



Candidate inhibitors against the main protease of SARS-CoV-2

ARTICLE INFO

Article Type Original Research

Authors

Howra Bahrulolum¹,
Saghi Nooraei¹,
Saied Bokaie²,
Kiavash Houshmandi³,
Mehdi Raei⁴,
Maliheh Entezari^{5,*}

1. Ph.D. Candidate, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

2. Full Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Division of Epidemiology & Zoonoses, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3. Ph.D. Candidate, Department of Food Hygiene and Quality Control, Division of Epidemiology & Zoonoses, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

4. Assistant Professor, Health Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5. Associate Professor, Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Department of Genetics, Faculty of Advanced science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Phone: +98 (21) 22614618, Email: mentezari@iautmu.ac.ir

Article History

Received: September 21, 2020

Accepted: February 8, 2021

ePublished: March 18, 2021

ABSTRACT

Covid-19 is a highly infectious viral disease caused by SARS-CoV-2, which has spread worldwide since its emersion in December 2019, causing an unprecedented pandemic. Currently, it has no targeted vaccines or treatments, and effective treatment options are very limited. It is important to identify drugs that effectively inhibit a specific target of the SARS coronavirus. This is the third deadly outbreak of coronaviruses in human society which has put pressure on the global health care system and affected the global economy a well. However, the treatment options of Covid-19 are still very limited. The development of drugs that target and inhibit essential proteins in the viral life cycle is a practical approach to overcoming this hard situation. The main protease, a cysteine protease, is an attractive target for antiviral drugs against SARS-CoV-2 and other coronavirus infections due to its essential role in viral replication and transcription. To quickly detect effective compounds for clinical use, programs such as molecular docking drug design and virtual screening of pre-designed drugs to identify new compounds and drugs that target the main protease of the COVID-19 are performed. Combining these structural studies, virtual screening, and experimental screen, several therapeutic candidates such as repurposed drugs and *ab initio* designed drugs have been proposed. In this review study, suggestions for inhibitors and possible potentially effective drugs against the main protease of SARS-CoV-2 were discussed. This study paves the way for advanced experimental research to evaluate the pharmacological potential of these compounds for the treatment of Covid-19.

Keywords: Protease Inhibitors, SARS Virus, Severe Acute Respiratory Syndrome

مهارکننده‌های کاندید علیه پروتئاز اصلی

کرونا ویروس سارس-۲

حورا بحر العلوم

دانشجوی دکتری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

ساقی نورایی

دانشجوی دکتری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

سعید بکابی

استاد تمام، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، بخش اپیدمیولوژی و بیماری‌های مشترک، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

کیاوش هوشمندی

دانشجوی دکتری، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، بخش اپیدمیولوژی و بیماری‌های مشترک، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مهدی راعی

استادیار، مرکز تحقیقات بهداشت، پژوهشگاه سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

ملیحه انتظاری*

دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

کووید-۱۹، یک بیماری ویروسی بسیار عفونی ناشی از کرونا ویروس سارس-۲ است که از زمان ظهور در دسامبر ۲۰۱۹، در سراسر جهان گسترش یافته است و باعث یک بیماری همه گیر بی سابقه شده است. این همه گیری سومین رخداد کشنده کرونا ویروس‌ها در جامعه بشری است که سیستم مراقبت‌های بهداشتی جهانی را تحت فشار قرار داده و بر اقتصاد جهانی را تأثیر گذارده است. با این حال، گزینه‌های درمانی کووید-۱۹ هنوز بسیار محدود است. تولید داروهایی که پروتئین‌های حیاتی را در

چرخه زندگی ویروسی هدف قرار می‌دهند و آنها را مهار می‌کنند، رویکردی عملی برای غلبه بر این معضل است. پروتئاز اصلی که یک سیستمین پروتئاز است، به دلیل نقش اساسی که در تکثیر و رونویسی ویروسی دارد یک هدف جذاب برای داروهای ضد ویروسی در برابر کرونا ویروس سارس-۲ و سایر عفونت‌های کرونا ویروس محسوب می‌شود. به منظور کشف سریع ترکیبات مؤثر جهت استفاده بالینی، برنامه‌هایی نظیر طراحی دارو به روش داکینگ مولکولی و غربالگری مجازی داروهای از پیش طراحی شده برای شناسایی ترکیبات جدید و داروهایی که پروتئاز اصلی کرونا ویروس سارس-۲ را هدف قرار می‌دهند صورت می‌گیرد. با ترکیب این مطالعات ساختاری، غربالگری مجازی و مطالعات آزمایشگاهی، کاندیداهای درمانی متعددی از جمله داروهای مورد استفاده پیشین و همچنین داروهای طراحی شده ab initio برای آزمایش‌های اولیه پیشنهاد شده‌اند. در این مطالعه مروری پیشنهادهای مربوط به مهارکننده‌ها و داروهای احتمالی بالقوه مؤثر علیه پروتئاز اصلی کرونا ویروس سارس-۲ بررسی شده است. این مطالعه مسیر انجام تحقیقات تجربی پیشرفته برای ارزیابی پتانسیل دارویی این ترکیبات برای درمان کووید-۱۹ را هموار می‌کند.

کلیدواژه‌ها: مهارکننده‌های پروتئین، ویروس سارس، سندروم شدید حاد تنفسی

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۳۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۰

*نویسنده مسئول: mentezari@iautmu.ac.ir

مقدمه

کرونا ویروس سارس ۲ (SARS-CoV-2) عامل ایجادکننده بیماری همه گیر COVID-19 (بیماری کرونا ویروس ۲۰۱۹) است^[۱]. این بیماری برای نخستین بار در شهر ووهان استان هوئی کشور چین در دسامبر سال ۲۰۱۹ گزارش شد^[۲]. به رغم تلاش‌های عمده برای مهار شیوع اولیه این بیماری از آن زمان تاکنون تعداد موارد تأیید شده در سرتاسر جهان با سرعتی بالا رو به رشد است^[۳]. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) تا تاریخ ۲۲ جولای

۲۰۲۰، ۱۴۷۳۱۵۶۳۳ مورد COVID-19 تأیید شده به ثبت رسیده است، که از این تعداد به ۶۱۱۲۸۴ مورد مرگ و میر در سراسر جهان منجر شده است^[۴]. پس از اپیدمی های SARS (سندرم تنفسی حاد) در سال ۲۰۰۲-۲۰۰۳ و MERS (سندرم تنفسی خاورمیانه) در سال ۲۰۱۲، این سومین شیوع مشهور ویروس کرونا در قرن بیست و یکم است. به طور خاص، شرایط بالینی مرتبط با SARS-CoV-2 عموماً با عنوان بیماری COVID-19 -ممکن است از بیماری بدون عارضه (خفیف) تا پنومونی متوسط یا شدید تا سندرم دیسترس تنفسی حاد (ARDS) شامل سپسیس، شوک سپتیک، و نارسایی های چندگانه در ارگان های مختلف باشد^[۵، ۳]. اولین توالی ژنومی SARS-CoV-2 یک روز بعد از تأیید آن توسط ژانگ و دانشمندان دیگر در دانشگاه فودان شانگهای به صورت آنالین منتشر شد. متعاقباً در تاریخ ۱۱ ژانویه، پنج توالی ژنومی دیگر از این ویروس توسط انستیتوهای مختلف در سرتاسر چین (CDC چین، انستیتو ویروس شناسی ووهان و آکادمی علوم پزشکی چین) روی دیتابیس GSAID قرار داده شد و به محققان در سرتاسر دنیا اجازه داد تا تحقیقات روی این کروناویروس جدید را آغاز کنند^[۶]. SARS-CoV-2 متعلق به خانواده کروناویریده و جنس بتاکروناویروس است^[۷]. کروناویروس ها، ویروس های پوشش دار دارای RNA تک رشته ای مثبت هستند که دارای بزرگترین اندازه ژنوم در بین ویروس های RNA دار با طول تقریباً بین ۲۶ تا ۳۲ کیلو باز و حاوی حداقل ۶ (۱۴ مورد در مورد SARS-CoV-2) قاب خواندن باز (ORF) هستند. قاب خواندن اصلی ORF 1ab (ژن رلیکاز) کدکننده دو پلی پروتئین هم پوشان (pp1a, pp1ab) است که توسط پروتئاز اصلی (Mpro) (که به آن CLpro^۳ نیز گفته می شود) و پروتئاز شبه پاپااین (PLpro) به ۱۶ پروتئین غیر ساختاری (ns1-16) شکسته می شود. باقیمانده ژنوم کدکننده پروتئین های جانبی و ساختاری مانند گلیکوپروتئین سنبه (S)، پروتئین پوششی (E)، پروتئین غشایی (M) و فسفو پروتئین نوکلئوکسپید (N) است^[۸-۱۱].

در حال حاضر هیچ واکسن و عامل درمانی هدفمندی برای درمان COVID-19 وجود ندارد و گزینه های درمانی مؤثر نیز بسیار محدود است^[۱۲]. بنابراین، نیاز فوری به تقویت تحقیقات برای توسعه و تشخیص داروهای مؤثر و مناسب در برابر COVID-19

بسیار ضروری است. با توجه به مطالعات کشف دارو در برابر همه گیری های اخیر ناشی از کروناویروس ها شامل SARS-CoV و MERS-CoV چندین پروتئین ویروسی به عنوان اهداف دارویی ضد ویروسی SARS-CoV-2 در اولویت قرار گرفتند از جمله گلیکوپروتئین سنبه، RNA پلیمراز وابسته به (RdRp) (nsp12)، RNA Mpro (nsp 5) و PLpro (بخشی از nsp3)^[۱۳-۱۶]. پروتئین های ویروسی اهداف دارویی معتبری هستند که به ایجاد داروهای مختلف مورد تأیید منجر شده اند، برای مثال، در برابر عفونت های مزمن با ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) یا ویروس هپاتیت C (HCV)، به ترتیب از آسپارتیل و سرین پروتئازها استفاده می شود^[۱۶].

ساختار کریستالی Mpro SARS-CoV-2 در فوریه ۲۰۲۰ را ژانگ و همکاران منتشر کردند (PDB ID: 6lu7). مدل های همولوژی اولیه Mpro SARS-CoV-2 حاکی از رابطه ساختاری نزدیک با سایر Mpro کروناویروس ها شامل SARS و MERS می شود. توالی اسیدهای آمینه SARS-CoV-2 Mpro همولوژی ۹۶٪ با SARS-CoV Mpro را نشان می دهد^[۱۷].

SARS-CoV-2 Mpro یک سیستمین پروتئاز سه دمینی (دمین های I تا III) است که به صورت پروتئولیتیکی پلی پروتئین های همپوشان pp1a و pp1ab را به پروتئین های عملکردی برش می دهد. Mpro فعال یک همودایمر دارد که حاوی دو پروتومر است. SRAS-CoV-2 Mpro دارای یک پیوند غیر متعارف Cys-His است که در شکاف بین دمین های I و II قرار دارد. Mpro، پلی پروتئین ها را در توالی (Leu-Gln↓(Ser, Ala, Gly) برش می دهد (↓ محل برش را نشان می دهد)، که به نظر می رسد این سایت برش یک الگوی حفاظت شده در بین کرونا ویروس ها است^[۱۸، ۱۹، ۲۰]. آنزیم های ضروری دخیل در همانندسازی مانند RdRp و NTPase/ هلیکاز (nsp13) بدون این مرحله برش پروتئولیتیکی نمی توانند به طور کامل عمل کنند که این امر نشان دهنده نقش کلیدی Mpro به عنوان آنزیمی اصلی در طی چرخه تکثیر ویروس است^[۱۶]. توانایی هیدرولیز پیوند پپتیدی پس از باقیمانده Gln برای پروتئین های اصلی سایر کروناویروس ها نیز مشاهده شده است، اما برای آنزیم های انسانی ناشناخته است.

بازدارنده در بین آنها در برابر کروناویروس‌ها شناخته شده بود^[۲۱]. اخیراً، از طریق اصلاحات در ۱۱۲، ژانگ و همکاران یک مهارکننده جدید به نام ۱۳b با اثر مهاري بهبودیافته پیشنهاد داده‌اند. در این مهارکننده، پیوند آمید P3-P2 در یک حلقه پیریدین گنجانیده شد تا از تجزیه آن توسط پروتئینازهای سلولی جلوگیری و نیمه عمر آن در پلاسما افزایش پیدا کند. علاوه بر این، بخش سیکلوهکسیل P2 با سیکلوپروپیل کوچک‌تر جایگزین شد، که فعالیت ضد ویروسی خاص آن را در برابر ویروس‌های بتاکرونا تقویت می‌کند. این ترکیب ۱۳b تازه تولید شده، SARS-CoV-2 Mpro را با IC50 برابر با ۶۷/۰ میکرومولار و تکثیر RNA ویروسی را با EC50 برابر با ۵~۴ میکرومولار مهار می‌کند (جدول ۱). همچنین این مهارکننده حاوی پیریدین، خصوصیات فارماکوکینتیک مطلوبی را در موش‌ها نشان داد و ترکیب مورد نظر در غلظت‌های مناسب در بافت ریه و لواز برونکوالوئولار به ترتیب در طی ۴ ساعت و ۲۴ ساعت پس از تزریق زیر جلدی مشاهده شد که نشان‌دهنده تمایل ترکیب موردنظر به بافت ریه بود. علاوه بر تجویز زیر جلدی، استنشاق ۱۳b مهار شده توسط موش‌ها به غلظت بالا و طولانی مدت (۲۴ ساعت) ترکیب موردنظر در بافت ریه، بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی نامطلوب منجر شد. همه این خصوصیات نشان‌دهنده نقش مؤثر و بالقوه آلکوامید حاوی پیریدین ۱۳b به‌عنوان مهارکننده SARS-CoV-2 Mpro برای درمان Covid-19 است^[۲۰، ۲۱].

مهارکننده N3: N3 یک مهارکننده پپتیدوممیتیک مبتنی بر پذیرنده مایکل است، که در اصل برای درمان بیماری‌های عفونی ناشی از سایر CoV ها از جمله SARS-CoV و MERS-CoV طراحی شده است. همچنین فعالیت ضد ویروسی قدرتمندی را در برابر ویروس برونشیت عفونی در یک مدل حیوانی نشان داده بود. این ماده از یک گروه وینیل برای مهار روند کاتالیزوری از طریق پیوند کووالانسی به سیستمین کاتالیزوری دوتایی استفاده می‌کند. علاوه بر این، به ترتیب یک حلقه لاکتام، یک گروه ایزوبوتیل آلفاتیک و یک گروه متیل در زنجیره جانبی P1، P2 و P4 وجود دارد که به خوبی با زیرمجموعه‌های S1، S2 و S4 متناسب هستند^[۲۲، ۲۱].

در مطالعه‌ای که Jin Z و همکاران انجام دادند، مهارکننده N3 (مهار کننده پذیرنده مایکل) به روش داکینگ مولکولی شناسایی و

اهمیت عملکردی Mpro در چرخه زندگی ویروسی، همراه با نبود همولوگ‌های نزدیک در انسان، Mpro را به‌عنوان یک هدف دارویی ایدئال برای طراحی داروهای ضد ویروس SARS-CoV-2 با کمترین اثرات جانبی تبدیل کرده است^[۲۰]. بنابراین، معرفی فوری داروهای بالقوه علیه SARS-CoV-2 Mpro می‌تواند امری اساسی و نجات‌بخش باشد. استفاده از تکنیک‌های طراحی دارویی به کمک رایانه برای شناسایی سریع کاندیداهای درمانی امیدوارکننده برای استفاده مجدد داروهای از پیش ساخته شده برای دیگر بیماری‌ها، به خصوص پس از مشخص شدن ساختارهای دقیق سه‌بعدی پروتئین‌های کلیدی ویروسی بسیار کارآمد است. از این‌رو، در این مقاله، مطالعاتی که داروهای مهارکننده Mpro SARS-CoV-2 بالقوه مؤثر را برای درمان COVID-19 پیشنهاد کرده‌اند بررسی شده است. بیشتر این پیشنهادها مبتنی بر مطالعات آزمایشگاهی، غربالگری مجازی و سوابق تأثیر آنها بر بیماری‌های دیگر ناشی از کروناویروس‌ها شامل SARS-CoV و MERS-CoV است. مقالات بدون در نظر گرفتن زمان و با استفاده از موتورهای جستجوی PubMed و Google Scholar استخراج شدند و اصطلاحات "COVID-19"، "SARS-CoV-2"، "Main protease" و "Mpro inhibitor" در عناوین، چکیده‌ها و کلمات کلیدی جستجو شد. پس از آن، مطالعات بالینی و پیشنهاد‌های مربوط به مهارکننده‌ها و داروهای احتمالی علیه Mpro SARS-CoV-2 بررسی شد.

مهارکننده‌های SARS-CoV-2 Mpro

مهارکننده آلفاکتون آمید (α -ketoamides): آلفاکتون آمیدهای پپتیدومیمیک، طیفی وسیع از مهارکننده‌های Mpro ویروس‌های بتا و آلفاکروناویروس‌ها و همچنین C ۳ پروتئاز اینتروویروس‌ها هستند، که قبلاً طبق یک روش مبتنی بر ساختار طراحی شده‌اند. یک گروه α -keto برای مهار کووالانسی حمله هسته‌ای باقی‌مانده سیستمین کاتالیزوری به سوپسترا استفاده شد. علاوه بر این، این مهارکننده‌ها به ترتیب در P1 و P2 به یک گروه لاکتام γ و گروه هیدروفوبیک مجهز شدند، تا زیر واحد S1 و S2 را اشغال کنند و اثر مهاري را افزایش دهند. در مطالعات قبلی، ۱۱۲ به‌عنوان بهترین

ابسلن (Ebselen): ابلسن یک ترکیب ارگانوسلنیوم است که دارای خواص ضد التهابی، ضد اکسیدانی و محافظت از سلول است. این ترکیب قبلاً برای درمان بیماری‌های متعدد از جمله اختلالات قطنی و کاهش شنوایی مورد بررسی قرار گرفته است. سمیت سلولی ابلسن بسیار کم است (دوز متوسط کشنده در موش صحرایی بیش از 4600 mg kg^{-1} در هنگام مصرف خوراکی است) و ایمنی آن در انسان در تعدادی از آزمایش‌های بالینی ارزیابی شده است [۲۱، ۲۲]. در تلاش برای کشف بازدارنده‌های قوی‌تر، Jin Z و همکاران چندین داروی مورد استفاده دیگر را برای هدف قرار دادن Mpro بر اساس مکانیسم بازدارندگی N3 گزارش دادند. در این مطالعه از طریق ترکیبی از غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار و غربالگری پرتوان، بیش از ۱۰,۰۰۰ ترکیب از جمله داروهای مورد تأیید FDA، نامزدهای دارویی در کار آزمایشی‌های بالینی و سایر ترکیبات دارویی فعال به‌عنوان مهارکننده Mpro سنجش شدند. شش مورد از این ترکیبات باعث مهار Mpro با مقادیر IC_{50} از ۰/۶۷ تا ۲۱/۴ میکرومولار می‌شدند. در میان آنها، دی سولفیرام و کارمفور داروهای مورد تأیید FDA بودند؛ درحالی‌که داروهای ابلسن، شیکونین (Shikonin)، تیدگلوسیپ (Tideglusib) و PX-12 در حال حاضر در کار آزمایش‌های بالینی یا مطالعات بالینی هستند. ابلسن به ترتیب مهار شدید فعالیت Mpro را در برابر SARS-CoV-2 به ترتیب با مقدار IC_{50} برابر با ۰/۶۷ میکرومولار و EC_{50} برابر با ۴/۶۷ میکروکولار نشان داد (جدول ۲). ابلسن همچنین فعالیت ضد ویروسی امیدوارکننده‌ای در سنجش‌های مبتنی بر سلول نشان داد. [۲۲] ابلسن در حال حاضر تحت آزمایش‌های بالینی فاز II برای درمان COVID-19 قرار دارد (NCT04484025). این داده‌ها به‌شدت پتانسیل بالینی ابلسن را برای درمان COVID-19 نشان می‌دهد.

دی سولفیرام (Disulfiram): دی سولفیرام داروی مورد تأیید FDA برای درمان اعتیاد به الکل است. همچنین طی چند سال گذشته به‌عنوان داروی مورد استفاده برای درمان سرطان بررسی شده است. در مطالعه Jin و همکاران مشخص شد این دارو مهار شدید فعالیت Mpro در برابر SARS-CoV-2 با IC_{50} برابر ۹/۳۵ میکرومولار را نشان می‌دهد [۲۱، ۲۲]. همچنین در مطالعه مبتنی بر *In silico* نشان داده شد که Cys145 کاتالیزوری SARS-

متعاقباً ساختار کریستالی Mpro و ویروس SARS-CoV-2 در کمپلکس با این ترکیب تعیین شد. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی نشان داد که N3 می‌تواند درون پاکت اتصال‌دهنده سوبسترا قرار گیرد. برای ارزیابی اثر N3 بر Mpro و ویروس SARS-CoV-2، تجزیه و تحلیل سینتیک انجام شد. منحنی پیشرفت نشان داد که این ترکیب یک مهارکننده برگشت‌ناپذیر قوی وابسته به زمان است. علاوه بر این، شکل این منحنی از مکانیسم غیرفعال برگشت‌ناپذیر دو مرحله‌ای پشتیبانی می‌کرد. این مهارکننده ابتدا به Mpro و ویروس SARS-CoV-2 متصل می‌شود (EI)، با ثابت جداسازی K_i ؛ سپس، یک پیوند کووالانسی پایدار بین N3 و Mpro تشکیل می‌شود (E-I). ارزیابی این مهار وابسته به زمان، هم به ثابت‌کننده تعادل (K_i) تعیین‌شده به عنوان k_2/k_1 و هم به میزان ثابت غیرفعال سازی برای ایجاد پیوند کووالانسی K_3 بستگی دارد. با این حال، N3 یک مهار بسیار قوی SARS-CoV-2 Mpro را نشان می‌دهد، به طوری که اندازه گیری K_i و k_3 امکان پذیر نیست. هنگامی که غیرفعال سازی بسیار سریع اتفاق می‌افتد، از k_{obs} [I] برای ارزیابی مهار به عنوان ثابت سرعت مرتبه دوم استفاده می‌شود (k_3/K_i). در این مطالعه مقدار N3 $k_{obs}/[I]$ برای SARS-CoV-2 Mpro برابر $11300 \pm 880 \text{ M}^{-1} \text{S}^{-1}$ تعیین شد که نشان دهنده این می‌باشد که این پذیرنده مایکل به طور چشمگیری مهار شده است (جدول ۱). برای اثبات بیشتر نتایج مهار آنزیمی در شرایط *in vitro*، امکان اینکه آیا این ترکیبات می‌توانند از تکثیر ویروسی در روش‌های مبتنی بر سلول جلوگیری کنند نیز ارزیابی شد و نتایج حاصل نشان داد که N3 اثر ضد ویروسی قوی را با غلظت ۱۰ میکرومولار در سلول‌های Vero آلوده به SARS-CoV-2 نشان داده است. همچنین یک روش سنجش کاهش پلاک برای ارزیابی بیشتر اثر N3 در محافظت از سلول‌ها بررسی شد. N3 مهار SARS-CoV-2 را با مقدار EC_{50} برابر ۱۶،۷۷ میکرومولار نشان داد (جدول ۱). علاوه بر این منحنی دوز پاسخ نشان‌دهنده این بود که این ترکیب ممکن است قادر باشد برای دستیابی به اهداف خود به غشای سلولی به نفوذ کند [۲۲]. نتایج حاصل از این مطالعه اثربخشی بالای این مهارکننده را علیه SARS-CoV-2 Mpro نشان می‌دهد و بنابراین می‌تواند یکی از گزینه‌های امیدوارکننده درمانی علیه COVID-19 در نظر گرفته شود.

طراحی منطقی آنالوگ‌های کارموفور با افزایش خاصیت مهارکنندگی برای درمان COVID-19 را فراهم می‌کند^[۲۴]. این یافته‌ها نشان می‌دهد کارمافور نوعی ترکیب جدید و امیدوارکننده برای تولید داروهای ضد ویروسی است که COVID-19 را هدف قرار دهد و به این دلیل که ساختار Mpro در بین تمام کروناویروس‌ها بسیار حفاظت‌شده است، کارموفور و آنالوگ‌های آن ممکن است در برابر طیفی گسترده از این ویروس‌ها مؤثر واقع شود.

نلفیناویر (Nelfinavir): نلفیناویر یک مهارکننده پروتئاز HIV-1 بسیار ایمن و مورد استفاده گسترده، با فعالیت *in vivo* در بیماران آلوده به HIV قوی است. نلفیناویر به طور کلی در ترکیب با سایر داروهای ضد رترو ویروسی به عنوان بخشی از رژیم ضد رترو ویروسی بسیار فعال (HAART) استفاده می‌شود. بیماران مبتلا به عفونت HIV نلفیناویر را به خوبی تحمل می‌کنند. با توجه به این خصوصیات، نلفیناویر یکی از متداول‌ترین داروهای مهارکننده پروتئاز خط اول در درمان افراد آلوده به HIV است. مطالعات پیشین به وضوح نشان داده بود که نلفیناویر می‌تواند تکثیر SARS-CoV را در سلول‌های VeroE6 مهار کند^[۲۶، ۲۵]. از آنجاکه SARS-CoV-2 نسبتاً مشابه SARS-CoV5 است، انتظار می‌رود که این دارو برای درمان بیماران COVID-19 مؤثر باشد. در مطالعه Yamamoto و همکاران گزارش شد که نلفیناویر، به شدت مانع از تکثیر SARS-CoV-2 می‌شود. مقادیر غلظت مؤثر مهارتی ۵۰٪ و ۹۰٪ (EC50 و EC90) نلفیناویر به ترتیب ۱/۱۳ میکرومولار و ۱/۷۶ میکرومولار بود که کمترین میزان از نه مهارکننده پروتئاز HIV-1 مورد بررسی در این مطالعه از جمله لوپیناویر بود. غلظت سرمی و اوج غلظت نلفیناویر سه تا شش برابر بیشتر از EC50 این دارو بود. این نتایج نشان می‌دهد که نلفیناویر یک داروی بالقوه کاندید برای درمان COVID-19 است و باید در بیماران مبتلا به COVID-19 ارزیابی شود^[۲۷].

لوپیناویر و ریتوناویر (Lopinavir / ritonavir): لوپیناویر و ریتوناویر اولین داروهایی هستند که در آزمایش‌های بالینی برای درمان COVID-19 با هدف قرار دادن Mpro استفاده شده‌اند^[۲۸]. لوپیناویر/ریتوناویر یک داروی ضد ویروسی ترکیبی با خاصیت

CoV-2 Mpro می‌تواند توسط دی سولفیرام و متابولیت‌های مشتقات تیول آن مسدود و غیرفعال شود^[۲۳]. دی سولفیرام در حال حاضر در آزمایشات بالینی فاز II برای درمان COVID-19 در حال ارزیابی است (NCT04485130). در مجموع، این داده‌ها به شدت از توانایی بالینی این دارو برای درمان COVID-19 پشتیبانی می‌کند.

کارموفور (Carmofur): کارموفور (Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil-1) یکی از مشتقات ۵-فلوروئوراسیل (FU-5) و یک عامل ضد نوپلاستیک مورد تایید است. از کارموفور برای درمان سرطان روده بزرگ از دهه ۱۹۸۰ استفاده می‌شود و دارای مزایای بالینی برای سرطان‌های پستان، معده و مثانه است. همچنین به عنوان یک عامل جدید درمانی برای آسیب حاد ریه (ALI) گزارش شده است. اعتقاد بر این است که هدف کارموفور تیمیدیلالات سنتاز است، اما همچنین نشان داده شده است که از طریق اصلاح کووالانسی سیستمین کاتالیزوری آن، اسید سرامیداز انسانی (AC) را مهار می‌کند^[۲۴، ۲۱]. در مطالعه Jin و همکاران ساختار کریستالی اشعه ایکس Mpro در کمپلکس با کارموفور نشان داد که گروه واکنش‌پذیر کربونیل کارموفور به صورت کووالانسی به Cys145 کاتالیزوری باند می‌شود؛ درحالی‌که دم اسید چرب آن زیر واحد آب آگریز S2 را اشغال می‌کند. در مطالعات پیشین کارمافور اثر مهارتی فعالیت Mpro در برابر SARS-CoV-2 را با IC50 ۱/۸۲ میکرومولار نشان داده بود (جدول ۱). در این مطالعه اثر مهارتی کارموفور در برابر عفونت SARS-CoV-2 روی سلول‌های Vero E6 تعیین شد. با اندازه‌گیری RNA ویروسی در سوپرناتانت سلولی، مقدار EC50 برای کارموفور به میزان ۲۴/۳۰ میکرومولار تعیین شد (جدول ۱). برای تأیید این نتیجه، سلول‌های آلوده فیکس شد و با استفاده از ضد سرم در برابر پروتئین نوکلئوکسپید ویروسی (NP) رنگ‌آمیزی شد. کاهش سطح NP پس از تیمار با کارموفور مشاهده شد. همچنین سنجش سمیت سلولی برای کارموفور در سلول‌های Vero E6 انجام و مقدار CC50 با مقدار ۱۳۳/۴ میکرومولار تعیین شد. بنابراین طبق نتایج این مطالعه، کارموفور از شاخص انتخاب مطلوب (SI) ۵/۳۶ برخوردار است، اما برای تولید یک داروی مؤثر به بهینه‌سازی بیشتری نیاز دارد. این مطالعه همچنین مبنایی برای

جدول ۱. فعالیت ضد ویروسی مهار کننده‌های مؤثر علیه Mpro SARS-CoV-2

ترکیب	فعالیت مهار (μM)	فعالیت ضد ویروسی (μM)	وضعیت	شماره کار آزمایشی بالینی
۱۳B	$\text{IC}_{50} = 0.77$	$0.5 \sim 4$	طراحی به روش <i>ab initio</i>	-
N3	$M^{-1} S^{-1} = 11300$ kobs/[I]	1677	طراحی به روش <i>ab initio</i>	-
ابسلن	0.77 IC_{50}	4.67 EC_{50}	فاز ۲ کارآزمایی بالینی	NCT04484025
دی سولفیرام	9.35 IC_{50}	-	فاز ۲ کار آزمایی بالینی	NCT04485130
کارموفور	1.82 IC_{50}	24.87 EC_{50}	داروی مورد تایید FDA	-

جدول ۱. غربالگری مجازی با هدف قرار دادن Mpro

داکینگ مجازی لوپیناویر/ریتوناویر برای SARS-CoV-2 Mpro توانایی بالای اتصال آن را مشابه گزارش پیشین درباره Mpro SARS-CoV نشان داد. اسیدهای آمینه Thr26، Thr2 و Asn119 به عنوان قسمت‌های کلیدی برای این داروها هستند و به ترتیب ۲ پیوند هیدروژنی با لوپیناویر و ۲ پیوند هیدروژنی با ریتوناویر تشکیل می‌دهند. با استناد به این نتایج در مطالعه Liu X و همکاران ۱۰ داروی بالینی کاندید شناسایی شد. این داروها قادرند پیوندهای هیدروژن با یک یا دو انتهای اسید آمینه در بین Asn28، Thr24 و Asn119 تشکیل دهند و از نظر تئوری، قادرند به در عملکرد Mpro اتصال و تداخل ایجاد کنند. در مقایسه با لوپیناویر/ریتوناویر، بسیاری از این داروهای پیش‌بینی شده می‌توانند باندهای هیدروژن بیشتری را با Mpro تشکیل دهند. بخش‌های اتصال-دهنده این داروها روی Mpro بین Mpro SARS-CoV-2 و SARS-CoV Mpro حفاظت شده‌اند که این نشان‌دهنده پتانسیل این داروها به عنوان مهارکننده برای استفاده علیه سایر کروناویروس‌هایی با جایگاه اتصال Mpro مشابه است. داروهای

مهارکنندگی پروتئاز است که معمولاً در درمان بیماری ایدز استفاده می‌شود^[۲۹]. آنها مهارکننده آسپارتیل پروتئاز HIV هستند که توسط ژن HIV pol رمزگذاری می‌شود و پلی پپتیدهای پیش‌ساز را در HIV برش می‌دهند^[۳۰]. ترکیبی از لوپیناویر و ریتوناویر معمولاً به-عنوان یک رژیم درمانی برای بیماران مبتلا به عفونت HIV استفاده می‌شود. شواهد جمع‌آوری شده نشان داده است که ترکیبی از لوپیناویر/ریتوناویر می‌تواند یک روش درمانی برای عفونت‌های ناشی از کرونا ویروس‌ها در نظر گرفته شود. در مطالعات پیشین نشان داده شده بود که لوپیناویر باعث مهار SARS-CoV Mpro در شرایط *in vitro* می‌شود، و مطالعات بیشتر نشان‌دهنده ظرفیت ضد ویروسی امیدوارکننده لوپیناویر / ریتوناویر در برابر SARS-CoV و MERS-CoV بود^[۳۱]. از آنجا که Mpro بین SARS-CoV-2 و SARS-CoV بسیار محافظت شده است، لوپیناویر/ریتوناویر به عنوان یک گزینه درمانی بالقوه در مرحله اولیه بیماری همه‌گیر COVID-19 پیشنهاد شد. ترکیبی از لوپیناویر/ریتوناویر در یک کارآزمایی بالینی علیه COVID-19 در بیماران با COVID-19 خفیف یا متوسط (NCT04252885) ارزیابی شد، اما بهبود کمی در نتیجه بالینی نشان داد^[۳۲]. با این حال، آزمایش دیگر درباره لوپیناویر/ریتوناویر که روی بیماران مبتلا به COVID-19 حاد بستری در بیمارستان انجام شد (ChiCTR2000029308) نشان‌دهنده این بود که ترکیب این دو دارو هیچ تأثیری در زمان بهبود بالینی در مقایسه با بیمارانی که از مراقبت استاندارد برخوردار بوده‌اند، نداشته است^[۳۳]. بنابراین، مطالعات بالینی بیشتر با طراحی مناسب‌تر برای شناسایی اثربخشی این داروها به عنوان داروهای درمانی برای COVID-19 ضروری است.

با ساختار دقیقاً تعریف شده و حالت اتصال سوپسترا، غربالگری مجازی در چندین مطالعه برای کشف کاندیداهای دارویی با هدف قرار دادن Mpro استفاده شد^[۲۱].

در یک مطالعه برای جستجوی داروهایی که ممکن است Mpro SARS-CoV-2 را مهار کند، ابتدا توالی و ساختار حفاظت شده سایت اتصال لوپیناویر/ریتوناویر بین SARS-CoV و SARS-CoV-2 بررسی شد.

داروهای درمانی برای مقابله با کرونا ویروس جدید با حداقل عوارض جانبی (معمولاً خستگی و سردرد) شایان توجه بودند^[۳۷].

در مطالعه Beck و همکاران از مدلی به نام MT-DTI استفاده شد تا داروهای تجاری موجود که می‌توانند روی پروتئین‌های ویروسی SARS-CoV-2 عمل کنند، شناسایی شود. نتایج این مطالعه نشان داد که آتازاناویر (Atazanavir)، داروی ضد ویروسی که برای درمان و جلوگیری از HIV استفاده می‌شود، بهترین ترکیب شیمیایی است که در برابر SARS-CoV-2 Mpro قدرت مهارتی برابر با K_d ۹۴/۹۴ نانومولار نشان می‌دهد و پس از آن افاویرنز (Efavirenz) (۱۹۹/۱۷ نانومولار)، ریتوناویر (۲۰۴/۰۵ نانومتر) و دولوتگراویر (Dolutegravir) (۳۳۶/۹۱ نانومولار) بهترین مهارکننده علیه SARS-CoV-2 Mpro بودند^[۳۸].

همچنین در مطالعه Anas Shamsi و همکاران نیز از روش طراحی داروی مبتنی بر ساختار برای یافتن نامزدهای احتمالی ترکیبات دارویی از میان داروهای تأییدشده توسط FDA و بررسی اثربخشی آنها در مقابل SARS-CoV-2 استفاده شد. در این مطالعه غربالگری مجازی داروهای مورد تأیید FDA علیه Mpro انجام شد. با استفاده از روش‌های محاسباتی تعریف‌شده، گلسپاریور (Glecaprevir) و ماراویروک (Maraviroc) به عنوان بهترین مهارکننده‌های SARS-CoV-2 Mpro شناسایی شدند. هر دو دارو به پاکت اتصال‌دهنده سوبسترای SARS-CoV-2 Mpro که در بین تمام ساختارهای SARS-CoV-2 Mpro بسیار حفاظت‌شده است متصل می‌شوند و تعداد زیادی اتصالات غیر کووالانسی را شکل می‌دهند^[۳۹]. این مطالعه شواهد کافی برای استفاده از این دو دارو برای مدیریت درمانی COVID-19 پس از اعتبارسنجی آزمایشگاهی و تظاهرات بالینی را فراهم می‌کند.

شایان ذکر است که گزارش‌های متعدد دیگری درباره غربالگری مجازی برای کاندیدهای دارویی که Mpro را هدف قرار داده‌اند، وجود دارد و صدها عامل بالقوه درمانی کشف شده است. اگرچه این یافته‌ها با اعتبارسنجی آزمایشگاهی تأیید نشده‌اند، برای تسریع سرعت کشف کاندیدهای مناسب دارویی علیه COVID-19 عمل کردند.

تجاری پیش‌بینی‌شده در این مطالعه به عنوان مهارکننده‌های احتمالی برای SARS-CoV-2 Mpro عبارت‌اند از: بیپوتاستین (Bepotastine)، ایکاتیبانت (Icatibant)، والروبین (Valrubcin)، کولیستین (Clostin)، کاسپوفانجین (Caspofungin)، اپریتانت (Aprepitant)، واپرئوتید (Vapreotide)، اپوپروستنول (Epoprostenol)، اپی روبیسن (Epirubicin) و پرفنازین (Perphenazine)^[۳۳].

در مطالعه‌ای دیگر توسط Sekhar T و همکاران داروهای ضد ویروسی انتخاب‌شده، مورد تأیید برای کاربردهای درمانی انسانی، برای اثربخشی بالقوه در برابر COVID-19، بر اساس انرژی پیش‌بینی‌شده اتصال به هدف SARS-CoV-2 Mpro، رتبه‌بندی و نامزدهای جدید برای معرفی دارو مشخص شدند. در این مطالعه ساکویناویر (Saquinavir) و بکلابوویر (Beclabuvir) به عنوان بهترین کاندیدهای مهارکننده Mpro برای درمان COVID-19 به استناد نتایج حاصل از غربالگری مجازی و ساختار SARS-CoV-19 حاصل از داده‌های پراش اشعه X مشخص شد^[۳۴].

در مطالعه Wang J و همکاران با بهره‌گیری از ساختار کریستالی SARS-CoV-2 Mpro در کمپلکس با مهارکننده N3، غربالگری مجازی به روش داکینگ مولکولی داروهای مورد تأیید FDA و نامزدهای دارویی برای کارآزمایی بالینی انجام شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و به دنبال آن محاسبه انرژی آزاد با استفاده از یک روش نقطه انتهایی به نام مکانیک مولکولی / سطح بالایی پواسون-بولتزمن / سطح بالایی قابل دسترس به حلال (-MM-PBSA) انجام گرفت. در نتیجه این مطالعه پنج داروی خنثی، از جمله کارفیلزومیب (Carfilzomib)، ارواسیکلین (Eravacycline)، والروبین (Valrubcin)، لویپناویر و الباسویر (Elbasvir)، شناسایی شدند که فعالیت مهارتی در برابر SARS-CoV-2 Mpro داشتند^[۳۵].

همچنین در مطالعاتی که Chen YW و همکاران با استفاده از مدل مولکولی SARS-CoV-2 Mpro انجام دادند، غربالگری مجازی برای داروهای قابل استفاده مجدد انجام و ۱۶ نامزد برای بررسی پیشنهاد شد. در میان این موارد، داروهای ضد ویروسی لدیپاسویر (Ledipasvir) و ولپاتاسویر (Velpatasvir) به ویژه به عنوان

نتیجه گیری

پس از SARS-CoV و MERS-CoV، SARS-CoV-2 اکنون باعث ایجاد یک بیماری همه گیر تنفسی عفونی شده است، که تأثیر بسیار گسترده تر و بسیاری بر مراقبت های بهداشتی و اقتصاد جهانی دارد. در مواجهه با این وضعیت شدید و اضطراری، سرعت برای یافتن درمان های مؤثر به طرز چشمگیری تسریع شده است. یکی از استراتژی های درمانی بالقوه، کشف داروها با هدف قرار دادن پروتئین های حیاتی در چرخه زندگی ویروسی است. Mpro به یک هدف دارویی جذاب تبدیل شده است، زیرا نقش محوری به عنوان واسطه همانندسازی و رونویسی ویروس دارد. از طریق غربالگری های مجازی و آزمایشی، تاکنون یک سری از کاندیداهای دارویی گزارش شده است. برخی از این داروها داروهای مورد استفاده مجدد بودند که قبلاً برای کاربردهای دیگر با توانایی تأیید شده دارویی طراحی شده بودند. آنها عملکرد مطلوبی در مطالعات *in vitro* ضد SARS-CoV-2 نشان دادند و می توانند به سرعت وارد آزمایش های بالینی دیگر شوند. سایر عوامل بر اساس ساختار سه بعدی Mpro داروهای اولیه طراحی شده بودند. سایر عوامل داروهای طراحی شده ab initio بر ساختار ۳ بعدی Mpro مبتنی بودند و این ترکیب ها خاصیت مهارکنندگی قوی تری از Mpro را نشان می دهند. نتایج این مطالعات از این فرضیه پشتیبانی می کند که توسعه یک ترکیب ضد ویروسی باهدف قرار دادن SARS-CoV-2 Mpro یا در ترکیب با استراتژی های بالقوه دیگر برای توسعه یک درمان مؤثر علیه COVID-19 مفید است. همچنین رویکردهای مبتنی بر غربالگری مجازی و داکینگ ملکولی ارائه شده در این مطالعات می تواند به میزان زیادی در کشف سریع و توسعه داروهای بالقوه برای مدیریت سریع COVID-19 مؤثر باشد. هرچند برای تأیید اثربخشی، ایمنی و شناخت عوارض جانبی این داروها، همه این عوامل بالقوه ضد ویروسی SARS-CoV-2 باید در مطالعات مدل های حیوانی و بالینی ارزیابی شوند. چندین کارآزمایی بالینی در حال انجام است که اثربخشی درمان های تک و ترکیبی با داروهای ذکر شده در این بررسی را بررسی کرده است و ترکیب های جدید در دست تهیه هستند. تا زمانی که نتایج این کارآزمایی ها در دسترس نباشد، باید از بهترین شواهد موجود درباره

پیشگیری و درمان COVID-19 استفاده کنیم. شایان ذکر است در جستجوی نامزدهای دارویی، یک استراتژی ترکیبی از طراحی ab initio مبتنی بر ساختار دارویی، غربالگری مجازی و روش های تجربی چشم انداز امیدوارکننده ای را به نمایش گذاشته است. چنین استراتژی ممکن است آماده سازی جامعه پزشکی جهانی را از قبل برای همه گیری های آینده ناشی از ظهور ویروس کشنده تسهیل کند.

سهم نویسندگان

حورا بحرالعلوم (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه / نگارنده بحث (۲۰٪)؛ ساقی نورایی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه / نگارنده بحث (۱۵٪)؛ سعید بکایی (نویسنده سوم)، روش شناس / پژوهشگر کمکی (۱۵٪)؛ کیاوش هوشمندی (نویسنده چهارم)، روش شناس / پژوهشگر کمکی (۱۵٪)؛ مهدی راعی (نویسنده پنجم)، روش شناس / پژوهشگر کمکی (۱۵٪)؛ ملیحه انتظاری (نویسنده ششم)، پژوهشگر اصلی / نگارنده بحث (۲۰٪)

منابع

1. Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet infectious diseases* 2020;20(5):533-4
2. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, To KK-W, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet* 2020;395(10223):514-23
3. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of autoimmunity* 2020;102433
4. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100(7):2292-302
5. Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19). *Statpearls* [internet]: StatPearls Publishing; 2020.
6. Tavakoli A, Vahdat K, Keshavarz M. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19): an emerging infectious disease in the 21st century. *ISMJ* 2020;22(6):432-50
7. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-

19. Front. Mol. Biosci. 7:616341. doi: 10.3389/fmolb.2020.616341
22. Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., et al. (2020a). Structure of M(pro) from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* 582, 289–293. doi: 10.1038/s41586-020-2223-y.
23. Lobo-Galo, N., Terrazas-López, M., Martínez-Martínez, A., & Díaz-Sánchez, Á. G. (2020). FDA-approved thiol-reacting drugs that potentially bind into the SARS-CoV-2 main protease, essential for viral replication. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–12. doi:10.1080/07391102.2020.1764393
24. Jin Z, Zhao Y, Sun Y, Zhang B, Wang H, Wu Y, et al. Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur. *Nature structural & molecular biology* 2020;27(6):529-32
25. Yamamoto N, Yang R, Yoshinaka Y, Amari S, Nakano T, Cinatl J, et al. HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits replication of SARS-associated coronavirus. *Biochemical and biophysical research communications* 2004;318(3):719-25
26. Xu Z, Peng C, Shi Y, Zhu Z, Mu K, Wang X, et al. Nelfinavir was predicted to be a potential inhibitor of 2019-nCoV main protease by an integrative approach combining homology modelling, molecular docking and binding free energy calculation. *BioRxiv* 2020
27. Yamamoto N, Matsuyama S, Hoshino T, Yamamoto N. Nelfinavir inhibits replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in vitro. *bioRxiv*; 2020. DOI: 10.1101/2020.04.06.026476.
28. Cao, B., Wang, Y., Wen, D., Liu, W., Wang, J., Fan, G., et al. (2020). A trial of lopinavir–ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 382, 1787–1799. doi: 10.1056/NEJMoa2001282
29. Moyle G, Back D. Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement. *HIV medicine* 2001;2(2):105-13
30. Walmsley, S., Bernstein, B., King, M., Arribas, J., Beall, G., Ruane, P., et al. (2002). Lopinavir–ritonavir vs. nelfinavir for the initial treatment of HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 346, 2039–2046. doi: 10.1056/NEJMoa012354
31. Chu C, Cheng V, Hung I, Wong M, Chan K, Chan K, et al. Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: initial virological and clinical findings. *Thorax* 2004;59(3):252-6
32. Li, Y., Xie, Z., Lin, W., Cai, W., Wen, C., Guan, Y., et al. (2020). Efficacy and safety of lopinavir/ritonavir or arbidol in adult patients with mild/moderate COVID-19: an exploratory randomized controlled trial. *Med* 1, 1–9. doi: 10.1016/j.medj.2020.04.001
- 2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature communications* 2020;11(1):1-12
8. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses: Springer*; 2015. p. 1-23
9. Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* 2003;300(5626):1763-7
10. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology* 2020;92(4):418-23
11. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene reports* 2020;100682
12. Li X, Zhang L, Duan Y, Yu J, Wang L, Yang K, et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* 2020
13. Kandeel M, Altaher A, Alnazawi M. Molecular dynamics and inhibition of MERS CoV papain-like protease by small molecule imidazole and aminopurine derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery* 2019;16(5):584-91
14. Li Y-H, Hu C-Y, Wu N-P, Yao H-P, Li L-J. Molecular characteristics, functions, and related pathogenicity of MERS-CoV proteins. *Engineering* 2019;5(5):940-7
15. Zumla A, Chan JF, Azhar EI, Hui DS, Yuen K-Y. Coronaviruses—drug discovery and therapeutic options. *Nature reviews Drug discovery* 2016;15(5):327-47
16. Ullrich, S., & Nitsche, C. (2020). The SARS-CoV-2 Main Protease as Drug Target. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 127377. doi:10.1016/j.bmcl.2020.127377
17. Stoermer M. Homology Models of Coronavirus 2019-nCoV 3CLpro Protease. *chemrxiv* 2020
18. Zhang L, Lin D, Kusov Y, Nian Y, Ma Q, Wang J, et al. α -Ketoamides as broad-spectrum inhibitors of coronavirus and enterovirus replication: Structure-based design, synthesis, and activity assessment. *Journal of medicinal chemistry* 2020
19. Dai W, Zhang B, Jiang XM, et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science*. 2020;368(6497):1331-1335. doi:10.1126/science.abb4489
20. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerherring L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science* 2020;368(6489):409-12
21. Cui W, Yang K and Yang H (2020) Recent Progress in the Drug Development Targeting SARS-CoV-2 Main Protease as Treatment for COVID-

ledipasvir, and other drug repurposing candidates. 2020

38. Beck BR, Shin B, Choi Y, Park S, Kang K. Predicting commercially available antiviral drugs that may act on the novel coronavirus (SARS-CoV-2) through a drug-target interaction deep learning model. Computational and structural biotechnology journal 2020

39. Anas Shamsi TM, Anwar S, AlAjmi MF, Hussain A, Rehman MT, Islam A, et al. Glecaprevir and Maraviroc are high-affinity inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: possible implication in COVID-19 therapy. Bioscience Reports 2020;40(6)

33. Liu X, Wang X-J. Potential inhibitors against 2019-nCoV coronavirus M protease from clinically approved medicines. Journal of Genetics and Genomics 2020;47(2):119

34. Sekhar T. Virtual Screening based prediction of potential drugs for COVID-19. Preprints; 2020.

35. Wang J. Fast identification of possible drug treatment of coronavirus disease-19 (COVID-19) through computational drug repurposing study. Journal of Chemical Information and Modeling 2020

36. Chen YW, Yiu C-PB, Wong K-Y. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CL pro) structure: virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates. F1000Research 2020;9

37. Chen YW, Yiu C-PB, Wong K-Y. protease (3CL) structure: virtual screening reveals velpatasvir,