутності речовин 942 та 962, а саме, підвищувався загальний рівень скоротливих реакцій і зменшувався рівень розслаблення, як показано на Рисунку 6.2.3.

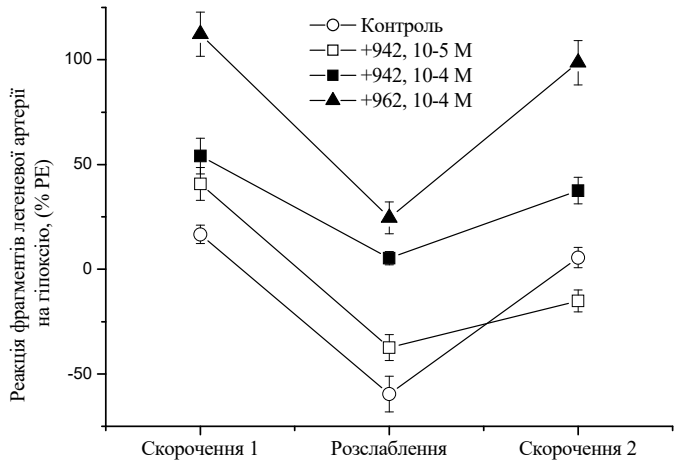


Рисунок 6.2.3. Фазні реакції (скорочення-розслаблення) кілець внутрішньої легеневої артерії (ЛА) щурів за умов гипоксичної гіпоксії. Реакції судин, які

попередньо скорочені під дією РЕ (% РЕ), досліджували окремо (Контроль), а також в присутності речовини 942 (10^{-5} і 10^{-4} М) і речовини 962 (10^{-4} М). (n = 5-8).

Висновки

1. Серед набору з 10-ти відомих з літератури сполук інгібіторів ACE2 синтезовано, відмасштабовано та оптимізовано сольову частину для 2-х, іще 2 синтезовані в мікрокількостях та знаходяться на фінальних стадіях оптимізації. З останніх 6-ти 2 знаходяться на фінальних синтезах та можуть бути отримані до кінця проекту. Синтез 4-ьох останніх сполук не можливо завершити до кінця терміну проєкту тому прийнято рішення припинити дослідження в цьому напрямку.
2. Побудована докінгова модель, яка перевірена на відомих референтних сполуках з високим Enrichment Factor. Модель використана для віртуального скринігу бібліотек сполук отриманих на основі – бази доступних стокових сполук Enamine DB (3,2 млн.), та RDB (1,4 млрд.). За допомогою багатоступеневого скринінгу, який вмішує різні хемоінформатичні інструменти, відібрано по 20 сполук-лідерів з обох баз. Методами молекулярної динаміки згенеровано сет з 180 сполук для перевірки *in vitro*. Всі набори сполук передані для синтезу та перевірки у лабораторії їх фактичної активності.
3. Скориговано та оптимізовано умови проведення скринінгу. Визначено IC_{50} для двох еталонних сполук. Значення IC_{50} для посилання “Abcam” та посилання з бібліотеки Enamine EN300-22203532 визначали як 185 та 0,9 нМ відповідно. 577 сполук було обрано за результатами молекулярного моделювання з бібліотеки стокових сполук Enamine DB та випробувано в режимі HTS у ферментативному аналізі методом флуоресценції. 7 сполук, які відповідають критеріям у%%> 3*SD+середня пластина, вибрано для аналізу дози-відповіді. Значення IC_{50} для вибраних сполук + 2 еталонних сполук були розраховані за кривими залежності від дози. Виявилося, що всі сполуки мають низьку ефективність інгібування ACE2, окрім одного з ідентифікатором Z1459912954, який демонструє значення IC_{50} 16,8

мкМ. Сполуки на основі Z1459912954 можна використати для подальшої хімічної модифікації для поліпшення його інгібуючої дії.

4. В дослідженнях дії новосинтезованих інгібіторів №925 та №219 не зафіксовано цитотоксичного/цитостатичного ефекту на імортализованих клітинах мікроглії BV-2 та клітинах товстого кишечника CACO2. Зафіксовано зростання проліферативної активності/відновлення солі 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду до кристалів формазану мітохондріями клітин мікроглії лінії BV-2 за дії інгібітору №925.

5. Усі сполуки, що було згенеровано в рамках докінгу на двох принципово різних моделях та які потрібні для проведення in vitro досліджень було синтезовано в мікрокількостях і надано для досліджень.

6. Фрагменти торакальної аорти щурів не чутливі до дії досліджених речовин 942 і 962. Фрагменти внутрішньої легеневої артерії щурів виявились чутливими до дії досліджених речовин 942 і 962, що є підставою для проведення подальших досліджень на цій моделі.

Перелік джерел посилання

1. Guan, W.-J. et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China // N. Engl. J. Med. – 2020 – V. 382 – P. 1708-172011.
2. Williams B. Renin Angiotensin System Inhibition as treatment for Covid-19? // EClinicalMedicine – 2021 – V. 37 – P. 101023.
3. Heyman, S. N.; Kinaneh, S.; Abassi, Z. The Duplicitous Nature of ACE2 in COVID-19 Disease // EBioMedicine – 2021 – V. 67 – P. 103356.
4. Xiao, F.; Tang, M.; Zheng, X.; Liu, Y.; Li, X., Shan, H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2 // Gastroenterology – 2020 – V. 158 – P. 1831-1833.
5. Xu, Y. et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding // Nat. Med. – 2020 – V. 26 – P. 502.
6. Pan, L. et al. Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study // Am. J. Gastroenterol. – 2020 – V. 115 – P. 766-773.
7. Li, Y.-C.; Bai, W.-Z.; Hashikawa, T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV-2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients // J. Med. Virol. – 2020 – V. 92 – P. 552-555.
8. Kowalczuk, S.; Bröer, A.; Tietze, N.; Vanslambrouck, J. M.; Rasko, J. E. J.; Bröer, S. A protein complex in the brush-border membrane explains a Hartnup disorder allele // FASEB J. – 2008 – V. 22 – P. 2880-2887.
9. Camargo, S. M. R. et al. Tissue-Specific Amino Acid Transporter Partners ACE2 and Collectrin Differentially Interact With Hartnup Mutations // Gastroenterology – 2009 – V. 136 – P. 872-882.
10. Hashimoto, T. et al. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation // Nature – 2012 – V. 487 – P. 477-481.
11. Gheblawi, M. et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System // Circul. Res. – 2020 – V. 126 – P. 1456-1474.

12. Liao, K. et al. Development of an enzymatic assay for the detection of neutralizing antibodies against therapeutic angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) // J. Immun. Met. – 2013 – V. 389 – P. 52-60.
13. Volochnyuk, D. M.; Ryabukhin, S. V.; Moroz, Y. S.; Savych, O.; Chuprina, A. A.; Horvath, D.; Zabolotna, Y.; Varnek, A.; Judd, D. B. *Drug Discovery Today*, **2019**, *24(2)*, 390-402.
14. Schreiber, S. L.; Kotz, J. D.; Li, M.; Aube, J.; Austin, C. P.; et al. *Cell*, **2015**, *161(6)*, 1252-1265.
15. Dales, N. A.; Gould, A. E.; Brown, J. A.; Calderwood, E. F.; Guan, B.; et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124(40)*, 11852-11853.
16. Mores, A.; Matziari, M.; Beau, F.; Cuniasse, P.; Yiotakis, A.; Dive, V., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51(7)*, 2216-2226.
17. Byrnes, J. J.; Gross, S.; Ellard, C.; Connolly, K.; Donahue, S.; Picarella, D. *Inflammation research*, **2009**, *58(11)*, 819-827.
18. Choi, S.-R.; Breugst, M.; Houk, K. N.; Dale Poulter C. *J. Org. Chem.*, **2014**, *79(8)*, 3572–3580.
19. Karuppusamy, V.; Ilangovan, A. *Org. Lett.*, **2020**, 22(18), 7147–7151.
20. Mues, K. *Synthesis*, **2001**, *3*, 487–498.
21. Di Gioia, M. L.; Costanzo, P.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Nardi, M.; Olivito, F.; Procopio, A. *RSC Advances*, **2017**, *7(58)*, 36482–36491.
22. Davies, S. G.; Ichihara, O.; Lenoir, I.; Walters, I. A. S. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, **1994**, *11*, 1411–1416.
23. Barnish, I. T.; Corless, M.; Dunn, P. J.; Ellis, D.; Finn, P. W.; et al. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34(8), 1323–1326.
24. Zabolotna, Y.; Lin, A.; Horvath, D.; Marcou, G.; Volochnyuk, D.M.; Varnek, A. Chemography: Searching for Hidden Treasures. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61*, 179–188.
25. Grygorenko, O.O.; Radchenko, D.S.; Dziuba, I.; Chuprina, A.; Gubina, K.E.; Moroz, Y.S. Generating Multibillion Chemical Space of Readily Accessible Screening Compounds. *iScience* **2020**, *23*, 101681.

26. Schreiber, S.L.; Kotz, J.D.; Li, M.; Aubé, J.; Austin, C.P.; Reed, J.C.; Rosen, H.; White, E.L.; Sklar, L.A.; Lindsley, C.W.; et al. Advancing Biological Understanding and Therapeutics Discovery with Small-Molecule Probes. *Cell* **2015**, *161*, 1252–1265.
27. Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; Godbout, K.; Parsons, T.; Baronas, E.; Hsieh, F.; et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14838–14843.
28. Gheblawi, M.; Wang, K.; Viveiros, A.; Nguyen, Q.; Zhong, J.-C.; Turner, A.J.; Raizada, M.K.; Grant, M.B.; Oudit, G.Y. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 1456–1474.
29. Warner, F.J.; Guy, J.L.; Lambert, D.W.; Hooper, N.M.; Turner, A.J. Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE2) and its Possible Roles in Hypertension, Diabetes and Cardiac Function. *Lett. Pept. Sci.* **2003**, *10*, 377–385.
30. Guy, J.L.; Jackson, R.M.; Acharya, K.R.; Sturrock, E.D.; Hooper, N.M.; Turner, A.J. Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2): Comparative modeling of the active site, specificity requirements, and chloride dependence. *Biochemistry* **2003**, *42*, 13185–13192.
31. Dales, N.A.; Gould, A.E.; Brown, J.A.; Calderwood, E.F.; Guan, B.; Minor, C.A.; Gavin, J.M.; Hales, P.; Kaushik, V.K.; Stewart, M.; et al. Substrate-Based Design of the First Class of Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11852–11853.
32. Mysinger, M.M.; Carchia, M.; Irwin, J.J.; Shoichet, B.K. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6582–6594.
33. Kirkpatrick, P. Gliding to success. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 299. https://doi.org/10.1038/nrd1364.

34. Ehrt, C.; Brinkjost, T.; Koch, O. A benchmark driven guide to binding site comparison: An exhaustive evaluation using tailor-made data sets (ProSPECCTs). *PLoS Comput. Biol.* **2018**, *14*, e1006483.
35. Konc, J.; Cesnik, T.; Konc, J.T.; Penca, M.; Janežič, D. ProBiS-database: Precalculated binding site similarities and local pairwise alignments of PDB structures. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 604–612.
36. Leinweber, M.; Fober, T.; Strickert, M.; Baumgärtner, L.; Klebe, G.; Freisleben, B.; Hüllermeier, E. CavSimBase: A Database for Large Scale Comparison of Protein Binding Sites. *IEEE Trans. Knowl. Data Eng.* **2016**, *28*, 1423–1434.
37. Tipnis, S.R.; Hooper, N.M.; Hyde, R.; Karran, E.; Christie, G.; Turner, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 33238–33243.
38. Halgren, T.A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490–519.
39. Huang, N.; Shoichet, B.K.; Irwin, J.J. Benchmarking sets for molecular docking. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6789–6801.
40. Truchon, J.F.; Bayly, C.I. Evaluating virtual screening methods: Good and bad metrics for the “early recognition” problem. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 488–508.
41. Bender, B.J.; Gahbauer, S.; Luttens, A.; Lyu, J.; Webb, C.M.; Stein, R.M.; Fink, E.A.; Balius, T.E.; Carlsson, J.; Irwin, J.J.; et al. A practical guide to large-scale docking. *Nat. Protoc.* **2021**, *16*, 4799–4832.
42. Halgren, T.A.; Murphy, R.B.; Friesner, R.A.; Beard, H.S.; Frye, L.L.; Pollard, W.T.; Banks, J.L. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750–1759.

43. Baell, J.B.; Holloway, G.A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719–2740.
44. Fischer, A.; Smieško, M.; Sellner, M.; Lill, M.A. Decision Making in Structure-Based Drug Discovery: Visual Inspection of Docking Results. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 2489–2500.
45. Guerrero, G.D.; Perez-S, H.E.; Cecilia, J.M.; Garcia, J.M. Parallelization of Virtual Screening in Drug Discovery on Massively Parallel Architectures. In Proceedings of the 2012 20th Euromicro International Conference on Parallel, Distributed and Network-based Processing, Garching, Germany, 15 February 2012; pp. 588–595.
46. Zhu, T.; Cao, S.; Su, P.-C.; Patel, R.; Shah, D.; Chokshi, H.B.; Szukala, R.; Johnson, M.E.; Hevener, K.E. Hit Identification and Optimization in Virtual Screening: Practical Recommendations Based on a Critical Literature Analysis. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6560–6572.
47. Tanrikulu, Y.; Krüger, B.; Proschak, E. The holistic integration of virtual screening in drug discovery. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 358–364.
48. Jaghoori, M.M.; Bleijlevens, B.; Olabarriaga, S.D. 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2016**, *30*, 237–249.
49. Rogers, D.; Hahn, M. Extended-Connectivity Fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 742–754.
50. Schreyer, A.M.; Blundell, T. USRCAT: Real-time ultrafast shape recognition with pharmacophoric constraints. *J. Cheminform.* **2012**, *4*, 27.
51. Margreitter, C.; Oostenbrink, C. MDplot: Visualise Molecular Dynamics. *R J.* **2017**, *9*, 164–186.
52. Rakhshani, H.; Dehghanian, E.; Rahati, A. Enhanced GROMACS: Toward a better numerical simulation framework. *J. Mol. Model.* **2019**, *25*, 355.
53. Parrinello, M.; Rahman, A. *J. Appl. Phys.*, **1981**, *52(12)*, 7182-7190.
54. Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. *J. Chem. Phys.*, **2007**, *126(1)*, 014101.

55. Abraham, M. J.; Gready, J. E. *J. Comp. Chem.*, **2011**. *32(9)*, 2031-2040.
56. MOPAC2016, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, HTTP://OpenMOPAC.net (2016).
57. MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; et.al *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102(18)*, 3586-616.
58. Perez, A.; Marchan, I.; Svozil, D.; Sponer, J.; Cheatham, T. E. 3rd; Laughton, C. A.; Orozco, M. *Biophys. J.*, **2007**, *92(11)*, 3817-3829.
59. Shivanyuk, A.N.; Ryabukhin, S.V. et al. Enamine real database: Making chemical diversity real // *Chimica Oggi*, – **2007**, *25*, 58 – 59.
60. Крилова ОО. (2007). Неспецифічний виразковий коліт та хвороба Крона. Питання діагностики та лікування. Здоров'я України 7(1): 8.
61. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. В кн.: Мурзін О.Б. Посібник до практичних занять з фізіології людини. - Дніпровськ: Видавництво Дніпропетровського університету. 2004. - С. 135-148.
62. Satoh H., Sato F., Takami K., et al. (1997). New ulcerative colitis model induced by SH blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis. Jpn. J. Pharmacol. Vol. 73. P. 299-309.
63. William M. Nauseef, M.D. (2018). Biosynthesis of Human Myeloperoxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 642. P. 1-9.
64. Стальная И.Д. Современные методы в биохимии. Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. Р. 66–68.
65. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. (1988). Метод определения активности каталазы. Лабораторное дело. № 1. С. 16–18.
66. Brown D.R., O'Grady S.M. (2008). The Ussing chamber and measurement of drug actions on mucosal ion transport. Curr Protoc Pharmacol. Chapter 7: Unit 7.12.
67. Clarke L.L. (2009). A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 296(6):G1151-66.

68. Терещенко, М. Ф., Тимчик, Г. С., Яковенко, І. О. (2019). Біофізика. Практикум. Вид-во «Політехніка», с. 140.
69. Syeda T., Sanchez-Tapia M., Pinedo-Vargas L., Granados O., Cuervo-Zanatta D., Rojas-Santiago, E., Perez-Cruz C. (2018). Bioactive Food Abates Metabolic and Synaptic Alterations by Modulation of Gut Microbiota in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *66*(4), pp. 1657–1682.
70. Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S. et al. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. Physiol Rev. Vol. 94, N 2. P. 329-354.
71. Moura F.A., de Andrade, Santos J.C. et al. (2015). Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? Redox Biology. Vol. 6. – P. 617-639.
72.

Додатки

Додаток 1. Список лігандів з бази даних ChEMBL з експериментально виміряною активністю Ki або IC50 проти ACE2.

Smiles	Molecule ChEMBL ID
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(O)cc1)C(=O)O	CHEMBL253224
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1cccc(Oc2ccccc2)c1)C(=O)O	CHEMBL252003
CCCC[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O	CHEMBL257270
CC[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O	CHEMBL257726
O=C(CS)N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O	CHEMBL258333
O=C(O)[C@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)NC(=O)[C@H](S)Cc1ccccc1	CHEMBL163454
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccccc1OCc1ccccc1)C(=O)O	CHEMBL254493
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1cccc2ccccc12)C(=O)O	CHEMBL400527
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(OCc2ccc(F)cc2F)cc1)C(=O)O	CHEMBL398771
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(OCc2ccc(F)cc2)cc1)C(=O)O	CHEMBL254911
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](C)C(=O)O	CHEMBL254900
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O	CHEMBL252391
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(OCc2cc(C(F)(F)F)cc(C(F)(F)F)c2)cc1)C(=O)O	CHEMBL252009
CC[C@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O	CHEMBL269996
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1cccc(-c2ccccc2)c1)C(=O)O	CHEMBL401397
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O	CHEMBL400526
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1cccc(OCc2ccccc2)c1)C(=O)O	CHEMBL254495
CC(C)C[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O	CHEMBL271225
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccccc1-c1ccccc1)C(=O)O	CHEMBL398545
CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(Oc2ccccc2)cc1)C(=O)O	CHEMBL254282
O=C(O)[C@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)NC(=O)[C@@H](S)C1CCCC1	CHEMBL404117
O=C(N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O)[C@@H](S)Cc1ccccc1	CHEMBL350414
O=C(N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O)[C@@H](S)CC1CCCCC1	CHEMBL271224
CC(C)(C)C[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O	CHEMBL271223
O=C(O)[C@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)NC(=O)[C@@H](S)C1CCCCC1	CHEMBL257026
CC(=O)N[C@@H](Cc1c[nH]cn1)C(=O)N[C@H](CC(C)C)P(=O)(O)CC(Cc1cc(-c2ccccc2)no1)C(=O)O	CHEMBL408182
CC(C)C[C@H](NC(=O)[C@@H]1CCCN1C(=O)[C@H](CO)NC(=O)[C@H](CS)NC(=O)[C@H](Cc1cnc[nH]1)NC(=O)[C@H](CO)NC(=O)[C@H](Cc1ccc(O)cc1)NC(=O)[C@@H](CC(=O)O)NC(=O)CN)C(=O)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(O)cc1)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(O)cc1)C(=O)N1CCC[C@H]1C(=O)N[C@@H](Cc1c[nH]c2ccccc12)C(=O)N[C@@H](Cc1c[nH]c2ccccc12)C(=O)N[C@@H](CCCCN)C(=O)N[C@@H](CS)C(=O)N[C@H](C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(O)cc1)C(=O)N1CCC[C@H]1C(=O)N[C@@H](CC(=O)O)C(=O)N1CCC[C@H]1C(=O)O)[C@@H](C)O	CHEMBL1240682
CC(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N1CCC[C@@H]1P(=O)(O)CC(Cc1cc(-c2ccccc2)no1)C(=O)O	CHEMBL261121
CC(C)C[C@@H](N)P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O	CHEMBL405232
CC(C)(S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O	CHEMBL404044

C[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O CHEMBL257727

CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(OCc2ccc(C(F)(F)F)cc2)cc1)C(=O)O CHEMBL251809

CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccccc1Oc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL251804

CC(C)C[C@@H](NC(=O)OCc1ccccc1)P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL264665

O=C(N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O)[C@@H](S)Cc1ccc2ccccc2c1 CHEMBL272925

O=C(O)[C@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)NC(=O)[C@@H](S)c1ccccc1 CHEMBL437595

O=C(O)[C@H](Cc1ccccc1)CP(=O)(O)[C@H]1CCCN1 CHEMBL261033

CC(=O)N[C@@H](Cc1c[nH]cn1)C(=O)N1CCC[C@@H]1P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL261423

CC(=O)N[C@@H](CCCCN)C(=O)N1CCC[C@@H]1P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL411942

C[C@@H](N)P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL405913

N[C@H](Cc1ccccc1)P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL412123

CC(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N1CCC[C@@H]1P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL260273

C[C@H](CP(=O)(O)[C@H]1CCCN1C(=O)OCc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL409713

CC(=O)N[C@@H](CCC(=O)O)C(=O)N1CCC[C@@H]1P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL263663

CC(=O)N[C@@H](Cc1c[nH]cn1)C(=O)N[C@H](CC(C)C)P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL408448

CC(=O)N[C@H](C(=O)N1CCC[C@@H]1P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O)C(C)C CHEMBL411052

CC(=O)N[C@@H](Cc1ccc(O)cc1)C(=O)N1CCC[C@@H]1P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL410509

CC(C)C[C@H](CP(=O)(O)[C@H]1CCCN1C(=O)OCc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL411298

CC(=O)N[C@@H](Cc1c[nH]cn1)C(=O)N1CCC[C@@H]1P(=O)(O)CC(Cc1cc(-c2ccccc2)no1)C(=O)O CHEMBL409105

CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(OCc2ccccc2)cc1)C(=O)O CHEMBL254703

CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc2ccccc2c1)C(=O)O CHEMBL253428

CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(OCc2ccc(F)c(F)c2)cc1)C(=O)O CHEMBL251808

CC[C@@H](C)[C@H](S)C(=O)NCC(=O)O CHEMBL401086

CC(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](Cc1ccccc1)P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL408705

CC(=O)N[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)N1CCC[C@@H]1P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL258698

O=C(N[C@H](Cc1ccccc1)P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O)OCc1ccccc1 CHEMBL258464

CC(=O)N[C@@H](C)C(=O)N1CCC[C@@H]1P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL409721

O=C(O)[C@H](Cc1ccccc1)CP(=O)(O)[C@H]1CCCN1C(=O)OCc1ccccc1 CHEMBL260677

C[C@@H](NC(=O)OCc1ccccc1)P(=O)(O)C[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O CHEMBL258683

O=C(N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O)[C@@H](S)CCc1ccccc1 CHEMBL402987

O=C(O)[C@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)NC(=O)[C@@H](S)C1CCC1 CHEMBL257229

CC(C)[C@H](S)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(-c2ccccc2)cc1)C(=O)O CHEMBL269997

CC(=O)CNC(=O)[C@H](CC(=O)O)NC(=O)[C@H](Cc1ccc(O)cc1)NC(=O)[C@H](CO)NC(=O)[C@H](Cc1c[nH]cn1)NC(=O)[C@@H]1CSSC[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](Cc2ccc(O)cc2)NC(=O)[C@@H]2CCCN2C(=O)[C@H](CC(=O)O)NC(=O)[C@@H]2CCCN2C(=O)[C@H](CCC(=O)O)NC(=O)CNC(=O)CNC(=O)CN)[C@@H](C)O)C(=O)N[C@@H](CCCCN)C(=O)N[C@@H](Cc2c[nH]c3ccccc23)C(=O)N[C@@H](Cc2c[nH]c3ccccc23)C(=O)N2CCC[C@H]2

C(=O)N[C@@H](Cc2ccc(O)cc2)C(=O)N[C@@H](Cc2ccc(O)cc2)C(=O)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N2CCC[C@H]2C(=O)N[C@@H](CO)C(=O)N1 CHEMBL436639

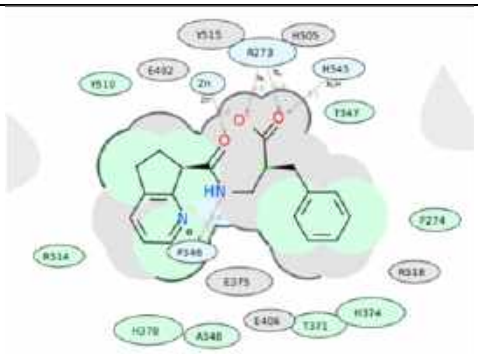
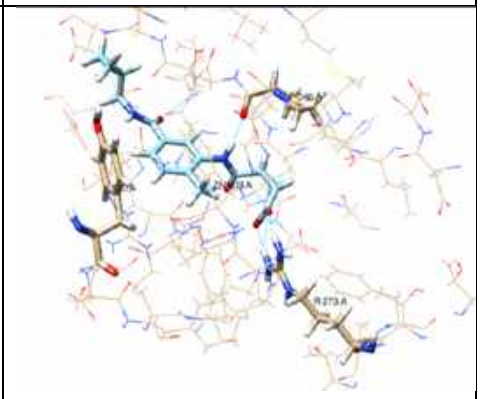
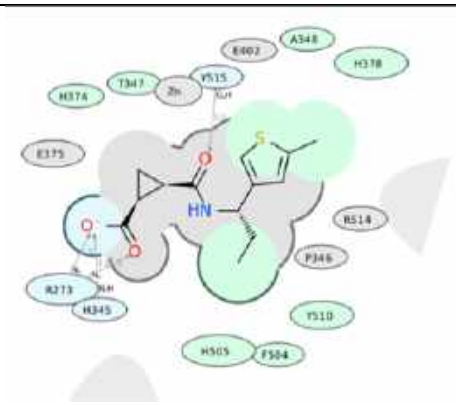
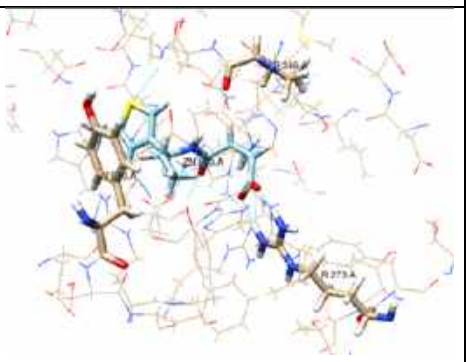
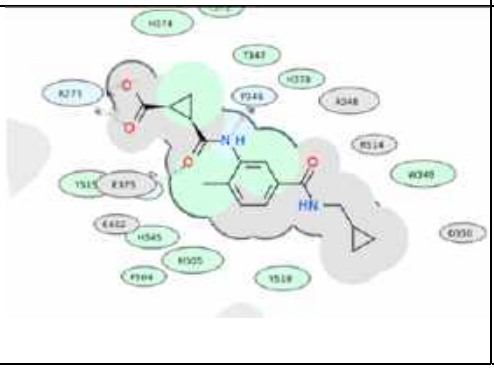
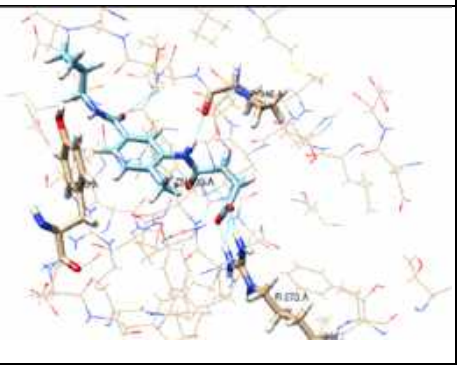
Cc1nnc(S/C(=C/c2ccc(-c3cc(Cl)ccc3C)o2)C(=O)O)[nH]1 CHEMBL252417

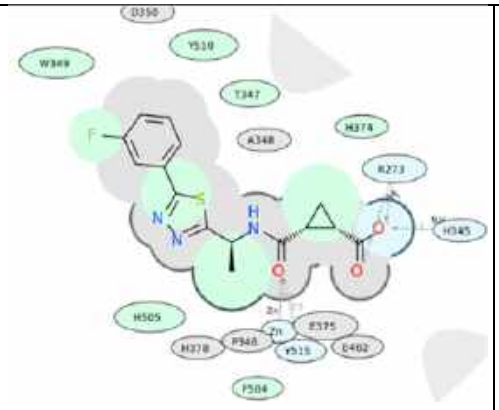
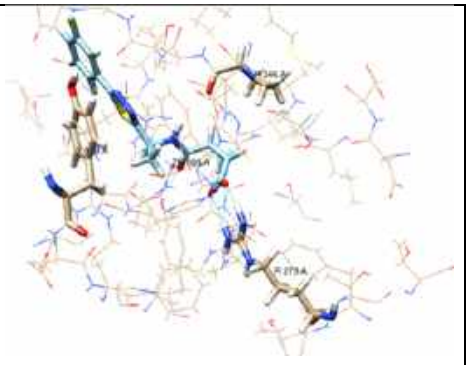
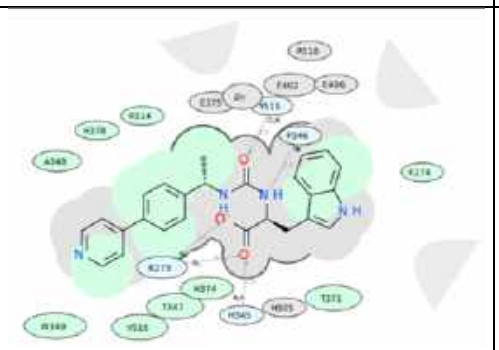
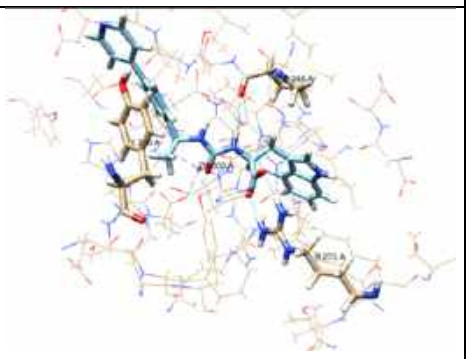
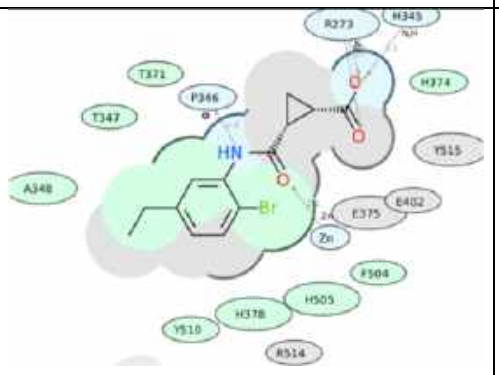
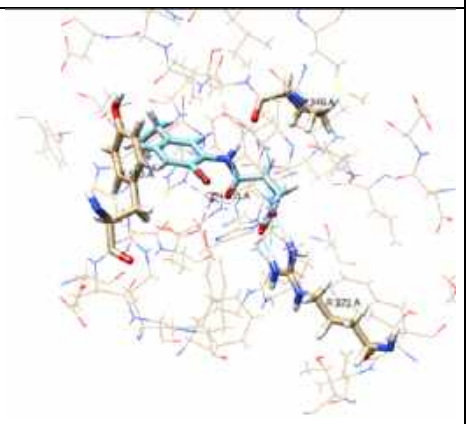
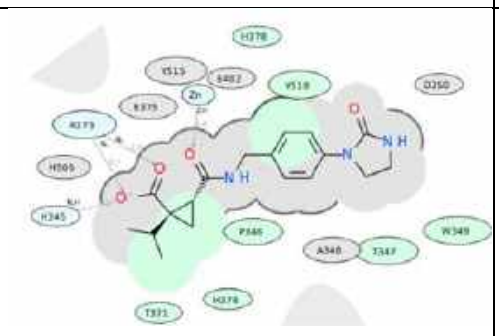
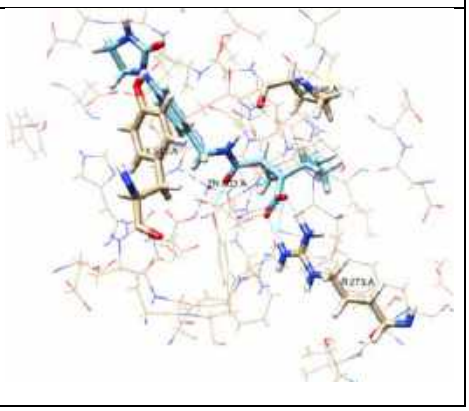
CC(C)C[C@H](N[C@@H](Cc1cncn1Cc1cc(Cl)cc(Cl)c1)C(=O)O)C(=O)O CHEMBL429844

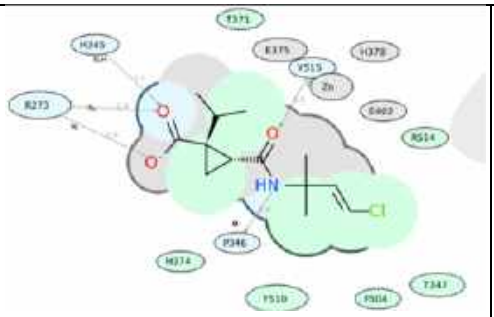
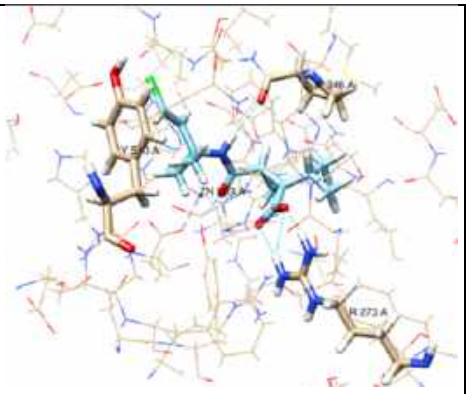
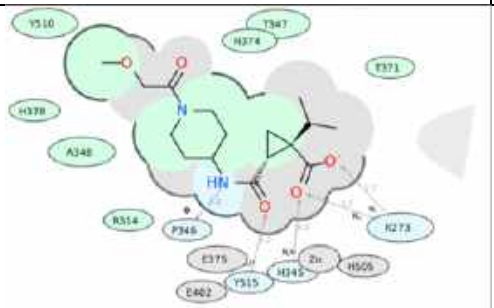
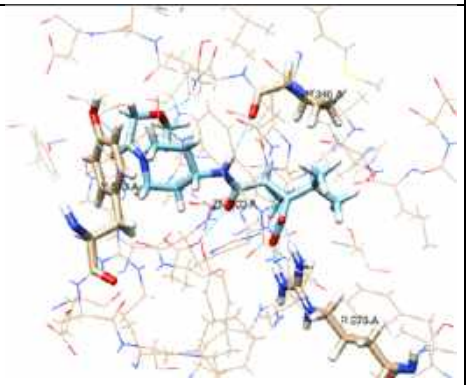
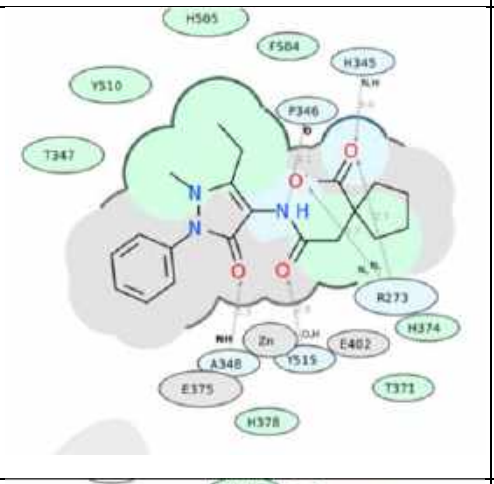
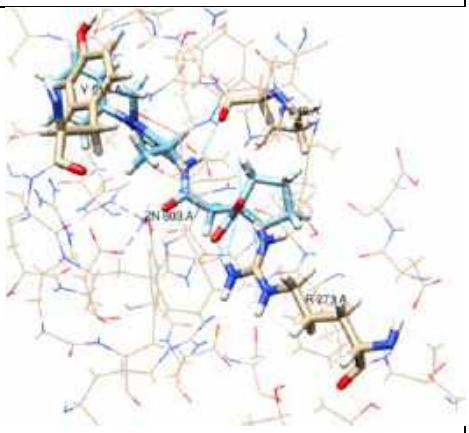
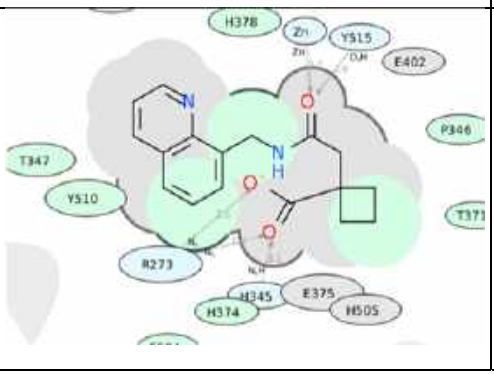
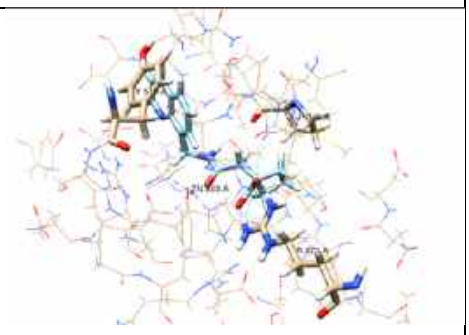
CNC(=O)[C@H](Cc1c[nH]cn1)NC(=O)CN(CCCc1ccccc1)CC(=O)O CHEMBL3235416

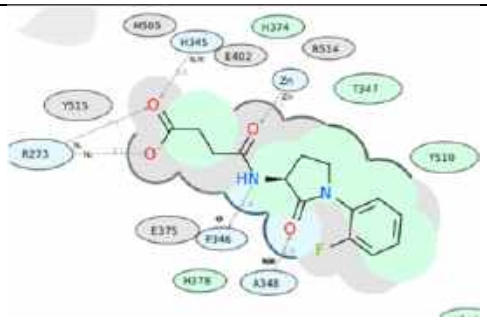
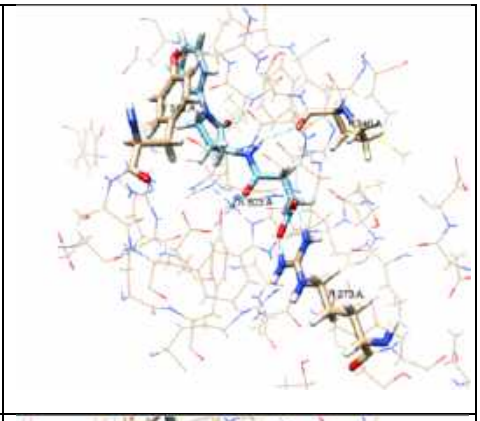
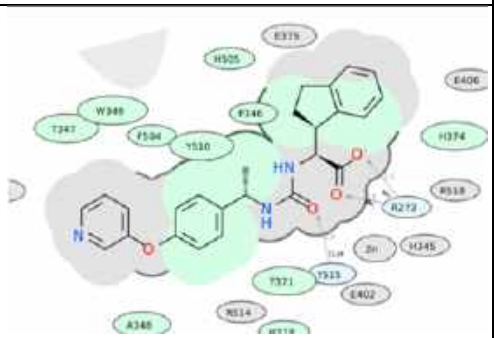
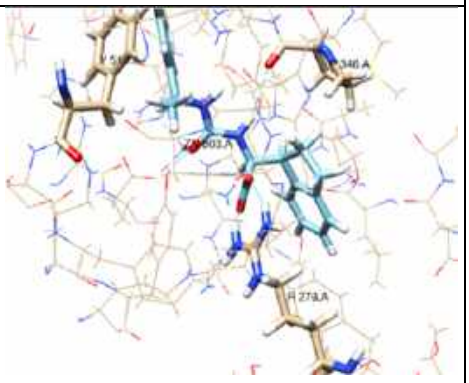
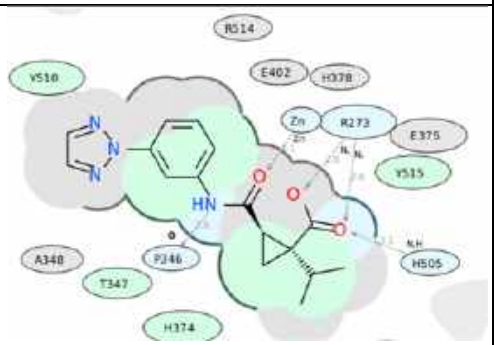
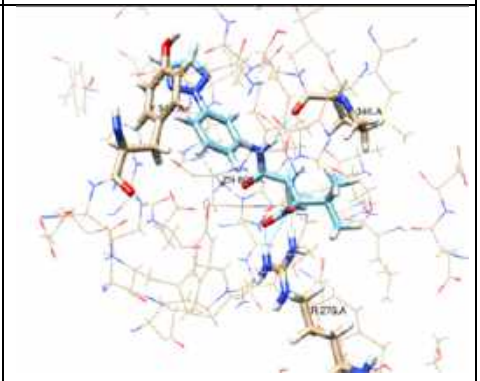
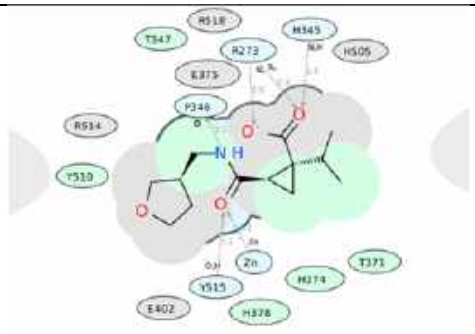
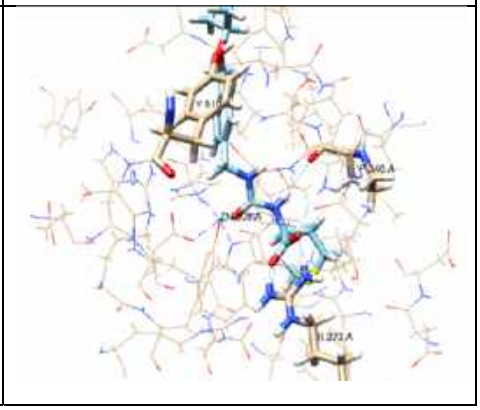
NCCNCCN1CC1 CHEMBL398940

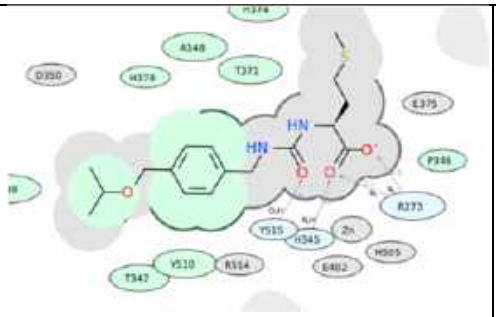
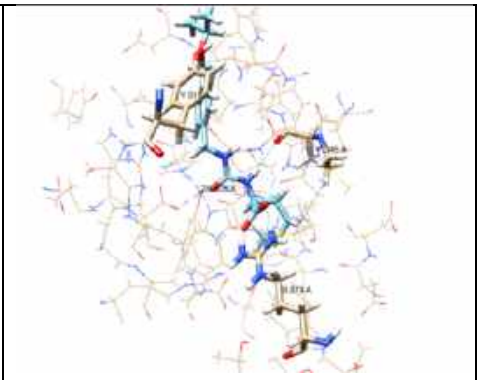
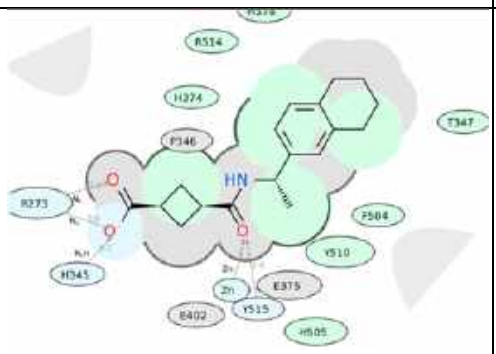
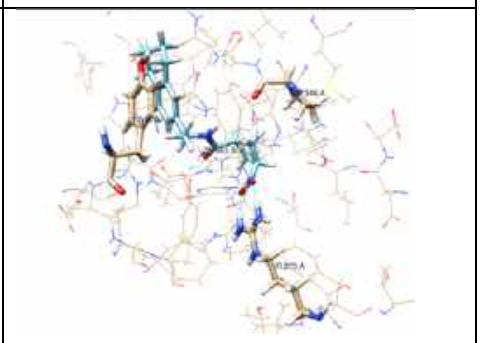
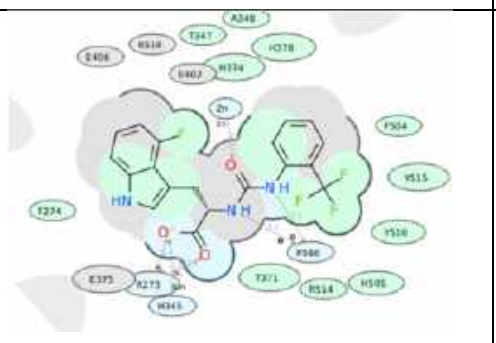
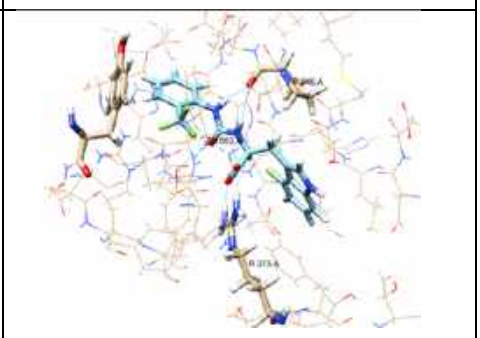
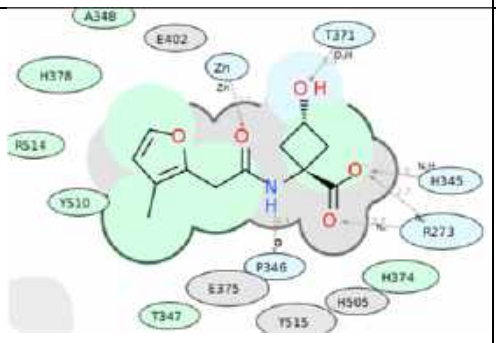
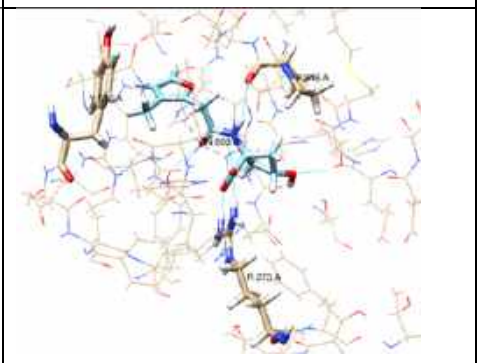
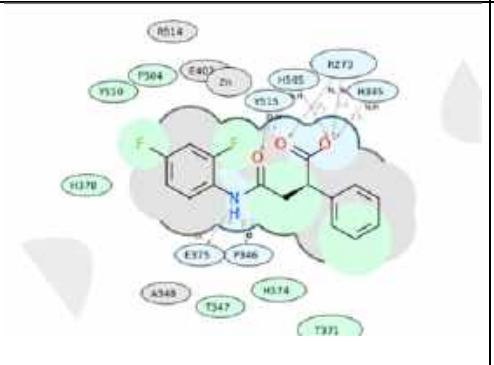
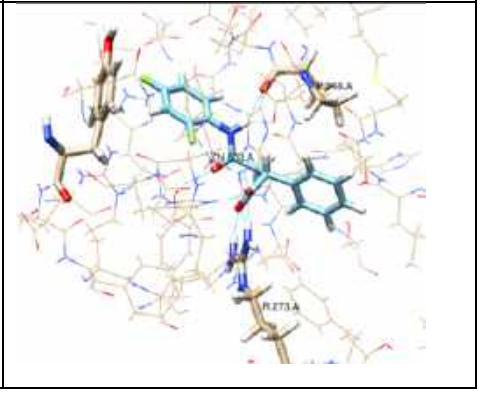
Додаток 2. 20 структур-лідерів з бази Enamine SSC, з продемонстрованою візуалізацію розташування у кишені для ACE2.

#	ID	Score	2d diagram of interaction	3d visualization of interaction
1	Z2831426920	-35,38		
2	Z3681209542	-26,96		
3	Z3681208436	-32,95		

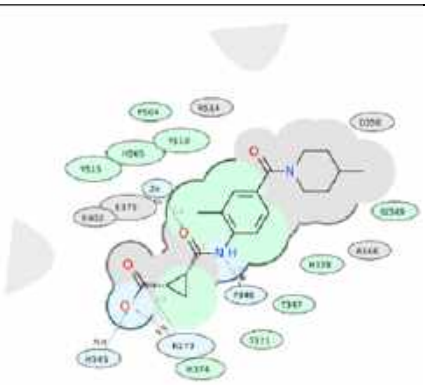
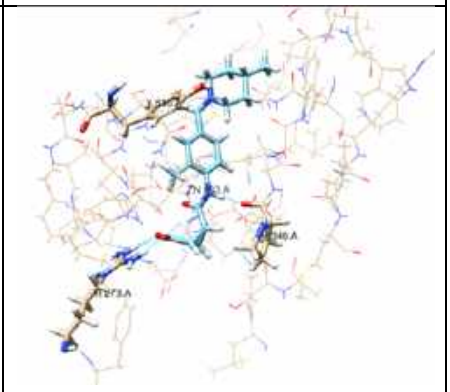
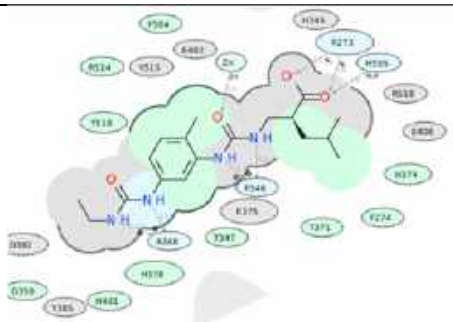
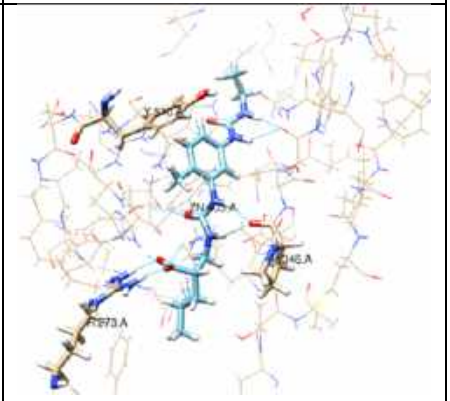
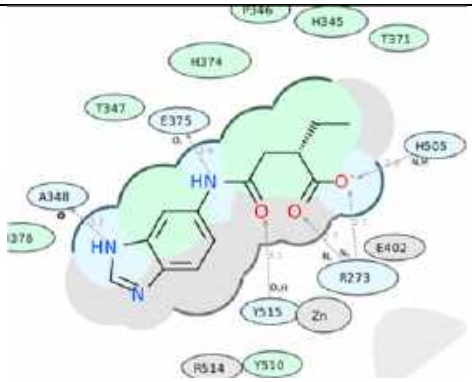
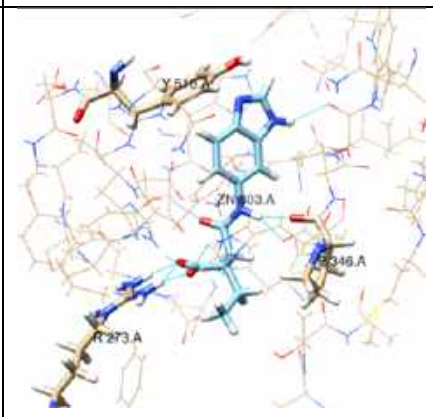
4	Z3681332013	-26,15		
5	Z3969355209	-38,31		
6	Z3681736600	-34,15		
7	Z3681207877	-30,48		

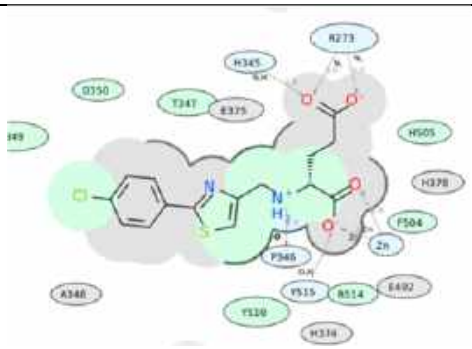
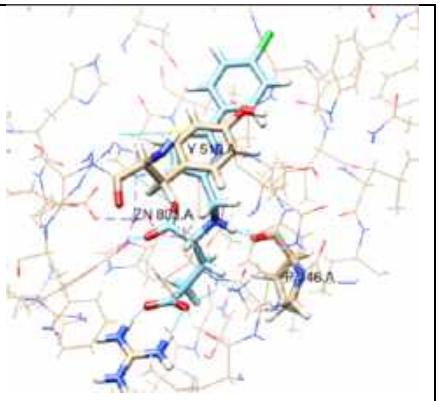
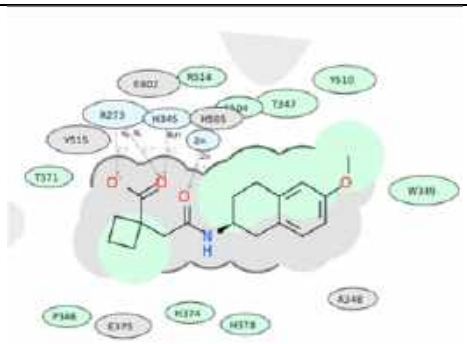
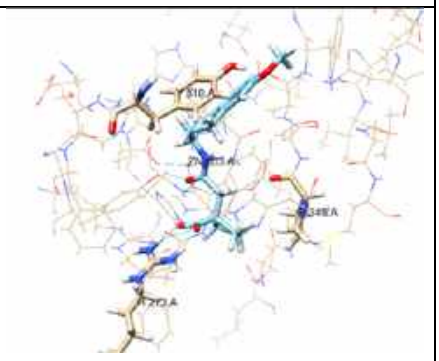
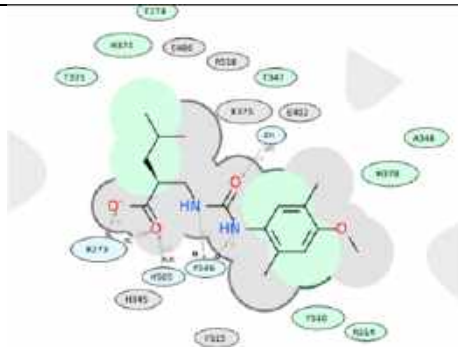
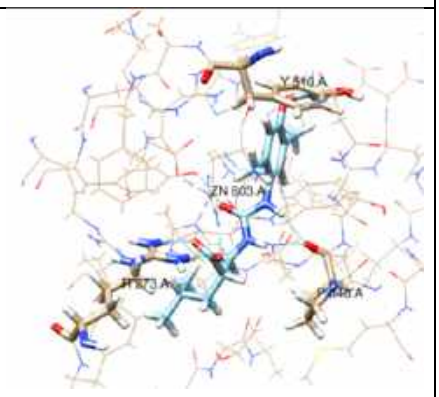
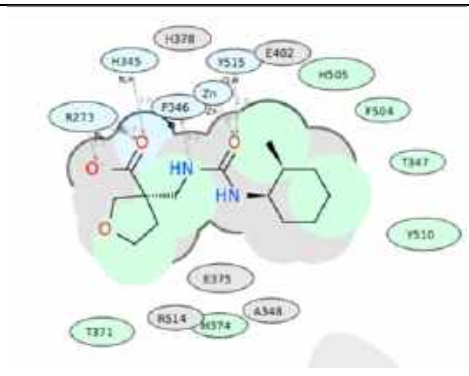
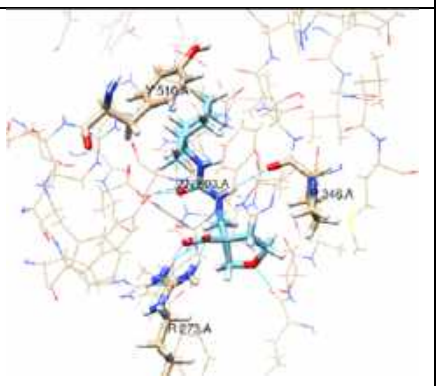
8	Z3681593370	-27,76		
9	Z3681369109	-25,08		
10	Z4188337437	-33,82		
11	Z3037294184	-30,6		

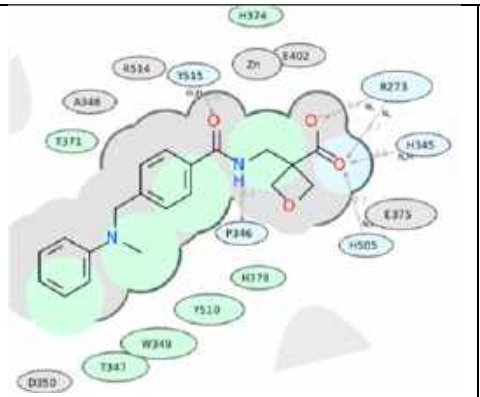
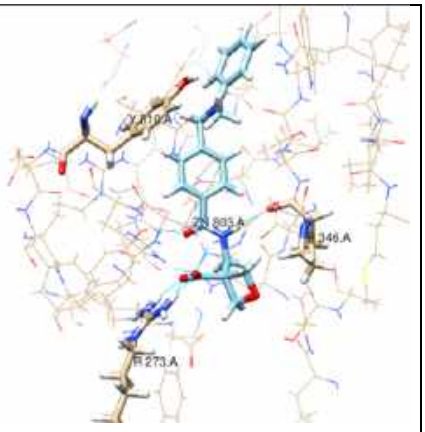
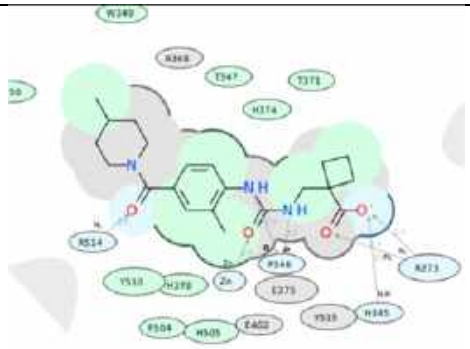
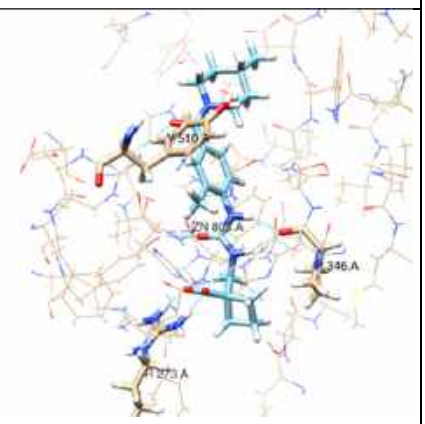
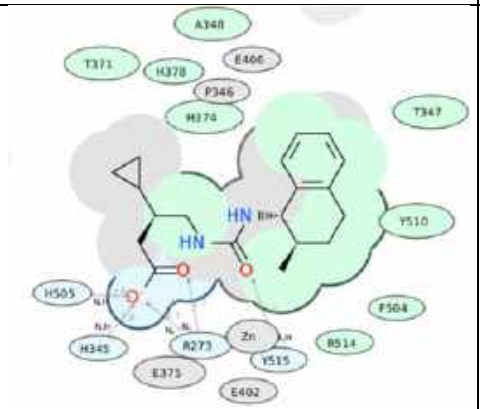
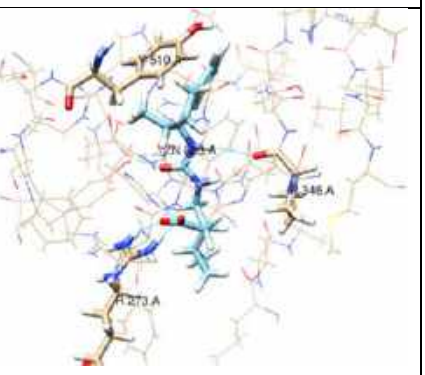
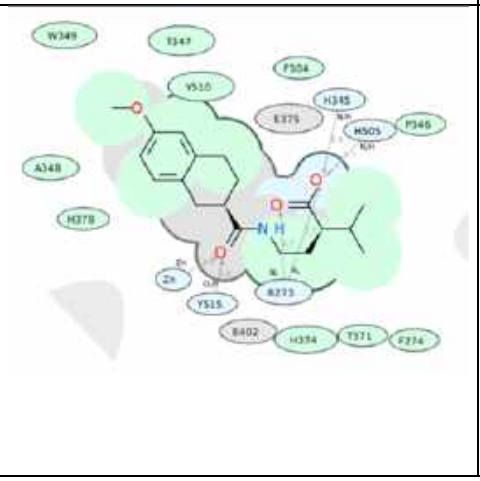
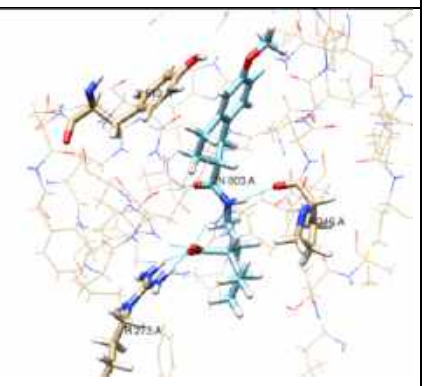
12	Z4549268235	-34,46		
13	Z4361984504	-33.6		
14	Z3681806363	-35,03		
15	Z3681799936	-22,59		

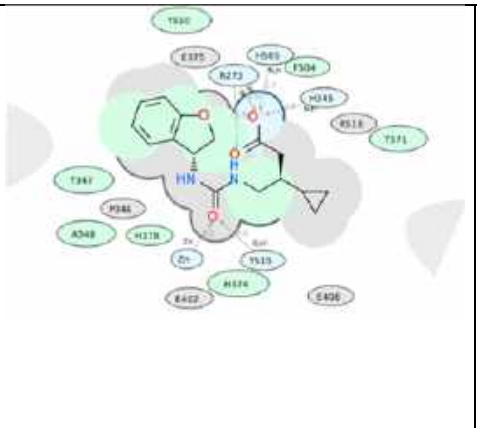
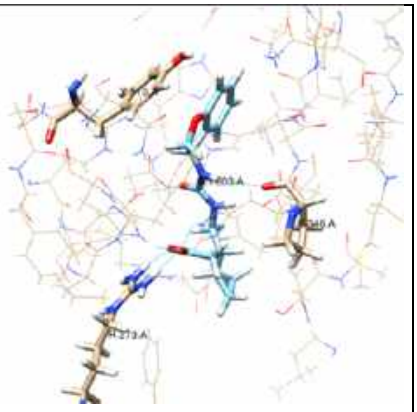
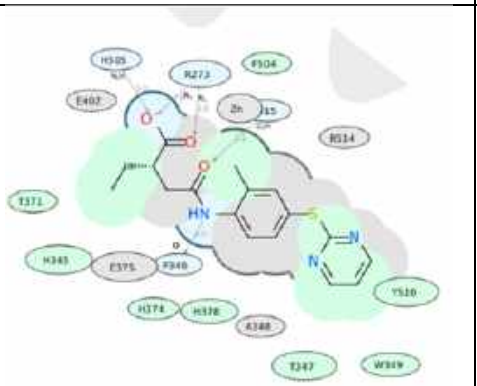
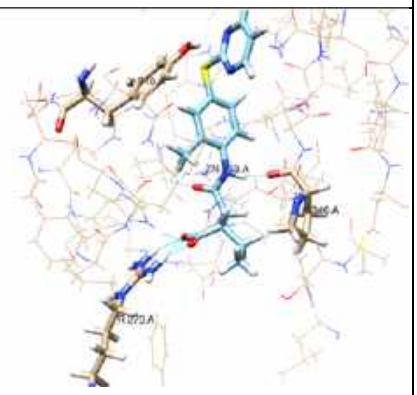
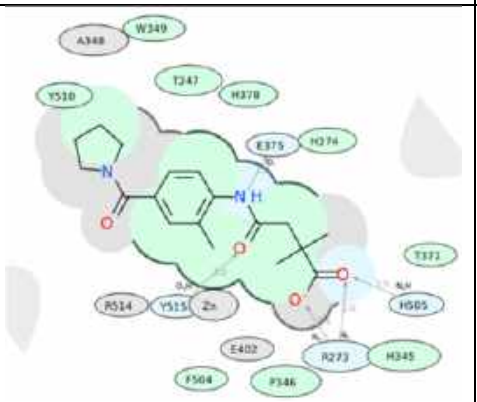
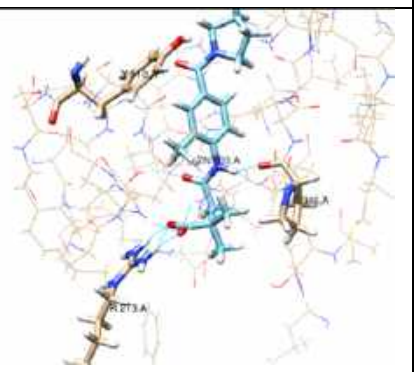
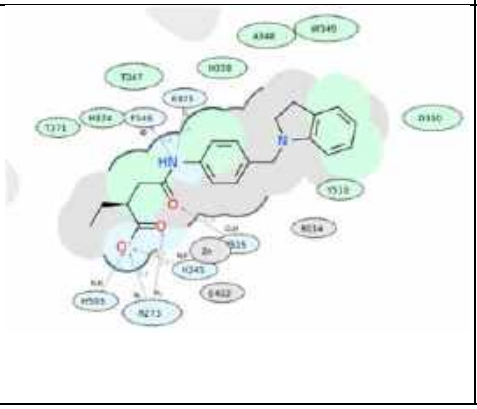
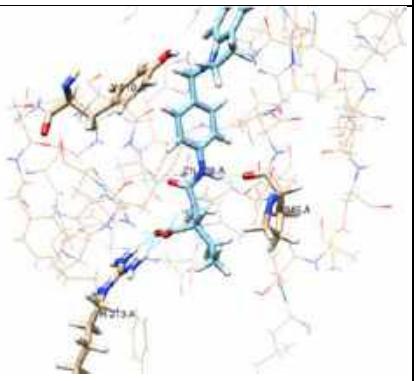
16	Z4602008618	-29		
17	Z3466179106	-26,43		
18	Z4221819990	-40,66		
19	Z4561748167	-32,92		
20	Z4119544425	-34,1		

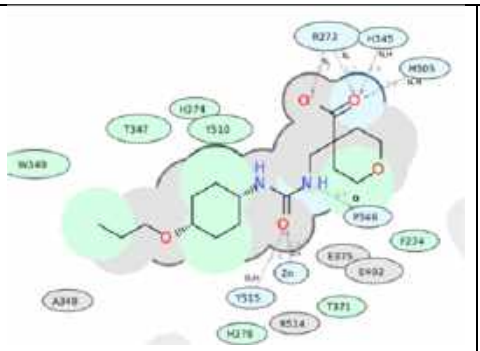
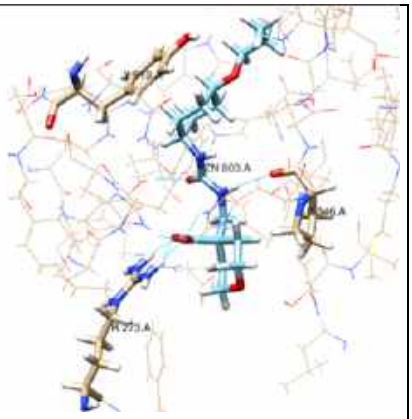
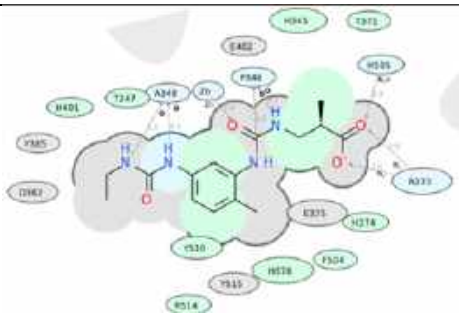
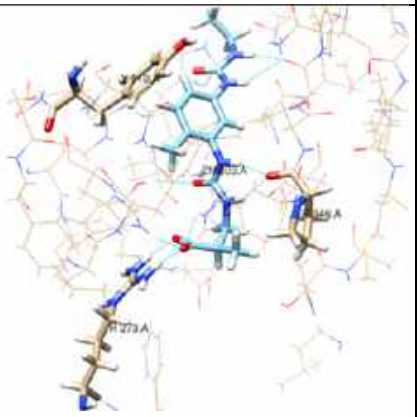
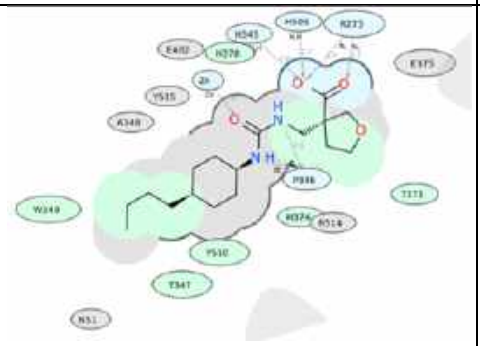
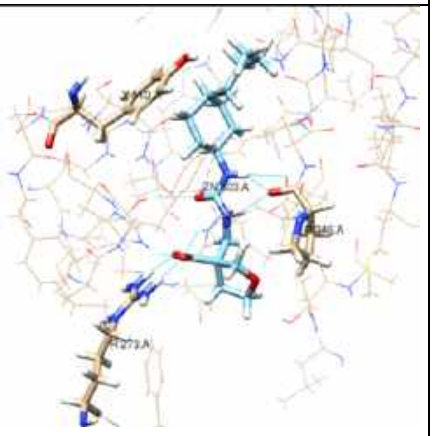
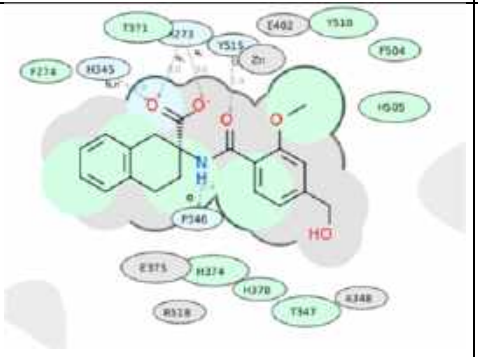
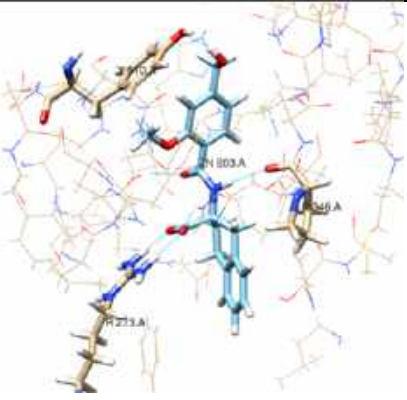
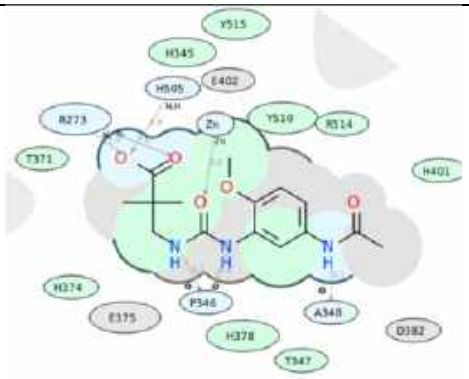
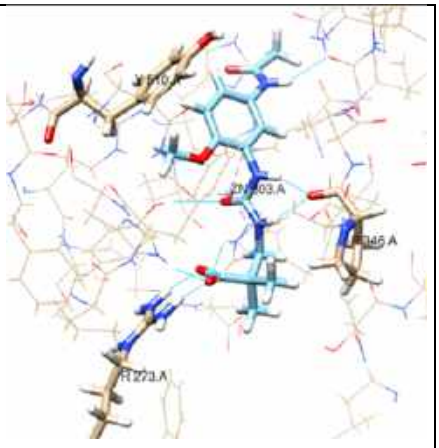
Додаток 3. 20 структур-лідерів з бази Enamine SSC, з продемонстрованою візуалізацію розташування у кишені для ACE2.

#	ID	Score	2d diagram of interaction	3d visualization of interaction
1	Z1991725061	-37.32		
2	Z2396153450	-37.86		
3	Z4422831009	-34.2		

4	Z2899432355	-37.81		
5	Z2793145343	-29.9		
6	Z2396152156	-34.8		
7	Z3510691032	-28.99		

8	PV-002719568598	-30.33		
9	Z2610472638	-36.86		
10	Z2596054371	-28.65		
11	PV-002769423394	-39.26		

12	Z2596042648	-29.59		
13	Z4422771675	-34.34		
14	Z1213003608	-32.94		
15	PV-002989187384	-34.78		

16	Z3654114554	-32.68		
17	1Z2493059739	-38.68		
18	Z3510749222	-28.1		
19	Z3390587460	-33.61		

20	Z2362216591	-40.83