

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна

Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем

"До захисту"

Зав. кафедри молекулярної
і медичної біофізики
д.ф.- м.н., професор.

_____В.П. Берест

" ____ " _____ 20__ р.

ДИПЛОМНА РОБОТА МАГІСТРА

РОСЛИННІ ПОЛІФЕНОЛИ, ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ІНГІБІТОРИ ПАПАЇН-
ПОДІБНОЇ ПРОТЕЇНАЗИ ВІРУСУ SARS-COV-2

Науковий керівник
к.б.н., доцент

_____Боріков О.Ю.

Виконав студент групи РБ-61,
спеціальність: 105 Прикладна
фізика та наноматеріали

_____Борисенко А.О.

2024 рік

РЕФЕРАТ

Рослинні поліфеноли, як потенційні інгібітори папаїн-подібної протеїнази вірусу SARS-CoV-2. Дипломна робота. Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, 2024. 53 с., 16 рис., 105 джерел.

SARS-COV-2, ПАПАЇН-ПОДІБНА ПРОТЕАЗА (PLPRO), РОСЛИННІ ПОЛІФЕНОЛИ, МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ, ХАЛКОНИ, ПРЕНІЛЬОВАНІ ФЛАВОНОЇДИ, КВЕРЦЕТИН, РЕСВЕРАТРОЛ, КУРКУМІН, ВІРТУАЛЬНИЙ СКРИНІНГ.

Об'єкт дослідження: папаїн-подібна протеаза (PLpro) вірусу SARS-CoV-2, яка є перспективною фармакологічною мішенню для профілактики та терапії COVID-19.

Предмет дослідження: інгібуючий потенціал рослинних поліфенолів щодо PLpro SARS-CoV-2, їхня здатність формувати стабільні комплекси з активним центром ферменту.

Мета роботи: дослідити можливості використання рослинних поліфенолів як потенційних природних інгібіторів PLpro SARS-CoV-2 за допомогою методів молекулярного докінгу.

Методи дослідження: молекулярний докінг, аналіз енергії зв'язування лігандів з білком, визначення типу міжмолекулярних взаємодій.

Результати дослідження: серед 14 досліджених рослинних поліфенолів найбільшу спорідненість із PLpro SARS-CoV-2 мають халконарінгенін, бутеїн і ксантохумол. Халконарінгенін продемонстрував найнижчий показник енергії зв'язування ($\Delta G = -7,15$ ккал/моль) та мінімальну константу інгібування ($K_i = 5,7$ мкмоль/л). Отримані дані свідчать про перспективність поліфенолів як інгібіторів PLpro у контексті розробки нових антивірусних засобів.

ABSTRACT

Plant Polyphenols as Potential Inhibitors of Papain-like Protease of SARS-CoV-2 Virus. V. N. Karazin Kharkov National University, 2024. 53 p., 16 fig., 105 references.

SARS-COV-2, PAPAIN-LIKE PROTEASE (PLPRO), PLANT POLYPHENOLS, MOLECULAR DOCKING, CHALCONES, PRENYLATED FLAVONIDS, QUERCETIN, RESVERATROL, CURCUMIN, VIRTUAL SCREENING.

Object of the study: the papain-like protease (PLpro) of SARS-CoV-2, which is a promising pharmacological target for COVID-19 treatment.

Subject of the study: the inhibitory potential of plant polyphenols against PLpro SARS-CoV-2 and their ability to form stable complexes with the enzyme's active site.

Purpose: to investigate the potential of plant polyphenols as natural inhibitors of PLpro SARS-CoV-2 using molecular docking methods.

Research methods: molecular docking, analysis of ligand-protein binding energy and identification of intermolecular interactions.

The results of the study: among the 14 analyzed plant polyphenols, chalconaringenin, butein, and xanthohumol exhibited the highest affinity for PLpro SARS-CoV-2. Chalconaringenin demonstrated the lowest binding energy ($\Delta G = -7.15$ kcal/mol) and the smallest inhibition constant ($K_i = 5.7$ $\mu\text{mol/L}$). The findings confirm the potential of polyphenols as PLpro inhibitors in the development of novel antiviral agents.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
1.1 Біологія вірусу SARS-CoV-2.....	6
1.2 Фармакологічний потенціал рослинних поліфенолів	23
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	31
3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	35
4. ВИСНОВКИ.....	44
5. ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.	45

ВСТУП

Пандемія COVID-19, спричинена вірусом SARS-CoV-2, стала однією з найбільш серйозних медичних, соціальних і економічних викликів сучасності. Висока швидкість поширення вірусу, велика кількість тяжких випадків та летальність, особливо серед осіб із супутніми хронічними захворюваннями, визначили необхідність пошуку ефективних терапевтичних засобів. Хоча розробка вакцин значно зменшила рівень захворюваності, проблема залишається актуальною через постійні мутації вірусу, що призводять до виникнення нових варіантів із підвищеною вірулентністю та резистентністю до лікування.

Одним із перспективних напрямів у розробці противірусних препаратів є дослідження папаїн-подібної протеази (PLpro) вірусу SARS-CoV-2. Цей фермент відіграє ключову роль у процесінгу вірусних поліпротеїнів, а також у пригніченні противірусної імунної відповіді організму. Завдяки високій консервативності активного центру PLpro серед коронавірусів цей білок є перспективною фармакологічною мішенню для інгібіторів, які можуть ефективно блокувати реплікацію вірусу та його патогенну дію.

Особливий інтерес у боротьбі з вірусними інфекціями викликають природні сполуки, зокрема рослинні поліфеноли, відомі своїми антиоксидантними, протизапальними та антивірусними властивостями. Встановлено, що поліфеноли здатні взаємодіяти з ключовими білками вірусів, зокрема з протеазами, інгібуючи їхню активність. Однак специфічна дія поліфенолів на PLpro SARS-CoV-2 досліджена недостатньо, що визначає актуальність подальшого вивчення їхнього інгібуючого потенціалу.

Метою даної роботи є дослідження можливостей використання рослинних поліфенолів як потенційних природних інгібіторів PLpro SARS-CoV-2 за допомогою методів молекулярного докінгу. Вивчення афінності різних поліфенолів до активного центру PLpro та їхньої здатності утворювати стабільні комплекси з ферментом може стати основою для подальшого розроблення нових антивірусних засобів.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Біологія вірусу SARS-CoV-2

Епідемія COVID-19 стала однією з найсерйозніших медико-соціальних проблем сучасності, що охопила весь світ. Вірус SARS-CoV-2 поширювався надзвичайно швидко, спричиняючи мільйони випадків захворювання та сотні тисяч смертей. Захворювання впливало не лише на здоров'я населення, а й на роботу систем охорони здоров'я, які в багатьох країнах стикнулися з колапсом через брак ресурсів. COVID-19 спричинив ускладнення у людей із супутніми хронічними захворюваннями, посилюючи навантаження на медичну систему. Запроваджені карантинні заходи, такі як локдауни та соціальна дистанція, значно вплинули на соціально-економічне життя, спричиняючи зростання безробіття та економічну кризу. Вакцинація стала ключовим заходом у боротьбі з пандемією, хоча її впровадження було нерівномірним у різних країнах. Соціальна ізоляція та страх перед захворюванням спричинили зростання випадків депресії та тривожних розладів, підкреслюючи важливість психічного здоров'я. Пандемія продемонструвала вразливість глобальної системи охорони здоров'я та потребу в міжнародній співпраці для боротьби з майбутніми загрозами.

31 грудня 2019 року Всесвітня організація охорони здоров'я (WHO) отримала сповіщення з Китаю та була проінформована про кластер пневмонії нез'ясованого походження [1]. Тижнем пізніше був виявлений новий штам CoV, який згодом був оголошений представниками тієї ж організації [1]. Незабаром після цього WHO і Міжнародний комітет з таксономії вірусів обрали для нещодавно виділеного вірусу назви, відповідно, (2019-nCoV) і SARS-CoV-2 [2]. SARS-CoV-2, що розшифровується як Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, - це РНК-вірус, який належить до роду бета-коронавірусів. Він є збудником COVID-19, респіраторного захворювання.

Історично SARS-CoV-2 був виявлений після спалаху невідомого інфекційного захворювання дихальних шляхів у місті Ухань, Китай [1, 4]. Незабаром після цього на початку 2020 року спалах потрапив у заголовки як

регіональних, так і глобальних новин і занурив світ у стан занепокоєння, і фактично став початком кризи охорони здоров'я у всьому світі. Через швидке поширення спалаху було оголошено надзвичайною ситуацією у сфері охорони здоров'я, що має міжнародне значення, і 30 січня 2020 року та 11 березня 2020 року, відповідно, було визнано глобальною пандемією [5].

За даними ВООЗ станом на 13 квітня 2024 року у трьох найбільш густонаселених країнах світу було найбільше зареєстрованих випадків COVID-19. Найбільш густонаселеною країною у світі є Індія, у якій зареєстровано понад 45 мільйонів випадків COVID-19, що займає третє місце в списку. Другою за кількістю населення країною є Китай, де було зареєстровано понад 99 мільйонів випадків COVID-19, що посідає друге місце в списку. Третьою за чисельністю населення країною є США, де було понад 103 мільйони випадків COVID-19, що займає перше місце в списку. Ці три країни займають понад 35% від загальної кількості випадків COVID-19 у світі. Наприкінці 2023 року загалом у світі було зареєстровано понад 700 мільйонів випадків зараження та 7 мільйонів смертей [6].

Оскільки SARS-CoV-2 є РНК-вірусом, він має високий рівень помилок під час реплікації вірусу. Це викликає мутації та призводить до утворення нових варіантів SARS-CoV-2. Кожен варіант SARS-CoV-2 підвищує свою вірулентність і має різні наслідки. Наприклад, дельта-варіант продемонстрував підвищену ефективність проти нейтралізуючих антитіл, виявлених у реконвалесцентних пацієнтів. Нові варіанти Omicron, які передбачають як домінуючі в США, це KP.2, KP.3 і LB.1, і всі вони виникли з JN.1. Центри з контролю та профілактики захворювань (CDC) у США прогнозують, що KP.2, KP.3 і LB.1 є трьома найбільш домінуючими варіантами SARS-CoV-2. Очікувалося, що вони становлять понад 70% випадків інфікування протягом червня. З точки зору генетичної мутації, KP.2 і KP.3 отримали нову заміну спайкового білка, тоді як LB.1 і KP.2.3 отримали делецію в 31-ої позиції на додаток до попередньої мутації спайкового білка. Вчені виконали аналізи псевдовірусів (рекомбінантних вірусів) на основі лентивірусу, щоб

охарактеризувати вірусологічні особливості КР.2, КР.3 та LB.1. Псевдовіруси КР.2 і КР.3 показали підвищене здатності до ухилення від імунітету порівняно з їхньою батьківською лінією J.1 через нещодавно отриману мутацію у спайк-білку. LB.1 і КР.2.3 також продемонстрували більшу інфекційність через делецію [7].

Деякі пацієнти з COVID-19 не можуть повністю одужати та страждають від постійних симптомів. «Тривалий COVID» – це постійні симптоми, які виникають після початкової гострої фази COVID-19. У Великій Британії тривалий COVID класифікувало як такий, що має постійні симптоми після 12 тижнів після початкової появи симптомів, і назвало його хронічним COVID. І післягострий, і хронічний COVID належать до тривалого COVID [8].

Симптоми тривалого COVID відрізняються для кожної людини та можуть вражати різні системи органів, включаючи дихальні шляхи, шлунково-кишковий тракт, суглоби, центральну та периферичну нервову системи, кістковий мозок та ендокринну систему. Більшість загальних симптомів включають головний біль, депресію та втому. Міалгічний енцефаломієліт/синдром хронічної втоми (ME/CXB) – це ще один синдром, який має схожі симптоми з тривалим COVID, як-от втома та нездужання після фізичного навантаження [9].

Особливості класифікації коронавірусів

Коронавіруси (CoV) є типовими невеликими інфекційними агентами, що здатні викликати захворювання як у людей, так і у тварин [4]. Вони належать до родини Coronaviridae, яка є частиною порядку Nidovirales, і поділяються на дві підродини: Orthocoronavirinae і Torovirinae [4]. Підродина Orthocoronavirinae має чотири різні роди, які включаються у чотири основні групи або субклади. З них альфа (α)-CoV та бета (β)-CoV заражають ссавців, тоді як гамма (γ)-CoV вражає птахів, а дельта (δ)-CoV може інфікувати як ссавців, так і птахів. Незважаючи на міжвидову схожість, кожен із цих родів відрізняється за

генетичним складом, механізмом передачі, ступенем патогенності та пов'язаними захворюваннями (рис. 1.1).

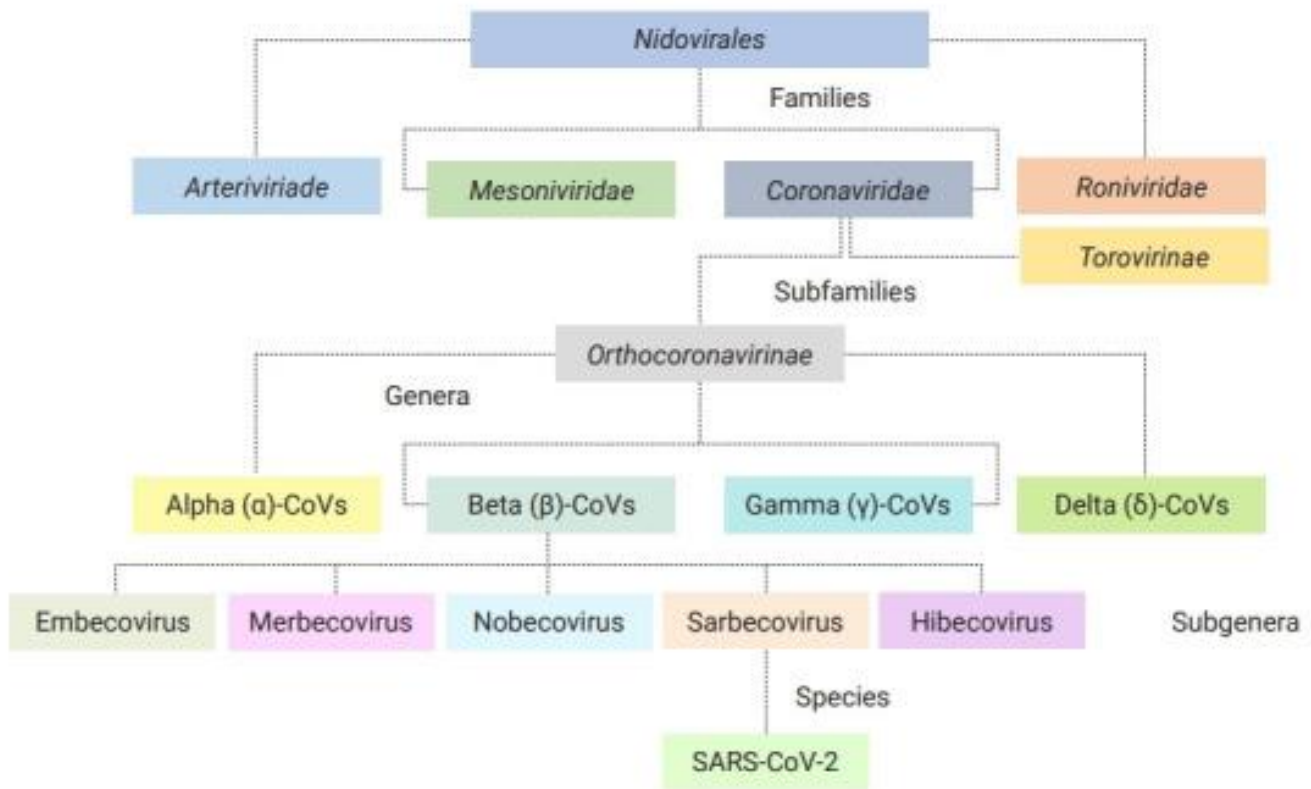


Рисунок 1.1 Класифікація коронавірусів (CoVs) [з Zhou Z. et al. 2021].

Архітектура SARS-CoV-2

Ранні мікроскопічні спостереження виявили SARS-CoV-2 як плеоморфну округлу частинку у формі корони діаметром від 60 до 140 нм [10]. Цей вірус містить спіральний нуклеокапсидний білок, який безпосередньо взаємодіє з внутрішньочастинковою геномною нуклеїновою кислотою у вигляді комплексу рибонуклеопротейнів, які оточені двошаровим ліпідом, спочатку отриманим з мембрани інфікованих клітин [11]. Вірусна оболонка підтримується мембранним білком (M) і містить невеликі включення оболонкового білка (E). Під оболонкою віріону знаходиться спірально симетричний нуклеокапсид, утворений одноланцюговою геномною РНК, покритою білком нуклеокапсиду (N) [12]. Крім того, зовнішня мембрана інфекційних вірусів містить кілька проєкційних білків (так звані спайкові білки), які мають діаметр від 9 до 12 нм

(рис. 1.2) [10]. Структурними білками коронавірусу є білки нуклеокапсиду (N), мембрани (M), оболонки (E) і спайки (S).

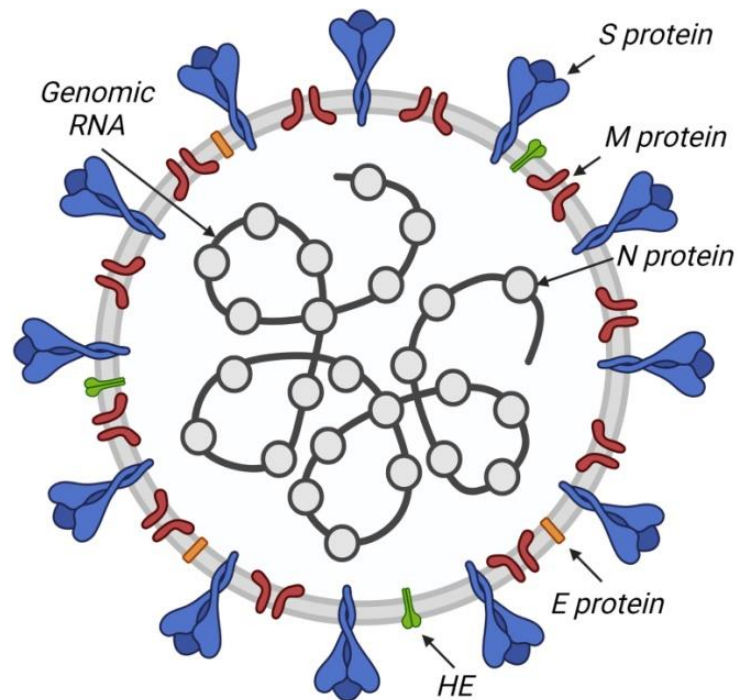


Рисунок 1.2. Структурна організація β -коронавірусів (з Bai Z. et al. 2021).

S – spike protein; E – envelope protein; M – membrane protein; N – nucleocapsid protein; HE – hemagglutinin esterase (відсутня у SARS-CoV-2).

S-білок (spike protein) (128-160 кДа) визначає тропність вірусу, зв'язуючись з рецепторами, розташованими на поверхні клітини-господаря. Білок S є гомотримером, який виступає з віріону і прикрашає поверхню вірусу, як корона. Це сильно глікозильований білок, який належить до сімейства мембранних білків I типу, і закріплюється на мембрані вірусу, де опосередковує злиття мембрани вірусу з мембраною клітини-господаря [13]. Рецептор-зв'язуючий домен (RBD) спайкового білка SARS-CoV-2 зв'язується з рецептором ангіотензинперетворюючого ферменту-2 (ACE2), критичним компонентом ренін-ангіотензинової системи (RAS), який ініціює передачу вірусу. Більшість критичних мутацій, виявлених у SARS-CoV-2, пов'язані з RBD спайкового білка. Ці мутації потенційно можуть знизити ефективність

вакцин і нейтралізуючих антитіл [14]. У нативному стані на реконструйованих віріонах можна одночасно простежити попередні та постфузійні конформації S-білків. Білок SARS-CoV-2 S містить ~1200 залишків і може бути розщеплений фуриноподібною протеазою на дві функціональні субодиниці, S1 і S2, які відповідають за приєднання до клітин-господарів і злиття мембран, відповідно [15] (Рис 1.3.).

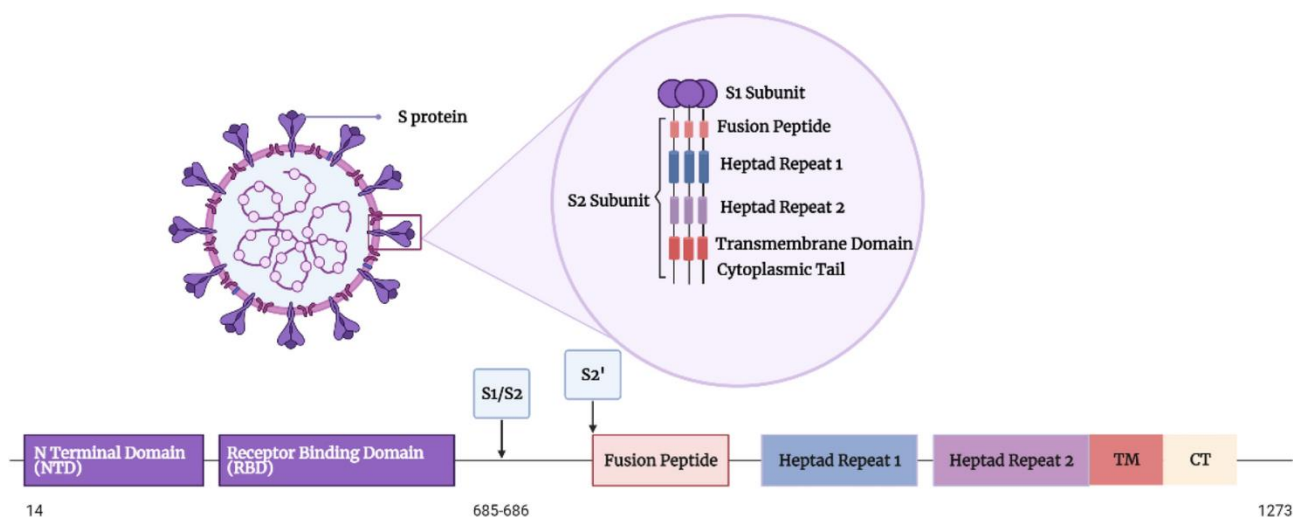


Рисунок 1.3. Доменна організація S-білка SARS-COV-2 (з Almeshdi A. et al. 2021).

N-кінцевий домен NTD, рецептор-зв'язуючий домен RBD, злитий пептид FP, гептадний повтор 1 HR1, гептадний повтор 2 HR2, трансмембранний домен TM, цитоплазматичний хвіст CT. S1/S2 і S2': сайти розщеплення S-білка

Після розщеплення під час проникнення вірусу в клітину-господаря S1 і S2 залишаються зв'язаними один з одним через нековалентні взаємодії. Субодиниця S2 складається з чотирьох консервативних структурних областей: злитого пептиду, двох гептадних повторів (HR1 і HR2) і трансмембранної області. Область HR1 становить основну спіралеподібну ніжку S2, тоді як область HR2 є тимчасово гнучкою в стані попереднього злиття. Злитий пептид утворює короткий гідрофобний сегмент [15].

N-білок (nucleocapsid protein) визначає архітектуру геному вірусу шляхом формування нуклеокапсиду з геномною РНК. Коли він локалізується в області

ендоплазматичного ретикулуму та апарату Гольджі клітини-господаря, він бере участь у збиранні та брунькуванні вірусних частинок. Також вважається, що N-білок бере участь у регуляції та модуляції реплікації та транскрипції. Було показано, що він може не тільки неспецифічно зв'язувати РНК, але й специфічно взаємодіяти з деякими послідовностями, включаючи TRS (послідовності, що регулюють транскрипцію) [13]. N-білок є важливий компонент, який захищає геном вірусної РНК і упаковує його в рибонуклеопротейновий комплекс. Реконструкція нативного SARS-CoV-2 за допомогою електронної кріотомографії свідчить про те, що значна кількість рибонуклеопротейнів може бути розташована поблизу мембрани [16].

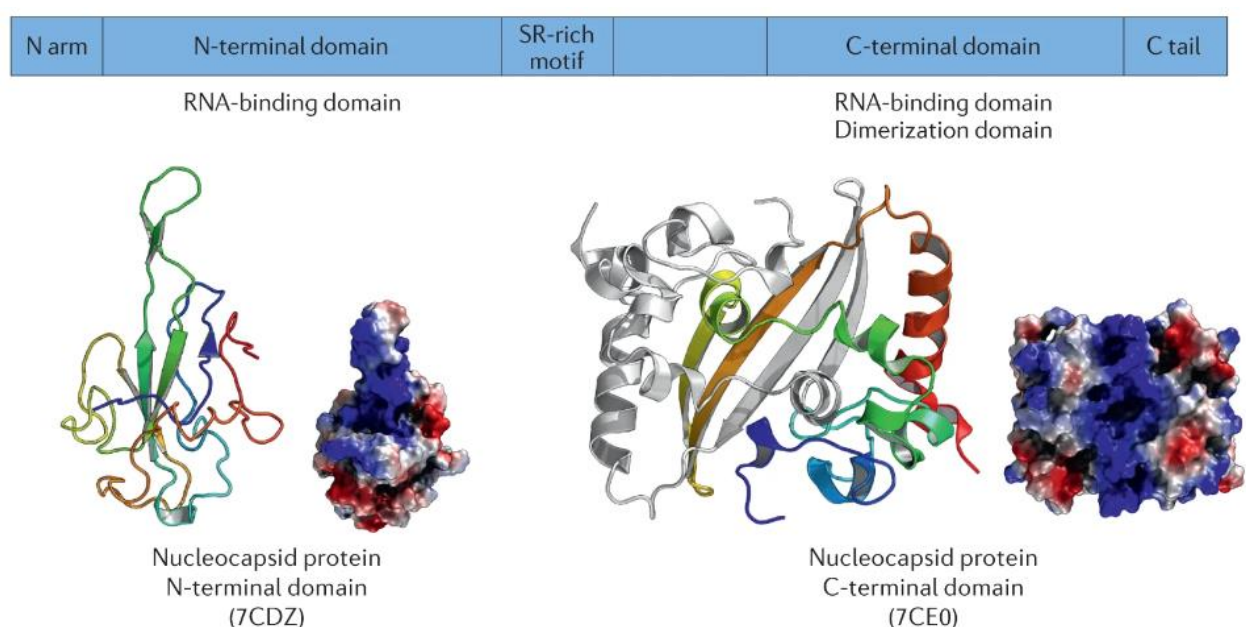


Рисунок 1.4 Структура нуклеокапсиду SARS-CoV-2 (з Mandala, V. S. et al. 2020)

N-білок також відіграє роль у протидії імунній відповіді господаря. Так було встановлено, що він запобігає антивірусній активності, що здійснюються за допомогою механізму РНК-інтерференції, шляхом його зв'язування з подвійними РНК "нитками", і може розглядатися як вірусний супресор РНК-сайлінсінгу. [17]. N-білок має потенціал як мішень для розробки вакцини, оскільки він викликає серйозну імунну відповідь під час інфекції [17]. N-білок

має два консервативні структурні домени: NTD (N-NTD) та CTD (N-CTD), кожен з яких складається незалежно (Рис 1.4).

У кристалічних структурах протеїна N, N-NTD існує у вигляді мономера, тоді як N-CTD має форму димеру. N-NTD має форму правої руки, а також містить прямокутну антипаралельну β -складку як основний піддомен. Петлі, що виступають із ядра, мають позитивний заряд, що, ймовірно, дозволяє зв'язування з РНК. Гомодимер N-CTD формує прямокутну форму, причому кожен протомер має вигляд півмісяця. Для стабілізації димерного інтерфейсу дві структури β -хаїрпіну від кожного протомера можуть формувати чотири антипаралельні β -нитки, вставляючись у кожен порожнину [18]

У порівнянні з іншими коронавірусами, протеїн N SARS-CoV-2 має різні розподіли зарядів у N-термінальній петлі, на кінчику, що виступає внизу ядра N-NTD та на β -нитці N-CTD. Отже, варіації в зв'язуванні РНК з протеїном N можуть додатково сприяти оптимізації інгібіторів.

М-білок (membrane protein) є основним мембранним білком, він вбудований у ліпідний бішар трьома трансмембранними доменами, а глікозильований ектодомен білка виступає назовні (рис. 1.5).

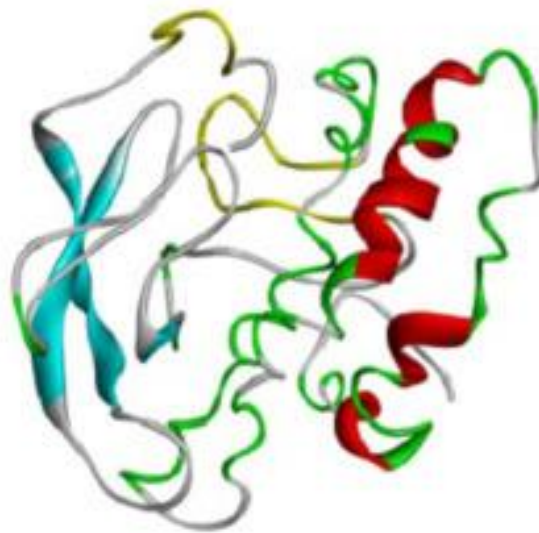


Рисунок 1.5. Структура М-білку SARS-CoV-2 (з Aldaas A.A., et al. 2021)

Білок М підтримує вірусну оболонку та визначає форму та розмір вірусного капсиду, взаємодіючи з іншими структурними білками. Взаємодія М і S необхідна для збереження S-білка в проміжному відділі між ендоплазматичним ретикулом апаратом Гольджі клітини-господаря і його включення в нові віріони. Зв'язування М і N стабілізує нуклеокапсид, а також внутрішнє ядро віріону і, зрештою, сприяє завершенню збирання вірусу [13, 19].

Е-білок (envelope protein) є невеликим інтегральним білком (8-12 кДа), він закріплюється в мембрані трансмембранним доменом, його ектодомен глікозильований, а ендодомен пальмітизований. Для вірусів SARS-CoV та IBV було показано, що білок Е утворює гомопентамери, які діють як іонні канали [15]. Такі структури модулюють процес вивільнення віріонів, беручи активну участь в інфікуванні клітини. Цікаво, що білок Е виробляється в надлишку всередині інфікованої клітини, і лише частина його включена в оболонку віріону, а більша його частина знаходиться там, де накопичуються зібрані вірусні частинки [20]. Після того, як коронавірус проникає в клітини господаря, білок Е регулює вірусний лізис і подальше вивільнення вірусного геному. Білок Е бере участь у збірці та брунькуванні вірусу шляхом локалізації в ендоплазматичному ретикулумі (ER) і мембранах апарату Гольджі [21]. Крім того, білок Е бере участь в активації інфламасоми клітини-господаря [22].

Структура білка Е, розкрита за допомогою ядерного магнітного резонансу, показує, що він складається з пучка з п'яти спіралей (рис. 1.6) [23]. Оскільки білок Е може функціонувати як іонний канал, пори всередині трансмембранної області зайняті переважно гідрофобними залишками, за винятком N-кінцевої домену. Завдяки неспецифічним міжспіральним взаємодіям місце входу на N-кінці є мішенню для зв'язування інгібітора. Встановлено, що Е-білок бере участь у регуляції викачування Ca^{2+} з ER, що може призводити до активації клітиною інфламасоми, тим самим посилюючи протівірусну відповідь господаря [23].

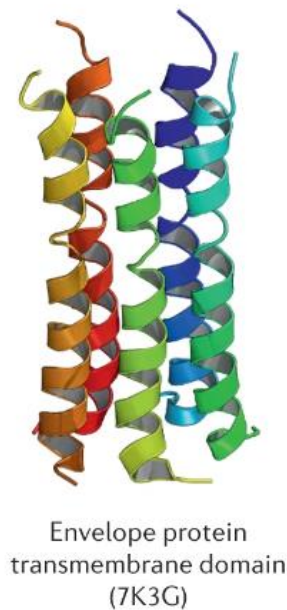


Рисунок 1.6. Структура Е-білку SARS-CoV-2 (з Mandala, V. S. et al. 2020).

Структура геному коронавірусу та механізми його експресії

Коронавіруси мають найдовший несеgmentований геном серед усіх РНК-вірусів [24]. Геном SARS CoV-2 має розмір від 26000 до 32000 нуклеотидів, він кодує 16 неструктурних (nsP1-16), 4 структурних (S, M, N та E) та 11 додаткових білків (ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c, ORF10) [12, 25].

Носієм генетичної інформації коронавірусів є позитивна смислова одноланцюгова РНК. Кожен вірусний транскрипт, як і геномна РНК, кепований на 5'-кінці та поліаденільований на 3'-кінці. Така структура дозволяє рибосомі клітини розпізнавати геномну РНК як мРНК і негайно включати її в процес трансляції вірусних білків без додавання транскрипційного комплексу у віріон. Крім того, усі вірусні РНК мають спеціальну лідерну послідовність на 5'-кінці, яка розрізняє вірусні та клітинні РНК (рис. 1.7) [13].

У процесі адаптації до еукаріотичних клітин коронавіруси виробили різні механізми трансляції свого геному. Зокрема, неструктурні білки утворюються у вигляді двох великих поліпротеїнів, які далі процесуються, відразу після потрапляння вірусу в клітину.

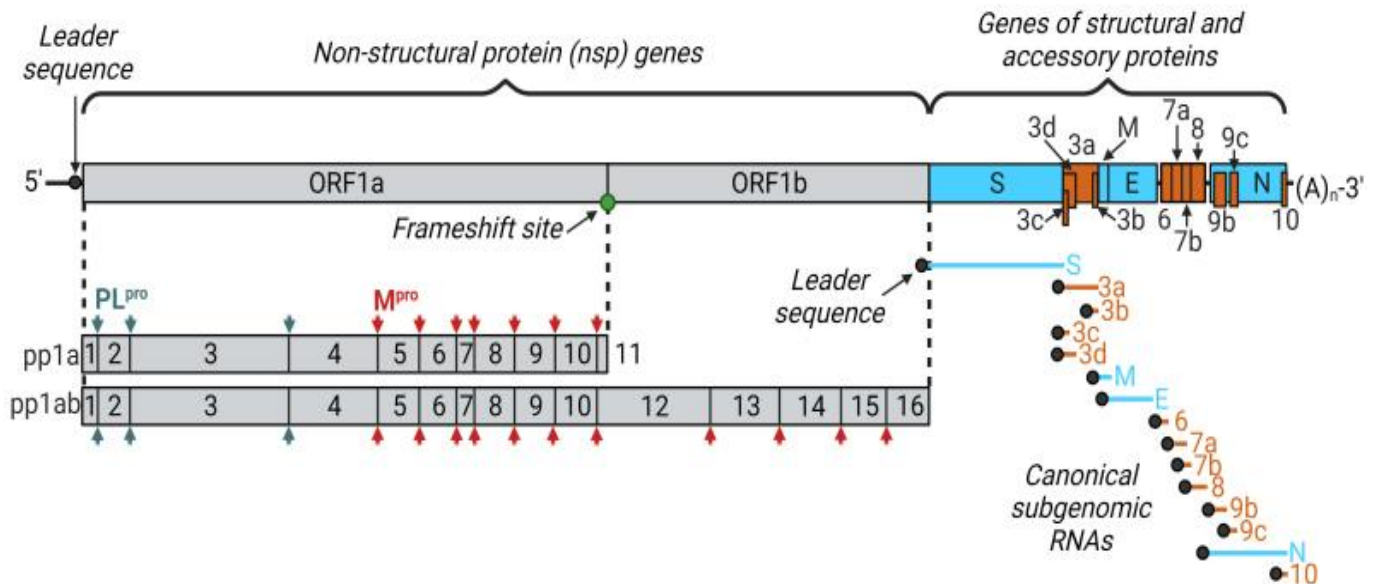


Рисунок 1.7. Схематичне зображення організації геному коронавірусу SARS-CoV-2. (з Mingaleeva N. et al. 2023).

Рамки зчитування відокремлені одна від одної місцем зсуву рамки зчитування (слизька послідовність). Трансляція призводить до утворення двох поліпротеїнових ланцюгів, pp1a і pp1ab. Неструктурні білки формуються внаслідок протеолітичного розщеплення pp1a і pp1ab за допомогою PL^{pro} та протеаз, схожих на хімотрипсин, M^{pro}. Гени структурних і допоміжних білків транскрибуються в набір субгеномних мРНК. Геномна РНК та всі субгеномні мРНК містять однакову лідерську послідовність на своїх 5'-кінцях. Гени структурних і допоміжних білків, а також їхні транскрипти виділені синім і помаранчевим кольорами відповідно.

Для транскрипції структурних і допоміжних білків коронавіруси утворюють спеціальні органели реплікації – DMV (double-membrane vesicles), які являють собою ретикуло-везикулярну мережу подвійних мембранних везикул із з'єднаними між собою зовнішніми мембранами (рис. 1.8) [26].

Віруси продукують DMV з мембран ендоплазматичного ретикула клітини-хазяїна шляхом їх послідовних перебудов, що регулюються неструктурними білками nsr3, nsr4 і nsr6, а також білками клітини-господаря [25]. Процеси реплікації та транскрипції субгеномної РНК коронавірусів відбуваються в реплікаційно-транскрипційних комплексах DMV [27]. Утворення органел реплікації характерне для РНК-вірусів із смисловим ланцюгом геному в цілому.

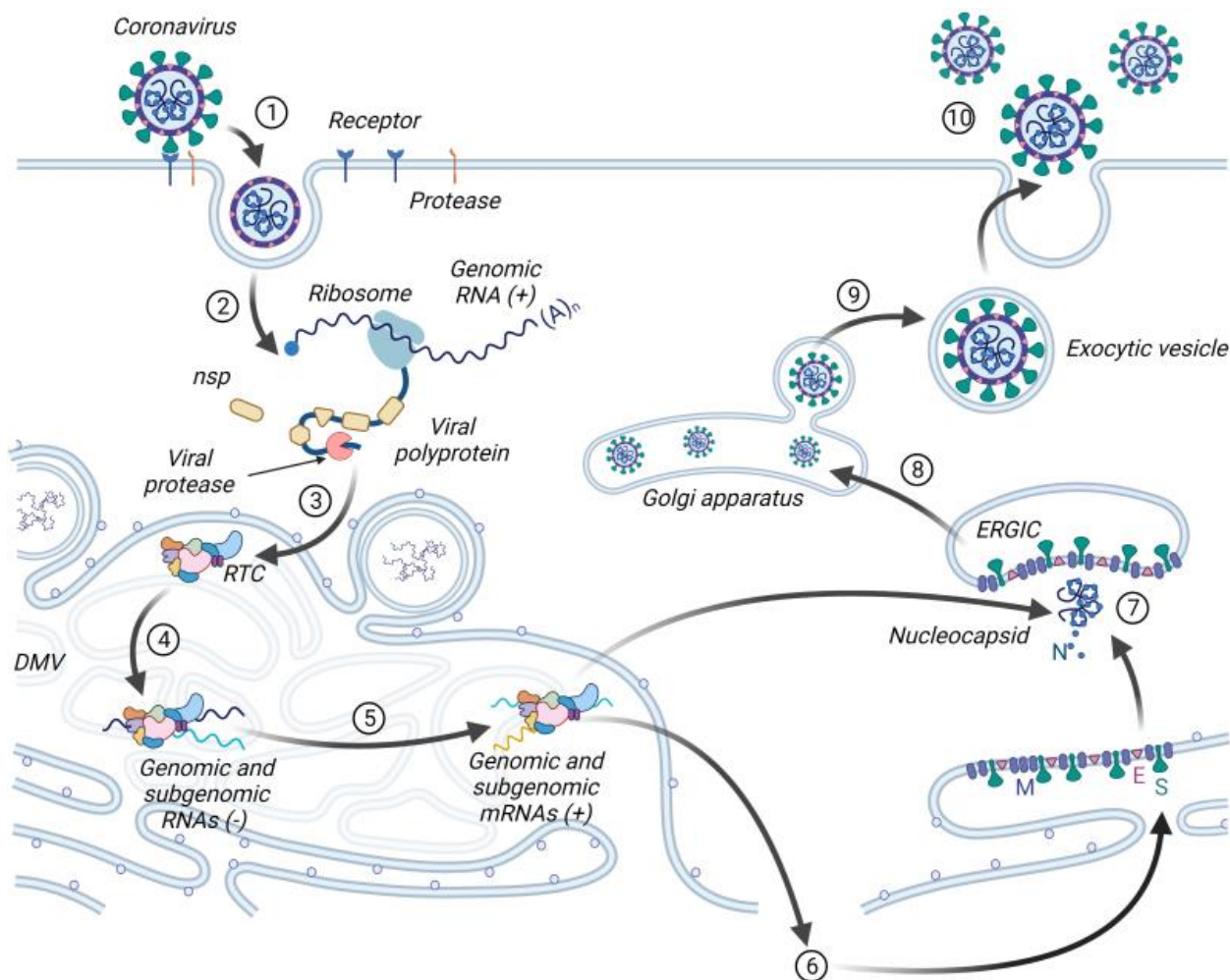


Рисунок 1.8. Життєвий цикл коронавірусів (з Mingaleeva N. et al. 2023).

Це виправдано на основі кількох фактів [28]:

- 1) в одному місці відбувається накопичення всіх факторів вірусу та клітини-хазяїна, необхідних для реплікації та транскрипції;
- 2) проміжні продукти реплікації та транскрипції не виходять за межі DMV і не розпізнаються системами клітинної противірусної відповіді;
- 3) існує можливість більш жорсткої координації процесів реплікації та транскрипції в межах DMV.

Разом із трансляцією неструктурних білків у клітині негайно відбувається накопичення повнорозмірних антисмислових геномних копій, які використовуються як матриці для формування нових смислових геномних РНК. Синтезовані смислові геноми або використовуються для трансляції більшої

кількості неструктурних білків і РТК, або упаковуються в нові віріони. Крім того, смислова РНК використовується для транскрипції субгеномних РНК шляхом переривчастої транскрипції. Спочатку утворюються проміжні антисмислові субгеномні РНК, які «транслуються» в смислові субгеномні мРНК. Структурні та додаткові білки синтезуються та переміщуються спочатку до ERGIC – проміжного відділу між EPR та апаратом Гольджі, а потім мігрують до апарату Гольджі, де відбувається утворення зрілого віріону. Віріон вивільняється з клітини шляхом конститутивного екзоцитозу (рис. 1.8) [29, 15].

Папаїноподібна протеаза вірусу SARS-CoV-2: структура та функція

PLpro є одним із восьми доменів неструктурного білка nsр3, який є найбільшим із неструктурних білків SARS-CoV-2 (212 кДа) [30]. Функції доменів nsр3 в циклі реплікації вірусу різноманітні [31] і були перевірені на SARS-CoV-1[32]. PLpro має еталонну послідовність SARSCoV-2 WIV04 і складається з 315 амінокислот (36 кДа) [32, 33]. Послідовність PLpro є висококонсервативною у всіх коронавірусів. Послідовність амінокислот PLpro SARS-CoV-2 є на 98% ідентичною спорідненим протеазам з коронавірусів кажанів BANAL-52 і RaTG13, і на 83% ідентичною спорідненим коронавірусу людини SARS-CoV-1.[34, 15] Активні центри PLpro SARS-CoV1 і SARS-CoV-2 майже ідентичні .[35] На противагу цьому повні амінокислотні послідовності PLpro ідентичні лише на 29% [36].

SARS-CoV-2 PLpro — це цистеїнова протеаза, що складається з чотирьох доменів, три з яких утворюють каталітично релевантну архітектуру великий палець – долоня - пальці правої руки (рис. 1.9). Каталітична тріада амінокислотних залишків розташована між великим пальцем (62–178 амінокислота) і долонею (241–315 амінокислота) і складається з Cys111, His272 і Asp286. Домени пальців (179–240 амінокислота) містить чотири залишки цистеїну (Cys189, Cys192, Cys224, Cys226), які відповідають за зв'язування цинку, який є для каталітичної активності [36]. Четвертий домен PLpro SARSCoV-2 є Ub-подібним доменом (1–61 амінокислота), проте, його конкретна функція ще не повністю зрозуміла [35, 37]

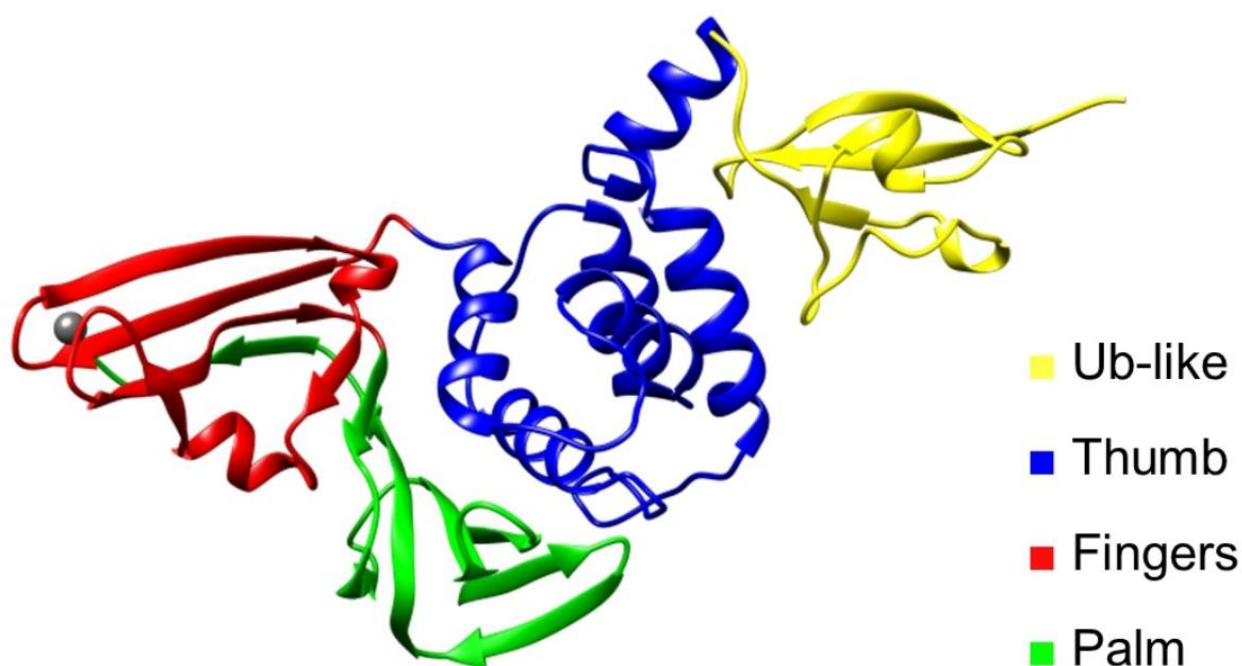


Рисунок 1.9 Доменна організація PLpro вірусу SARS-CoV-2 (з Ullrich S. et al. 2022), пояснення у тексті.

Загальна архітектура PLpro нагадує архітектуру людських деубіквітинуючих ферментів (DUB) (наприклад, специфічних до убіквітину протеаз USP) [38, 39]. Проте їхні послідовності та структури виглядають достатньо різними, щоб дозволити розробку специфічних інгібіторів вірусної PLpro, незважаючи на побоювання щодо потенційних побічних ефектів інгібіторів. Доброю практикою є контрскринінг інгібіторів PLpro проти набору людських DUB, а в разі ковалентних інгібіторів — додатково проти інших людських цистеїнових протеаз. Фактором, який асоціюється з селективним зв'язуванням до PLpro порівняно з DUB, є високо мобільна β -петля (BL2, 266–271), яка є ідентичною за послідовністю для SARS-CoV-1 та SARS-CoV-2 [40, 41].

Однією з функцій PLpro є звільнення перших неструктурних білків (nsr1–nsr4), які необхідні для реплікації вірусу (рис. 1.10) [42]. Зв'язуючись з

рибосомою людини, nsр1 інгібує трансляцію клітини-хазяїна [43], також вважається, що nsр2 порушує клітинний цикл та індукує апоптоз [44]. Окрім PLpro, nsр3 містить сім інших доменів і, серед інших функцій, бере участь у формуванні комплексу реплікації та транскрипції (RTC), як і nsр4 [42]. Варто зазначити, що nsр3 деяких коронавірусів містить додаткову PLpro, як це має місце для людських коронавірусів NL63, OC43, HKU1 та 229E [45].

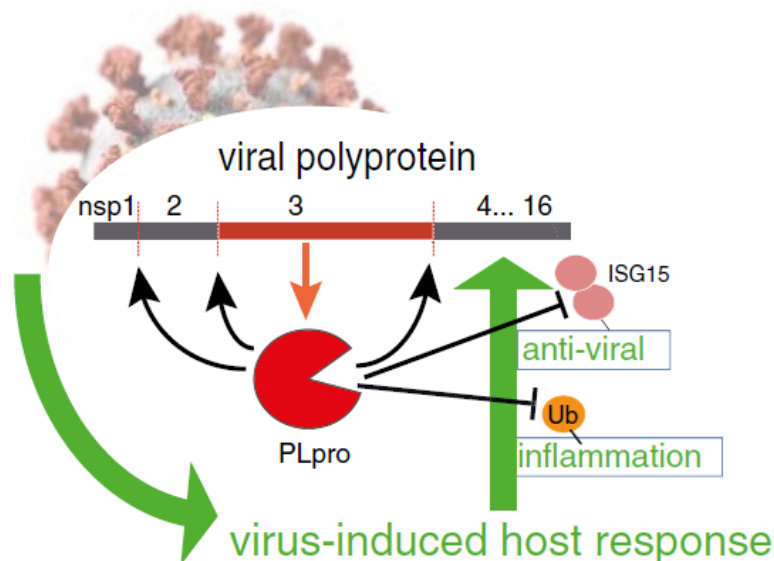


Рисунок 1.10. Розщеплення вірусного поліпротеїну pp1a/ab з утворенням зрілих nsр1, nsр2 та nsр3 (з Klemm T. et al. 2024), пояснення у тексті.

PLpro розпізнає мотиви субстрату Leu-Xaa-Gly-Gly↓Xaa (P4–P1', номенклатура Шехтера-Бергера) [46] у вірусному поліпротеїні (pp1a, pp1ab) [47]. Сайти розщеплення PLpro (P5–P5') у межах вірусного поліпротеїну ідентичні між SARS-CoV-2 та його найближчими відомими родичами вірусами кажанів RaTG13 і BANAL-52 (рис. 1.11). Аналогічно, сайти розщеплення PLpro (P5–P5') поліпротеїнів SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 і MERS-CoV мають високий ступінь ідентичності (рис. 11). Необхідність наявності Gly в P1 і P2 була підтверджена дослідженням комбінаторної бібліотеки субстратів PLpro SARS-CoV-1 і SARS-CoV-2 [47].

	nsp1↓nsp2	nsp2↓nsp3	nsp3↓nsp4
SARS-CoV-2	ELNGG↓AYTRY	TLKGG↓APTKV	ALKGG↓KIVNN
SARS-CoV	ELNGG↓AVTRY	RLKGG↓APIKG	SLKGG↓KIVST
MERS-CoV	KLIGG↓DVTPV	RLKGG↓APVKK	KIVGG↓APTWF
BANAL-52	ELNGG↓AYTRY	TLKGG↓APTKV	ALKGG↓KIVNN
RaTG13	ELNGG↓AYTRY	TLKGG↓APTKV	ALKGG↓KIVNN

Рисунок 1.11. Сайти розщеплення субстратів PLpro різних коронавірусів (з Ullrich S. et al. 2022).

PLpro бере участь у пригніченні імунної системи господаря. Важливо зазначити, що PLpro попереджує посттрансляційне убіквітинилування та ISG-лювання, які є центральними модифікаціями білків у противірусній імунній відповіді.

Вроджений імунний шлях сигналізації, що опосередковується інтерфероном, активується вірусними та бактеріальними інфекціями, та призводить до експресії сотень генів, які стимулюються інтерфероном γ (ISGs - interferon-stimulated genes). ISG15, який є одним із білків, подібних до убіквітину, ковалентно кон'югується з білком-мішенню через специфічні залишки лізину (Lys) трьома внутрішньоклітинними ензимами: активуючим ензимом E1 (UBE1L), кон'югуючим ензимом E2 (UbcH8) та лігазою E3 (HERC5). Цей процес називається «ISGylation» і є посттрансляційною модифікацією білків, яка подібна до убіквітинилування. Ковалентно кон'югований ISG15 видаляється з ISGylated білків за допомогою USP18 (також відомого як UBP43), ензиму, що декон'югує ISG15. Передбачається, що ISG15/ISGylation функціонує як антивірусний фактор проти багатьох РНК і ДНК вірусів [48]. Дослідження *in vitro* показали, що PLpro SARS-CoV-2 каталізує гідроліз флуорогенних субстратів убіквітину та ISG15 (стимульований інтерфероном ген 15). PLpro розпізнає С-кінець убіквітину (Leu73-Arg74-Gly75-Gly76) та шість С-термінальних залишків ISG15 (Leu152-Arg153-Leu154-Arg155-Gly156-Gly157). Очевидно, що С-термінальні

амінокислотні послідовності Ub та ISG15 пов'язані з послідовностями розпізнавання субстрату протеази [49].

Папаїн-подібна протеаза (PLpro) коронавірусу SARS-CoV-2 є перспективною фармакологічною мішенню для профілактики та лікування захворювання на COVID-19. Дослідження зосереджені на розробці інгібіторів PLpro з високою специфічністю та ефективністю, може сприяти розробки нових лікарських засобів, які будуть використовуватись для запобігати розвитку тяжких форм COVID-19.

2.1 Фармакологічний потенціал рослинних поліфенолів

Останні десятиліття відзначилися зростаючим інтересом до рослинних поліфенолів у контексті продуктів харчування. Численні дослідження вказують на важливу роль поліфенолів у підтримці здоров'я людини завдяки їх здатності регулювати метаболізм, впливати на масу тіла, запобігати розвитку хронічних захворювань та контролювати клітинну проліферацію. На сьогодні відомо понад 8000 різних поліфенолів, однак їхній вплив на здоров'я в короткостроковій та довгостроковій перспективі потребує подальшого вивчення [50]. Дослідження на тваринах, людях та популяційні дослідження свідчать про те, що поліфеноли проявляють антиоксидантні та протизапальні властивості, які можуть бути корисними для профілактики та лікування серцево-судинних захворювань, нейродегенеративних розладів, раку та ожиріння [51] та [52]. Водночас існують застереження щодо потенційних негативних наслідків надмірного споживання поліфенолів, особливо коли вони вживаються в ізольованому вигляді [53] та [54].

Поліфеноли - це клас сполук, які містяться у багатьох рослинних продуктах, включаючи флавоноїди, фенольні кислоти, лігнани та стильбени. Різноманітність хімічної будови поліфенольних сполук обумовлює їх дуже різноманітний вплив на біологічні функції всередині організму. Поліфенольні сполуки варіюються від простих речовин з одним бензольним кільцем до молекул з кількома конденсованими бензольними кільцями [55]. Вони в основному містяться у фруктах, овочах, злаках та напоях. Такі фрукти, як виноград, яблука, груші, вишні та ягоди, містять від 200 до 300 мг поліфенолів на 100 грам свіжої ваги. Продукти, виготовлені з цих фруктів, також містять значну кількість поліфенолів. Типово, склянка червоного вина або чашка чаю чи кави містить близько 100 мг поліфенолів. Злаки, бобові та шоколад також є джерелами поліфенолів.

Основним мономером у поліфенолах є фенольне кільце, і зазвичай вони класифікуються як фенольні кислоти та фенольні спирти. Залежно від структури фенольного ядра, поліфеноли можна класифікувати на багато класів,

але основними є фенольні кислоти, флавоноїди, стилібени та лігнани [56] (рис. 1.12).

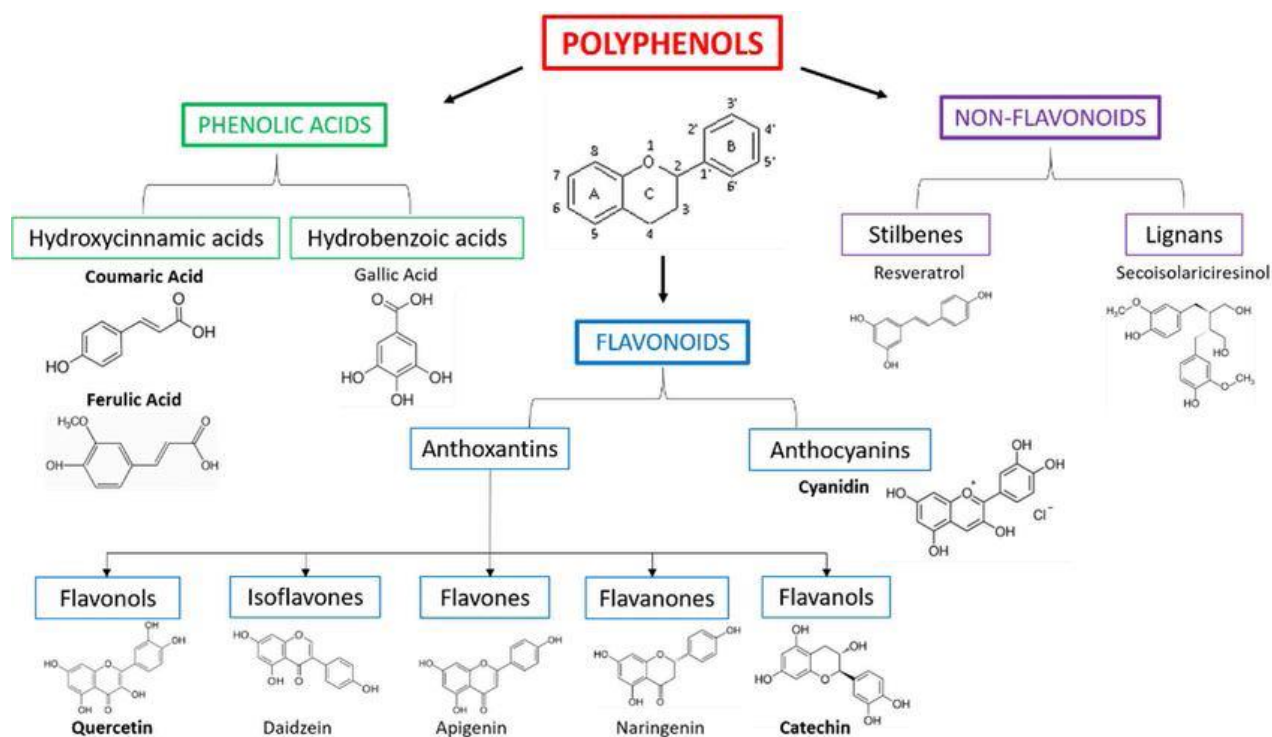


Рисунок 1.12. Класифікація поліфенолів

Флавоноїди є найбільшою групою поліфенольних сполук, які є продуктами вторинного метаболізму у вищих рослинах [57]. Завдяки їхній всебічності та вражаючим біологічним функціям/діяльності вони продовжують ретельно досліджуватися як потенційні ліки або харчові добавки [58].

Флавоноїди складаються з дифенілпропанового скелету з тривуглецевим містком між фенільними групами, який зазвичай циклізується утворюючи флавон [59, 60] (див рис. 2.1).

Флавоноїди класифікуються на кілька підгруп: халкони, флавоноли, ізофлавоноли, флавоноли, флаванони, флаваноли та антоціани (див рис. 2.1). Всі вони, за винятком халконів, мають базову структуру (2-фенілхроману) (див рис. 2.1). Флавоноїди в рослинах зазвичай зв'язані з цукрами (глюкоза, галактоза, рамноза, ксилоза, рутиноза, арабінопіраноза та арабінофураноза) у формі β -глікозидів [59]. Залишок цукру визначає їхнє всмоктування [59]. Глікозиди

флавоноїдів в основному накопичуються в зовнішніх частинах рослин, тоді як коріння і бульби містять дуже низькі концентрації флавоноїдів з деякими помітними винятками, такими як цибуля і солодка [61].

Найбільш поширені флавоноїди це флавонол кверцетин, що рясно міститься в цибулі, броколі, чаї та яблуках; флаванол катехин, що міститься в чаї та різних фруктах; флаванон нарингенин, присутній у цитрусових; ціанідин і антоціан, що надають колір багатьом червоним фруктам/ягодам (чорна смородина, малина, полуниця, чорниця, виноград тощо); дайдзеїн і геністеїн - основні ізофлавоїди сої [62, 63].

Багаточисленні дослідження свідчать, що поліфенольні виконують ряд захисних функцій в організмі людини. Багато з них є біоактивними сполуками, здатними взаємодіяти з нуклеїновими кислотами або білками, що обумовлює їх потенційну фармакологічну активність [64]. Існує безліч досліджень, що підкреслюють широкий спектр біологічної активності Флавоноїдів, включаючи антиоксидантну [65], протипухлинну [66], антимікробну [67, 68], та протизапальну активність [69].

Біологічна активність катехінів

Катехіни містять бензопірановий скелет з фенільною групою, приєднаною до 2-ї позиції, і гідроксильною групою до 3-ї позиції [70]. Вони існують у мономерній, олігомерній і полімерній формах, і не глікозильовані [71]. Основними джерелами катехінів є фрукти, ягоди, злаки, горіхи, шоколад, червоне вино і чай [71].

Вони також можуть діяти як прооксиданти, індукуючи утворення H_2O_2 для провокування апоптотичного процесу в ракових клітинах [72]. Однак індукування утворення активних форм кисню (АФК) може мати шкідливий вплив на незлоякісні клітини [73]. Таким чином, їхній антиоксидантний/прооксидантний механізм дії залежить від типу клітини, дози та часу експозиції [72]. Показано, що інгібуючи активацію ферментів матриксних металопротеїназ MMP-2 і MMP-9, катехіни ефірного типу з

галоїльною групою інгібують інвазію ракових клітин [73]. Гальмування активності ліпоксигенази (LOX) і циклооксигенази (COX) епігалокатехіном-3-галатом (EGCG), епігалокатехіном (EGC) і епікатехіном-3-галатом (ECG), впливає на метаболізм арахідонової кислоти, ріст клітин, проліферацію, інвазію пухлини та запалення [73, 74].

На додаток до протипухлинної та антиоксидантної дії, катехіни модулюють перекисне окислення ліпідів [75] та [73], що може завдати шкоди ліпідному шару мембран клітин, а отже вплинути на такі захворювання, як діабет, серцево-судинні захворювання та рак [76]. Чайні катехіни також мають нейропротекторну дію [74]. Такі катехіни, як EGCG і ECG, демонструють здатність модулювати естрогенну активність, впливаючи на експресію генів, опосередковану рецепторами естрогену (ER), шляхом зв'язування з ER α і ER β [74].

Біологічна активність флавонолів, флавонів та флаванонів

Найбільш вивченою групою є флавоноли, особливо її представник кверцетин, що не дивно, враховуючи їх широке поширення в харчових продуктах рослинного походження [77]. Варіабельність флавонолів варта уваги, оскільки на сьогодні описано близько 380 глікозидів флавонолів і 200 різних кверцетинових і кемпферолових глікозидів [80].

Флаванони представляють невелику групу сполук, що зустрічаються головним чином у цитрусових плодах і сливах [77, 78]. Найважливішими серед агліконових форм флаванонів (які абсорбуються швидше) [77] є нарингенин і гесперитин [79]. Тим не менш, значні кількості флаванонів у агліконовій формі рідко зустрічаються в натуральних продуктах харчування [77].

Глікозидні форми флаванонів поділяються на дві групи: неогесперидози і рутинозиди. Гіркий смак бергамоту, грейпфрута і гіркого апельсинового соку в основному обумовлений неогесперидозидами, такими як нарингін, неогесперидин і неоеріоцитрин [79].

Більшість флавонолів, флавонів і флаванонів мають антиоксидантну активність. Однак відсутність гідроксильної групи в положенні 3 у флаванонів і флавонів знижує їх антиоксидантну активність. З іншого боку, подвійний зв'язок 2,3 робить структуру більш реактивною — з цієї причини апігенін є помірною антиоксидантною сполукою, тоді як нарингенін не має зареєстрованої активності проти супероксидного аніона. Флавоноїди проявляють антиоксидантну активність у гідрофільному середовищі. У ліпофільному середовищі молекули, такі як неогесперидин, гесперитин, дидимін і ізосакурнетин, демонструють знижену антиоксидантну здатність, тоді як нарингін, нарирутин, нарингенін, неоеріоцитрин і герідіктиол навіть демонструють зворотну поведінку, стаючи прооксидантами [79]. Крім того, лютеолін, кемпферол, кверцетин і нарингенін мають здатність інгібувати естрогенну дію 17- β -естрадіолу шляхом конкурентного зв'язування з рецептором естрогену (ER) [81]. Байкалін інгібує експресію рецептора андрогену [74]. Кверцетин, байкалін і апігенін зупиняють клітинний цикл ракових клітин у фазі G2/M, байкалін також індукує зупинку у фазі G1/S, а апігенін викликає зупинку у фазі G0/G1 [81]. Усі зупинки клітинного циклу супроводжуються індукцією апоптозу [75]. Більше того, байкалін і кемпферол запускають апоптоз шляхом інгібування експресії антиапоптичного білку Bcl-2 [74]. Деякі флавоноїди також впливають на реплікацію ДНК шляхом інгібування зворотної транскриптази. Передумовою для цієї дії є наявність як ненасиченого подвійного зв'язку між положеннями 2 і 3 С-кільця флавоноїду, так і трьох гідроксильних груп, введених у положення 5, 6 і 7 (тобто байкалін) [74].

Біологічна активність ізофлавонів

Ізофлавоони - це природні фітохімічні речовини класу флавоноїдів, які називають "фітоестрогенами" через їх естрогенну дію, з наявністю -ОН між С4 і С7 [53]. Основним джерелом ізофлавонів є бобові, особливо соєві продукти [82]. В Азії соєві продукти широко поширені в раціоні харчування, як

ферментовані, наприклад соєвий соус, так і неферментовані, наприклад тофу і соєве борошно. Для зв'язування з естрогеновим рецептором, відмінною рисою фітоестрогенів, за деякими винятками, є фенольне кільце [84]. Фітоестрогени з фенольним кільцем можуть діяти як агоністи естрогену або при більш високих концентраціях навіть як антагоністи естрогену [82, 83, 84]. Серед усіх поліфенолів ізофлавоони найкраще всмоктуються в організмі людини.

Біологічна активність антоціанидинів

Антоціанидини в природі головним чином зустрічаються у вигляді глікозидів, які називаються антоціанами [85]. Як універсальні рослинні барвники, антоціанидини є найвидатнішими представниками групи біофлавоноїдів фітохімічних речовин [86, 87]. На сьогодні ідентифіковано понад 600 молекулярних структур антоціанидинів. Вони надають червоні, фіолетові та сині відтінки різним фруктам, овочам, зерновим культурам і квітам [86]. Колір антоціанидинів залежить від рН [88]. Основними джерелами антоціанидинів є чай, мед, вино, фрукти, такі як яблука, ягоди; овочі, такі як буряк і цибуля; горіхи, оливкова олія, какао та зернові культури [87, 88]. Основними представниками групи антоціанидинів є дельфінідин, пеларгонідин, мальвідин, ціанідин і петунідин [86, 87].

Ізоляти антоціанидинів і багаті на антоціанидини суміші біофлавоноїдів продемонстрували здатність запобігати розриву ДНК, естрогенну активність (змінюючи розвиток симптомів гормонозалежних захворювань), інгібування ферментів, підвищення вироблення цитокінів (тим самим регулюючи імунну відповідь), протизапальну активність, зниження пероксидації ліпідів, зниження проникності і крихкості капілярів, а також зміцнення мембран. Отже, вони здатні знизити ризик серцево-судинних захворювань і завдяки своїм протипухлинним і хемопротекторним властивостям пригнічувати зростання пухлин. Вважається, що основними механізмами профілактики канцерогенезу є інгібування ферментів циклооксигенази, потужний антиоксидантний потенціал та блокування активації шляху MAPK [86, 87, 88].

Потенціал використання поліфенолів у боротьбі з коронавірусами

Показано, що флавоноїди можуть попереджувати розвиток коронавірусної інфекції SARS і MERS, завдяки блокуванню ферментативної активності вірусних протеаз, таких як основна протеаза коронавірусу (Mpro), 3-хімотрипсин-подібна протеаза (3CLpro) та папаїн-подібна протеаза (PLpro), а також впливати на активність хелікази та функцію S-білка [89]. Деякі флавоноїди пригнічують активність ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) [90], який не тільки відіграє важливу роль у серцево-судинних захворюваннях, таких як гіпертонія, але також може бути ключовим фактором у вірусних інфекціях та пневмонії [91].

Деякі флавоноїди можуть перешкоджати активації інфламасоми NLRP3 [92], яка підвищує вироблення запальних цитокінів і таким чином може спричинити синдром гострого респіраторного дистресу, який часто виникає при захворюваннях, викликаних коронавірусом SARS [93] та інфекціях SARS-CoV-2 [94].

Показано, що флавон лютеолін, демонструє високу спорідненість з S-білка вірусу, тим самим запобігаючи його проникненню в клітини людини [95]. Інгібування S-білка в основному спричиняється поліфенолами, присутніми в цитрусових, куркумі та коренях ревеню. Інші дослідження вказують на можливість блокування S-білка активними сполуками, що містяться в травах і чаї, такими як, нарингенін, EGCG або гербацетин [96]. Проникнення в клітини господаря блокується шляхом інгібування ферменту АПФ2, який є точкою зв'язування вірусу SARS-CoV-2 з поверхньою клітин. Поліфеноли, які містяться в куркумі, йербі мате та червоному винограді (еріодицитол, ресвератрол, куркумін і катехіни), які мають високу спорідненість до рецепторів АПФ2, також можуть запобігати проникненню вірусних часток в клітини [97].

Деякі поліфеноли блокують розмноження вірусу шляхом пригнічення реплікації вірусної РНК. Так було показано, що поліфеноли EGCG, мірицетин і

кверцетин демонструють високу спорідненість до вірусної RdRp - РНК-полімерази, яка відповідає за реплікацію вірусного генетичного матеріалу [98].

Антивірусний потенціал поліфенолів також може бути пов'язаний з їх антиоксидантними властивостями та здатністю ущільнювати кровоносні судини, шляхом інгібування синтезу прозапальних цитокінів. Дані літературні свідчать, що поліфеноли зеленого чаю, винограду, ягід, цитрусових та куркуми можуть бути корисними для боротьби з коронавірусними інфекціями. У цьому сенсі найчастіше згадуються ресвератрол, EGCG, теафлавін-3-О-галат, оолонггенобісфлаван-А та теасіненсин-D [99, 100, 101].

Незважаючи на великий фармакологічний потенціал використання рослинних поліфенолів у якості лікарських засобів стикається з цілою низкою проблем, а саме, низька біодоступність, низька стабільність та поганий розподіл, які виявляються при тестуванні цих сполук на тваринних або культурах клітин. Для підвищення фармакокінетичних властивостей поліфенолів використовують різні стратегії, такі як введення структурних модифікацій [102], використання енхансерів абсорбції або транспортних наночастинок [103, 104].

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Підготовка PLpro до докінгу

У якості шаблону для молекулярного докінгу була використана структура комплексу PLpro вірусу летючих мишей BtSCoV-Rf1.2004 з синтетичним інгібітором GRL-0617, отримана методом рентгеноструктурного аналізу з роздільною здатністю 3,16Å. (Protein Data Bank, ID: 7SKQ, ланцюг A). Первинна послідовність PLpro BtSCoV-Rf1.2004 ідентична на 97,8% та 80% до послідовностей PLpro SARS-CoV-1 та SARS-CoV-2, відповідно. Вивчення ключових функціональних ділянок, зокрема активного центру, що зв'язує інгібітор, і мотиву взаємодії з убіквитином (UIM), показало, що ці області високо консервативні серед усіх PLpro підгрупи 2b [105]. PLpro BtSCoV-Rf1.2004 використовувався як інструмент разом із PLpro CoV-1 та CoV-2 для розробки 30 нових нековалентних інгібіторів PLpro підгрупи 2b, що включало визначення впливу, раніше невивчених, основних лінкерів у цих сполуках [105].

Підготовку білка до докінгу: видалення молекул води та інгібітору, додавання полярних атомів водню та розрахунок часткових атомних зарядів (метод Кольмана) проводили за допомогою пакету програм AutoDockTools-1.5.7.

Підготовка PLpro до докінгу

Для аналізу були відібрані 14 сполук, які є характерними представниками різних класів поліфенолів, а саме, халкони: 2-гідроксихалкон, халконарінгенін та бутеїн; пренільовані флавоноїди: ксантохумол, ізоксантохумол та 8-пренілнарінгенін; різні представники підкласу флавоноїдів: кверцетин, апігенін, ціанідін, епікатехін, гінестеїн, нарінгенін; представник стибленів – ресвератрол; куркумін, який не входить до жодного підкласу (див. табл. 2.1). Структури сполук отримали з бази даних PubChem. Оптимізацію тривимірної геометрії та генерацію конформерів лігандів проводили з використанням програми MarvinSketch від компанії Chemaxon.

За центр кубу докінгу приймали координати геометричного центру молекули інгібітору GRL-0617 з кристалічної структури 7SKQ (ланцюг A): X=-23.444, Y=11.0, Z=41.278, довжина ребра кубу докінгу 22Å (рис. 2.1). Грати потенціалів в кубі докінгу з кроком 1Å будували за допомогою програми AutoGrid4. Докінг лігандів проводили в програмі AutoDock4. Для пошуку глобального мінімуму енергії зв'язування використовували генетичний алгоритм, якій запускали 25 разів для кожного ліганду, максимальна кількість обчислень 2500000.

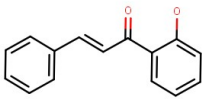
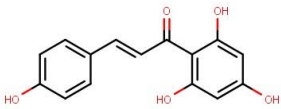
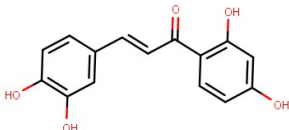
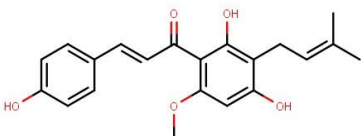
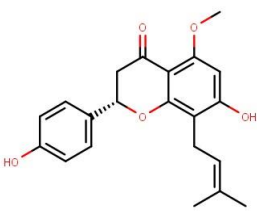
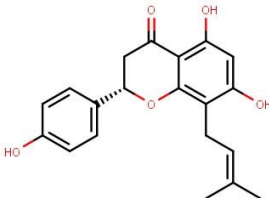

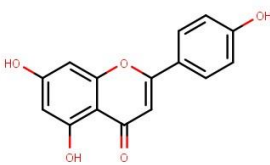


Після проведення докінгу проводили процедуру рекластеризації для розподілу 25 згенерованих програмою конформацій за кластерами. Порогове значення кореня з середньоквадратичної дистанції (RMSD) в середині кластера приймали за 0,5 Å, що забезпечувало однотипність конформацій у кластері. Після рекластеризації відбирали найкращі за енергією конформації. Оцінку якості докінгу проводили за кількістю кластерів, кількістю конформацій у першому кластері та значенням вільної енергії зв'язування ($\Delta G < -5$ ккал/моль). Константу дисоціації (K_d) комплексу ліганд-білок, яка, за умов зворотнього конкурентного інгібування, співпадає з константою інгібування (K_i), розраховували за наступним рівнянням:

$$\Delta G = RT \ln K_d$$

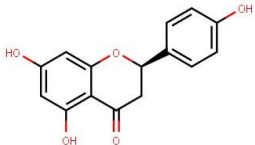
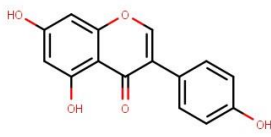
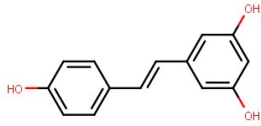
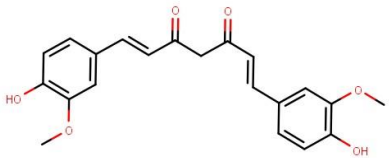
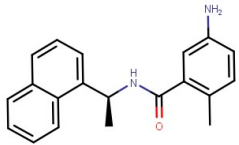
$$K_i \approx K_d, \text{ за умов зворотнього конкурентного інгібування}$$

Для визначення типу та візуалізації міжмолекулярних взаємодій між молекулою ліганду та залишками амінокислот білка в кубі докінгу використовували програму Discovery Studio 2021.

Таблиця 2.1 Представники різних класів поліфенолів, які використовувались для молекулярного докінга.

Класи	Сполуки	Структури
Халкони	2-гідроксихалкон	
	Халконарінгенін	
	Бутеїн	
Пренільовані флавоноїди	Ксантохумол	
	Ізоксантохумол	
	8-пренілнарінгенін	
Флавоноли	Кверцетин	
Флаволи	Апігенін	
Флаваноли	Епікатехін	
Антоціани	Ціанідін	

Продовження таблиці 2.1

Класи	Сполуки	Структури
Флаванони	Нарінгенін	
Ізофлаванони	Гінестейн	
Стиблени	Ресвератрол	
Інші поліфеноли	Куркумін	
Синтетичний інгібітор	GRL-0617	

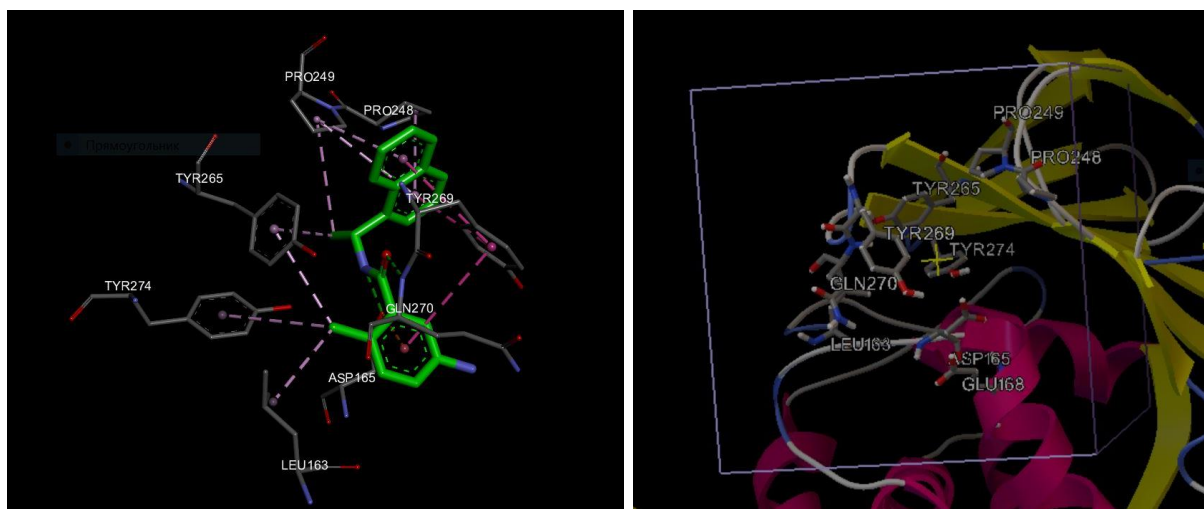


Рисунок 2.1. Розташування інгібітору GRL-0617 в кристалічній структурі 7SKQ та розташування кубу докінгу в моделі молекули білка.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В результаті віртуального докінгу GRL-0617 в активний центр PLpro були отримані результати, які добре співпадають з орієнтацією та конформацією ліганду в кристалічній структурі 7SKQ, отриманої за допомогою рентгеноструктурного аналізу комплексу ($\text{RMSD} < 1\text{\AA}$). GRL-0617 зв'язується поблизу каталітичного центру ферменту, який утворений тріадою амінокислот: Cys112, His273, Asp287. Розрахункова енергія зв'язування ліганду складає $-8,84$ ккал/моль, $K_i = 300$ нмоль/мл, що добре співпадає зі значеннями, отриманими експериментально [105]. У міжмолекулярних взаємодіях білку з лігандом приймають участь залишки Asp165, Glu168 та Gln270, які утворюють класичні водневі зв'язки з полярними групами GRL-0617. Карбоксильна група Asp165 також взаємодіє з π -системою бензенового кільця GRL-0617, утворюючи π -аніонний зв'язок. Важливу роль у зв'язуванні ліганду також відіграє низка гідрофобних взаємодій, включаючи π -алкільні та π - π T-подібні взаємодії між залишками Pro248, Pro249 та Tyr269, відповідно, та нафтовим кільцем ліганду. Інші гідрофобні взаємодії опосередковані залишками Leu163 (акіл-акіл), Tyr265 (π -sigma, π -алкіл), Tyr274 (π -алкіл) та метильними групами ліганду (Рис. 3.1).

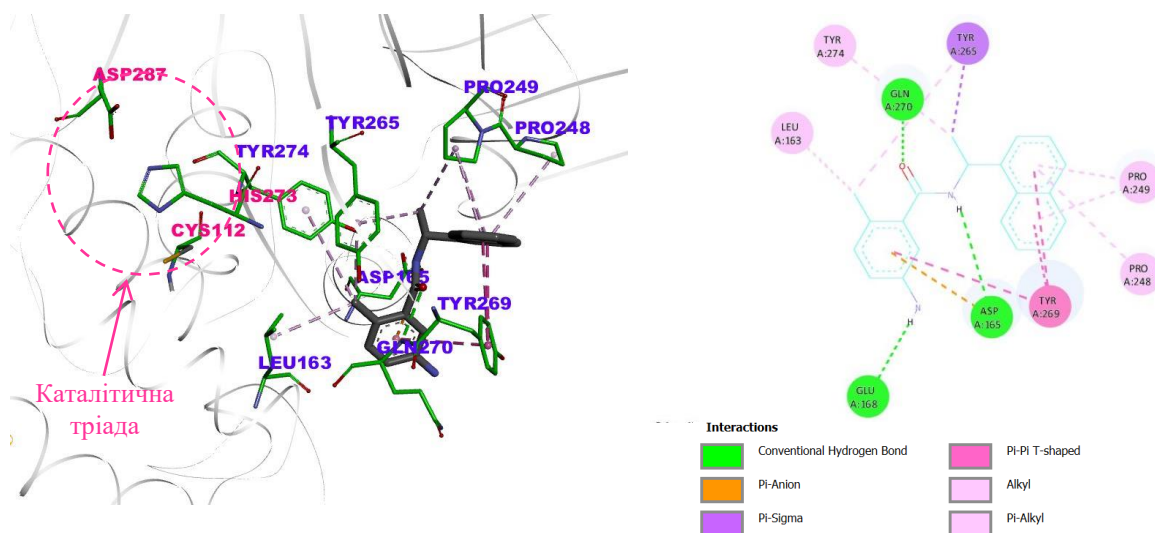


Рисунок 3.1 Розташування та конформація GRL-0617 з мінімальною вільною енергією за результатами молекулярного докінгу.

Молекулярний докінг сполук, які є типовими представниками різних класів рослинних поліфенолів, виявив, що найбільшу афінність до активного центру PLpro BtSCoV-Rf1.2004 мають представники класу халконів та пренільованих флавоноїдів (Рис 3.2). Серед 14 досліджених сполук найменшу енергію зв'язування та значення константи інгібування мали халконаренінгенін ($\Delta G = -7,15$ ккал/моль, $K_i=5,7$ мкмоль/л), 2-гідрокси-халкон ($\Delta G = -6,76$ ккал/моль, $K_i=11,1$ мкмоль/л), бутеїн ($\Delta G = -6,55$ ккал/моль, $K_i=15,9$ мкмоль/л), ксантохумол ($\Delta G = -6,57$ ккал/моль, $K_i=15,2$ мкмоль/л), ізоксантохумол ($\Delta G = -6,31$ ккал/моль, $K_i=23,8$ мкмоль/л), 8-пренілнарінгенін ($\Delta G = -6,31$ ккал/моль, $K_i=23,7$ мкмоль/л).

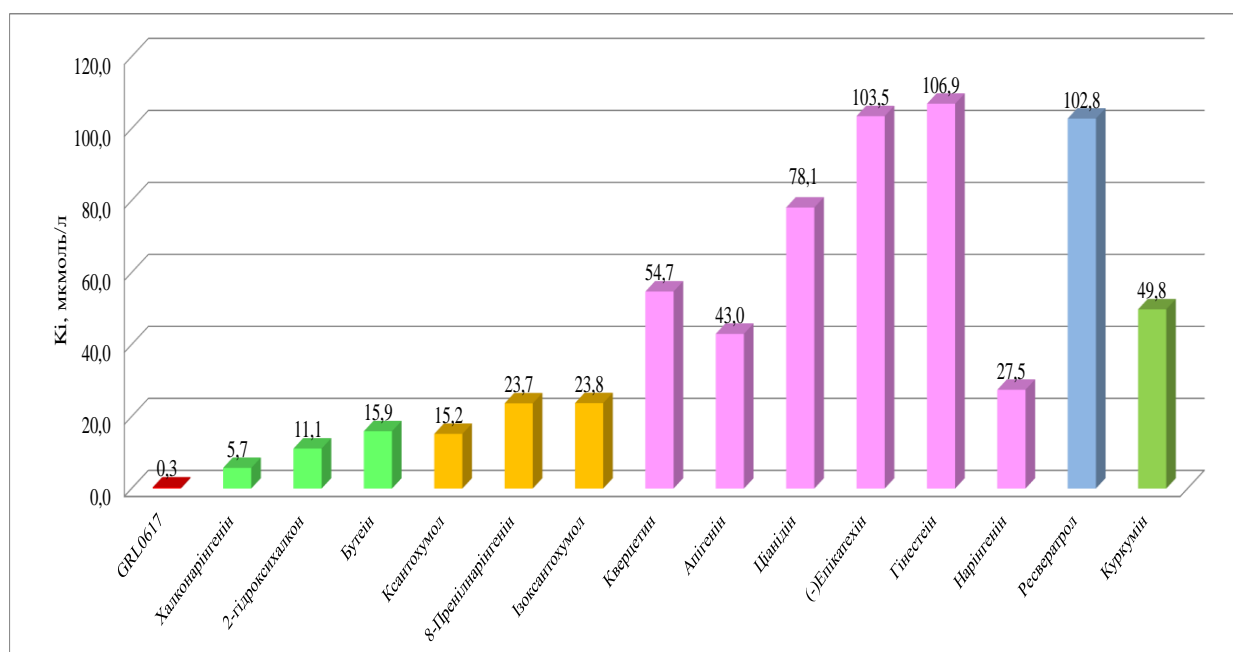
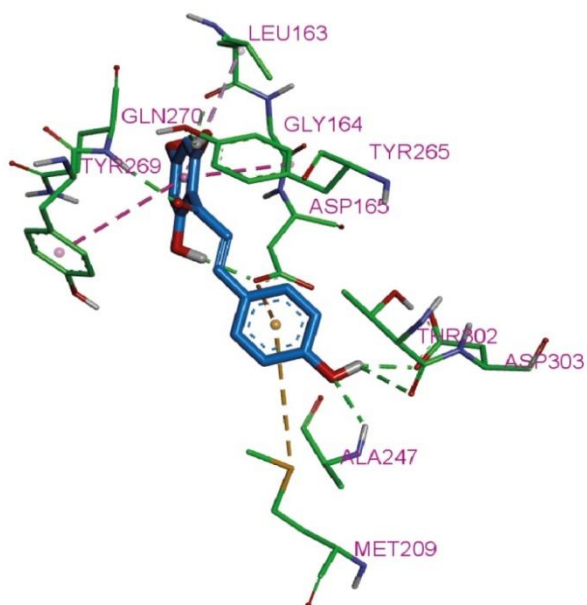
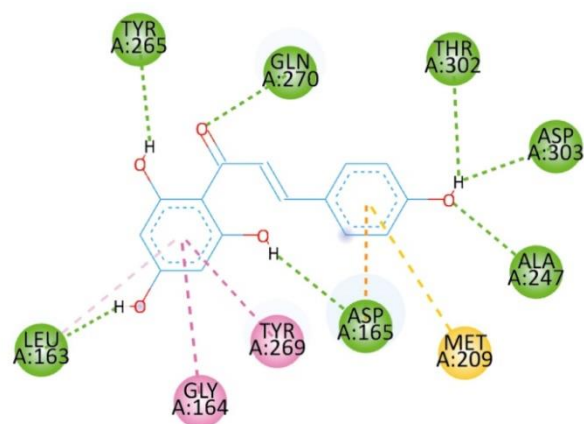


Рисунок 3.2 Розрахункова константа інгібування PLpro представниками різних класів рослинних поліфенолів.

Усі досліджені представники групи халконів утворюють π -аніонний зв'язок з карбоксигрупою Asp165, але лише халконаренінгенін утворює з цією групою ще й класичний водневий зв'язок. Також, на відміну від інших досліджених халконів, халконаренінгенін утворює водневі зв'язки з залишками Tyr265, Asp303, Thr302 та π -гідросульфідний зв'язок з групою Met209 (Рис 3.3 А, В, С).



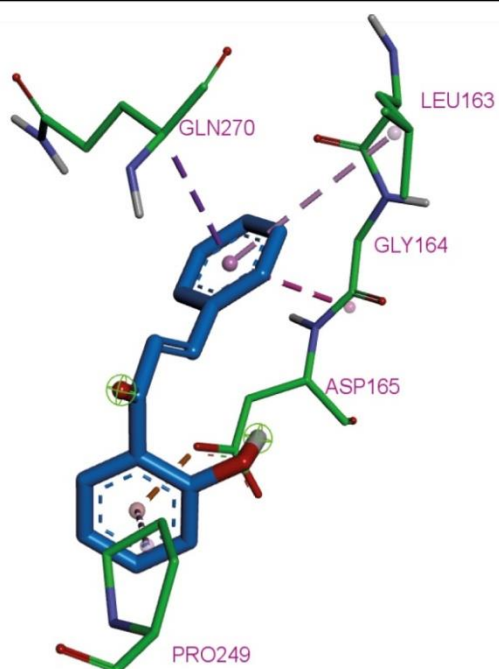
A



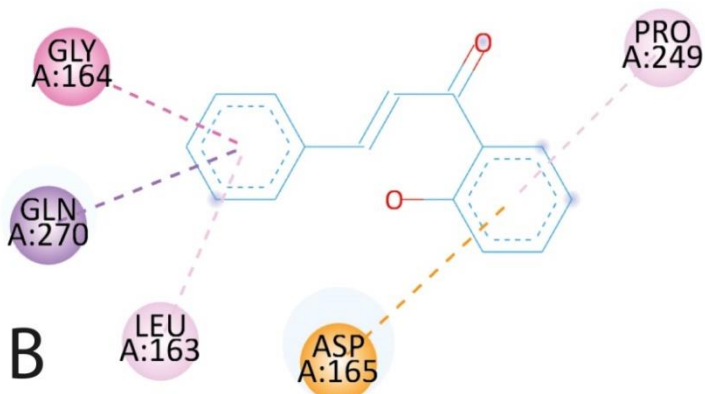
Interactions

Conventional Hydrogen Bond
Pi-Anion
Pi-Sulfur

Pi-Pi T-shaped
Amide-Pi Stacked
Pi-Alkyl



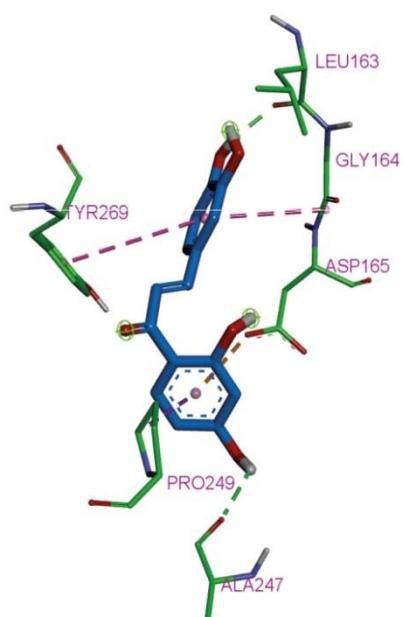
B



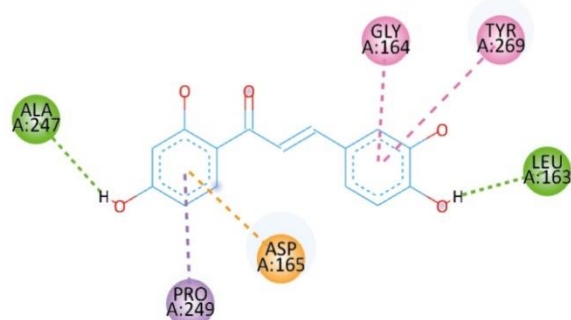
Interactions

Pi-Anion
Pi-Sigma

Amide-Pi Stacked
Pi-Alkyl



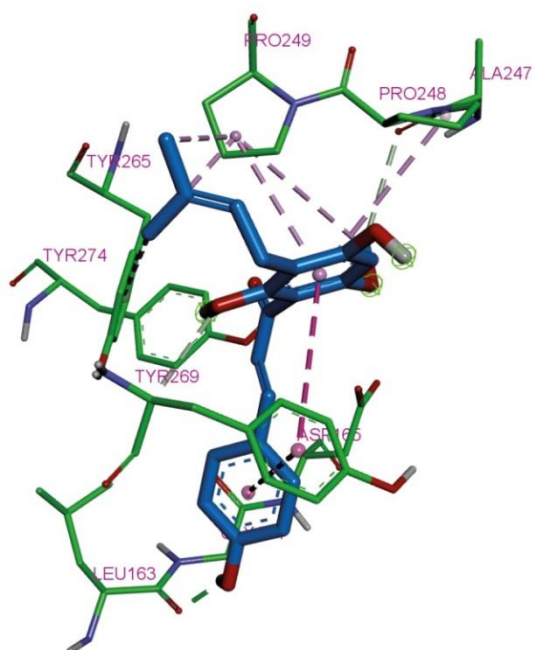
C



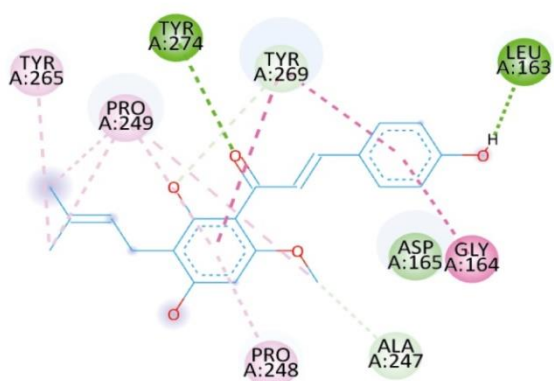
Interactions

Conventional Hydrogen Bond
Pi-Anion
Pi-Sigma

Pi-Pi T-shaped
Amide-Pi Stacked

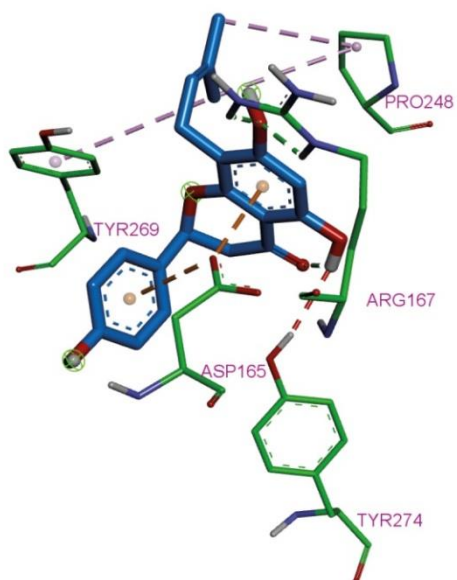


D

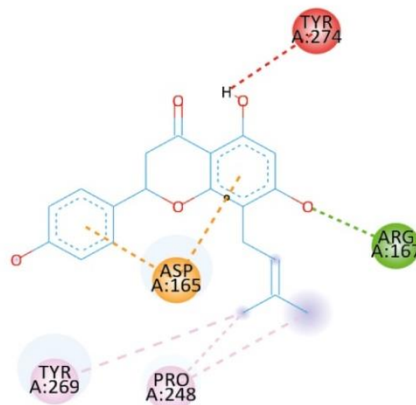


Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Pi T-shaped
- Amide-Pi Stacked
- Alkyl
- Pi-Alkyl

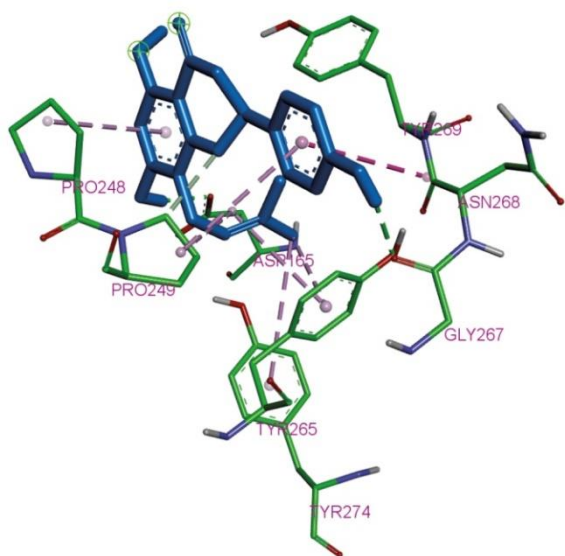


E

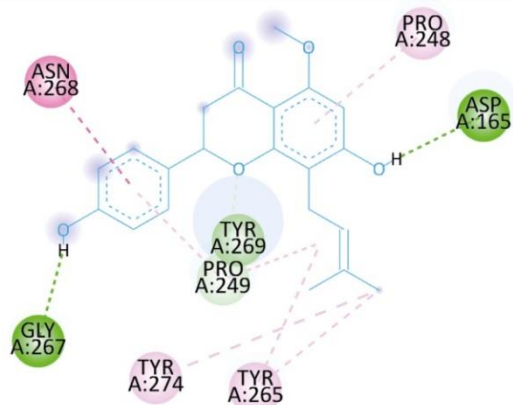


Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Unfavorable Donor-Donor
- Pi-Anion
- Alkyl
- Pi-Alkyl

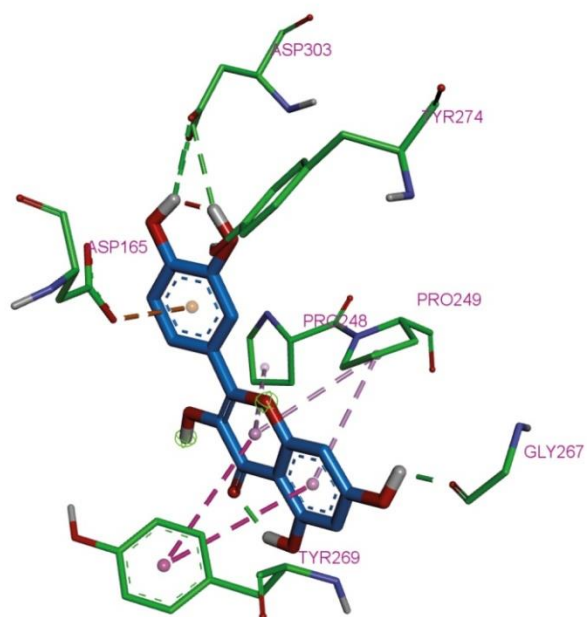


F

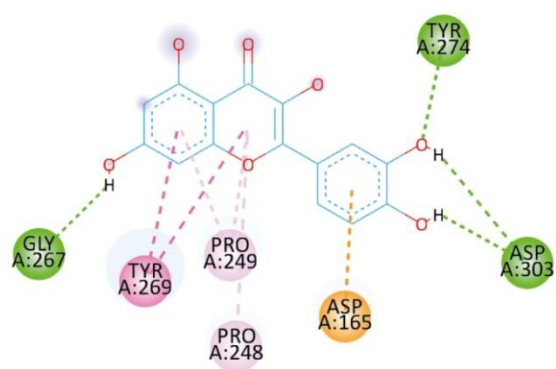


Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Amide-Pi Stacked
- Alkyl
- Pi-Alkyl



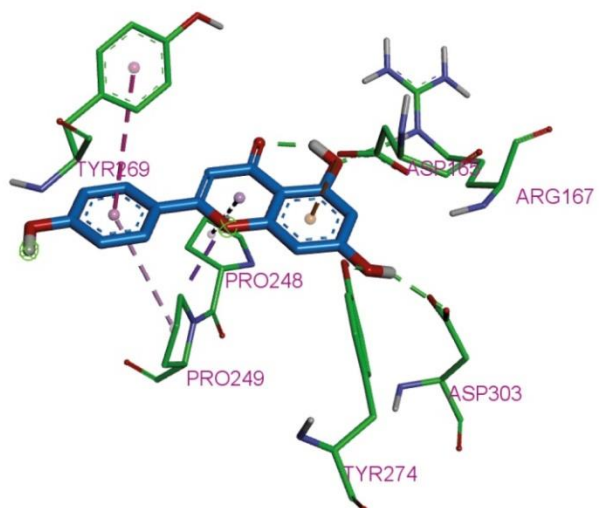
G



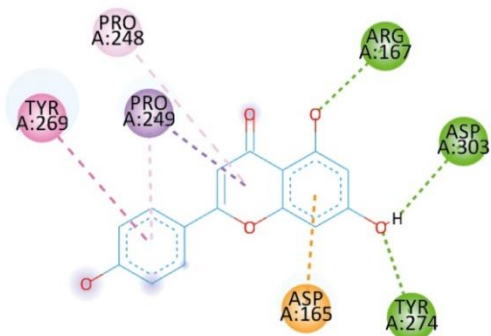
Interactions

Conventional Hydrogen Bond
Pi-Anion

Pi-Pi T-shaped
Pi-Alkyl



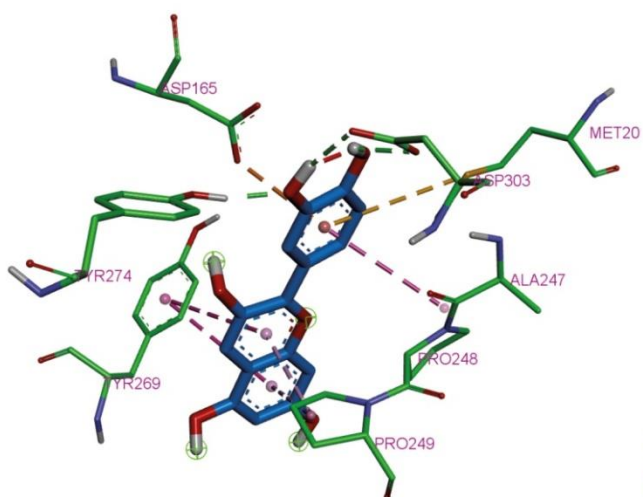
H



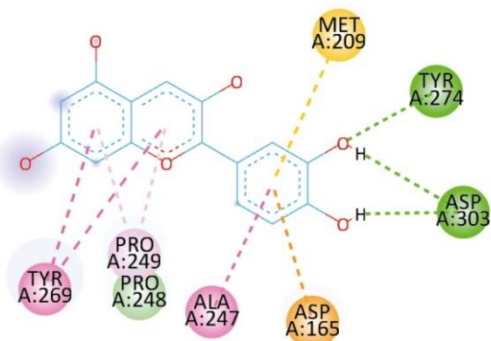
Interactions

Conventional Hydrogen Bond
Pi-Anion
Pi-Sigma

Pi-Pi T-shaped
Pi-Alkyl



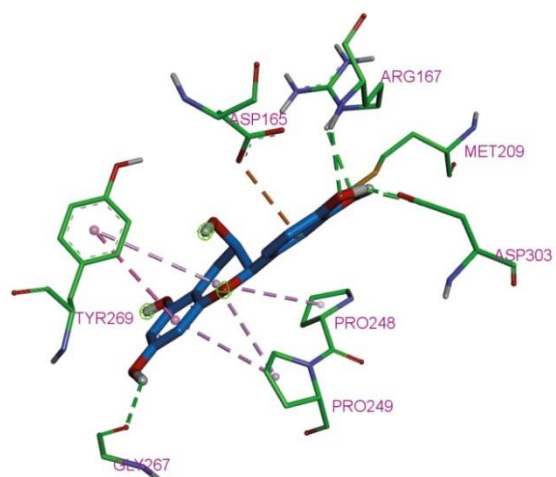
I



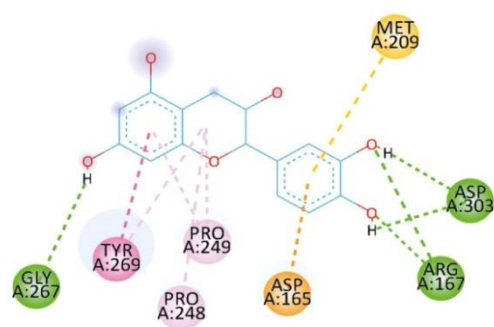
Interactions

van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Pi-Anion
Pi-Sulfur

Pi-Pi T-shaped
Amide-Pi Stacked
Pi-Alkyl



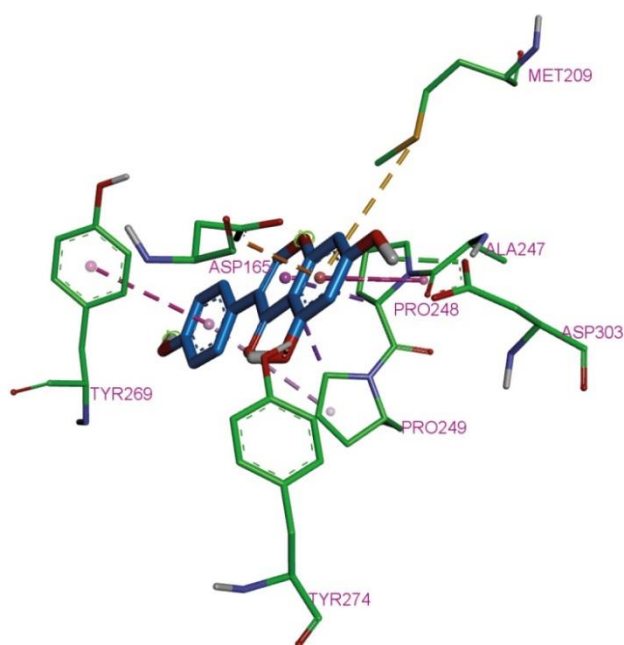
J



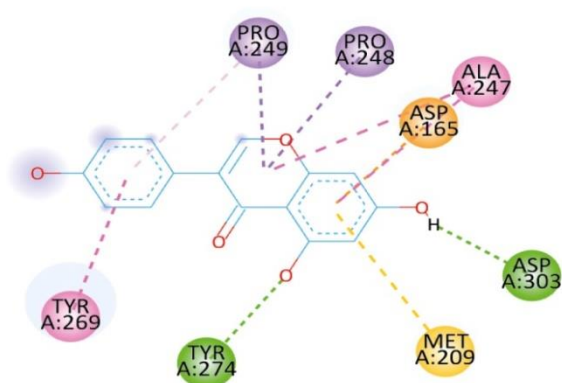
Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Anion
- Pi-Sulfur

- Pi-Pi T-shaped
- Alkyl
- Pi-Alkyl



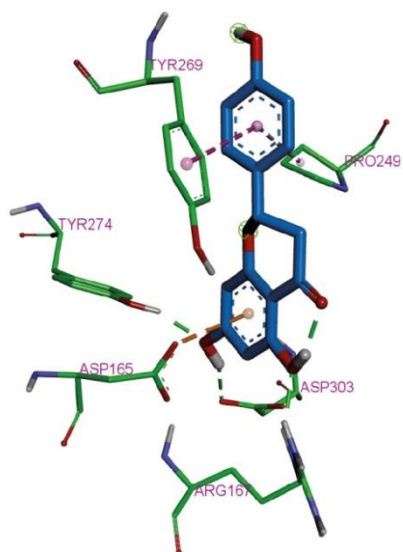
K



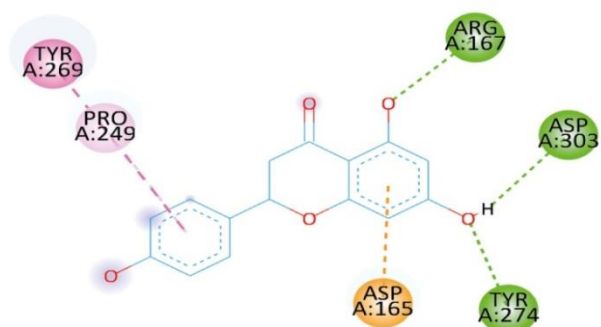
Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Anion
- Pi-Sigma
- Pi-Sulfur

- Pi-Pi T-shaped
- Amide-Pi Stacked
- Pi-Alkyl



L



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Anion

- Pi-Pi T-shaped
- Pi-Alkyl

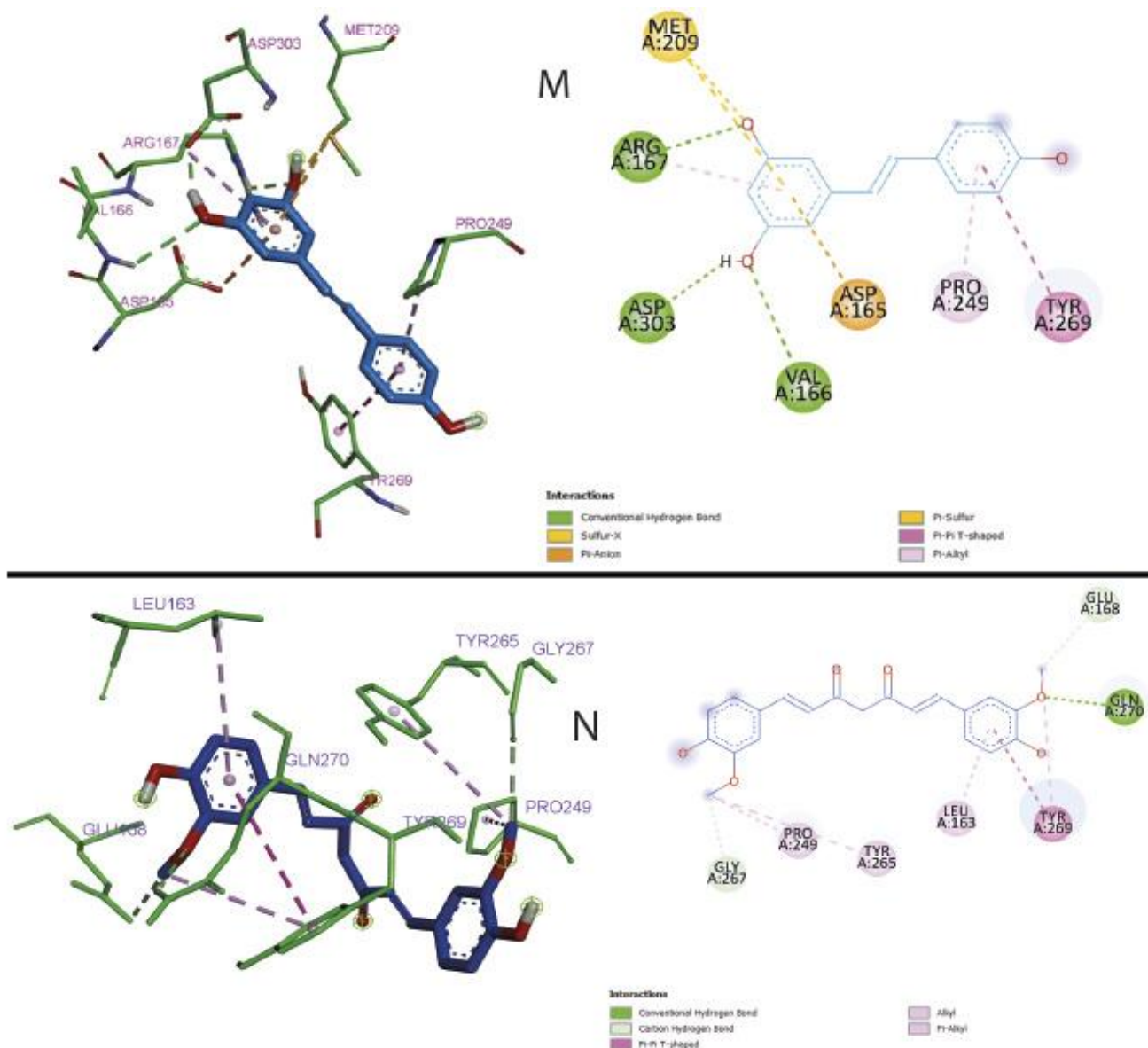


Рисунок 3.3 Розташування та конформація поліфенолів з мінімальною вільною енергією в активному центрі PLpro за результатами молекулярного докінгу.

A – халконарінгенін, **B** – 2-гідроксихалкон, **C** – Бутеїн, **D** – ксантохумол, **E** – ізоксантохумол, **F** – 8-пренілнарінгенін, **G** – кверцетин., **H** – апігенін, **I** – епікатехін, **J** – ціанідін, **K** – нарінгенін, **L** – гінестеїн, **M** – ресвератрол, **N** – куркумін.

В той же час, гідрофобні взаємодії, які, судячи з всього, мають критичну роль при зв'язуванні інгібітору GRL-0617, майже відсутні в моделі, що описує взаємодію халконів з активним центром ферменту. Так, молекула халконаренгеніну та бутеїну утворює один π - π Т-подібнізв'язок з Tyr269, а молекула 2-гідроксихалкону лише один π -алкільний зв'язок з Pro249 (Рис 3.3 А, В, С).

Серед досліджених пренільованих флавоноїдів найбільшу афінність до білку мав ксантохумол ($\Delta G = -6,57$ ккал/моль, $K_i = 15,2$ мкмоль/л), який подібно до GRL-0617 утворює π -алкільні зв'язки з залишками Pro248, Pro249 та π - π Т-подібні взаємодії з залишком Tyr269 (Рис 3.3 D). Залишки Pro249 та Tyr265 також утворюють алкіл-акільні зв'язки з гідрофобним ізопеніловим радикалом молекули ліганду. В утворенні комплексу з ксантохумолом також приймають участь водневі зв'язки, які утворюються між оксо-групою та гідроксо-групою ліганду та залишком Tyr274 і пептидною групою Leu163, відповідно.

На відміну від ксантохумолу, інші два представники цього класу поліфенолів – ізоксантохумол та 8-пренілнарінгенін мають циклізований на кисні тривуглецевий зв'язок між двома фенільними групами, з утворенням бензопіранового кільця, притаманного усім сполукам з класу флавоноїдів (див. табл. 2.1). Останнє призводить до зниження кількості обертальних ступенів свободи молекули, яка для ксантохумолу складає 9, а для ізоксантохумолу та 8-пренілнарінгеніну лише 6. Наслідком цього є зменшення числа можливих конформацій ліганду у кишені зв'язування білку та обмеження ефективності взаємодії з амінокислотними залишками у активному центрі. За результатами молекулярного докінгу енергія зв'язування ізоксантохумолу та 8-пренілнарінгеніну з білком була майже однаковою та складала $-6,31$ ккал/моль ($K_i = 23,8$ мкмоль/л). Основні взаємодії між білком та молекулами цих лігандів були обумовлені π -алкільними зв'язками між ізопреніловою групою та залишками Pro249, Pro248, Tyr265 та Tyr 274 (Рис 3.3 E, G).

В результаті молекулярного докінгу було встановлено, що найменшу енергію зв'язування серед представників різних класів флавоноїдів мають флаванон – нарінгенін ($\Delta G = -6,22$ ккал/моль, $K_i = 27,5$ мкмоль/л) та флавон – апігенін ($\Delta G = -5,96$ ккал/моль, $K_i = 43,0$ мкмоль/л). Відмінною рисою цих двох сполук є відсутність гідроксильної групи в 3-положенні С-кільця, що сприяє їх більшій гідофобності у порівнянні з іншими дослідженими флавоноїдами (див. табл. 2.1). Обидві сполуки утворюють три водневих зв'язка з залишками Arg167, Tyr274 та Asp303 та π -аніонний зв'язок з залишком Asp165 (Рис 3.3 H,

L). Серед гідрофобних взаємодій слід зазначити π -акільну взаємодію з Pro249 та π - π T-подібніз Tyr269. Цікаво, що нарінгенін є продуктом спонтанної ізомерізації халконаренгініну з утворенням бензопіренового кільця (див. табл. 2.1). Як видно з отриманих результатів, така ізомерізація призводить до зниження розрахункової константи інгібування майже у 5 разів (див. рис. 3.2).

Ресвератрол, представник класу стибленів, характеризується однією з найбільшою енергією зв'язування ($\Delta G = -5,44$ ккал/моль, $K_i = 102$ мкмоль/л), що робить його одним з найгірших кандидатів у потенційні інгібітори PLpro серед досліджених сполук. Комплекс білка з ресвератролом стабілізується за рахунок водневих зв'язків з залишками Arg167 та Asp303, π -аніонного зв'язку з залишком Asp165, а також гідрофобних π -акільних та π - π T-подібних взаємодій з Pro249 з Tyr269, відповідно (Рис. 3.3M).

Енергія зв'язування куркуміну з активним центром білка PLpro за результатами докінгу складала $-5,78$ ккал/моль ($K_i = 49,8$ мкмоль/л). Як і більшість досліджених сполук, у зв'язуванні куркуміну важливу роль відіграють гідрофобні взаємодії, а саме π -акільні з Pro248 та π - π T-подібні з Tyr269 (Рис. 3.3N).

ВИСНОВКИ

1. В результаті молекулярного докінгу представників різних класів рослинних поліфенолів було встановлено, що найбільшу афінність до активного центру папаїн-подібної протеїнази вірусу SARS-CoV-2 мають представники халконів та пренільованих флавоноїдів ($K_i=5,7-23,8$ ккал/моль).
2. Незначні зміни в структурі, наприклад наявність/відсутність полярних замісників, циклізація, суттєво впливають на енергію зв'язування та тип взаємодій з амінокислотними залишками в активному центрі вірусної папаїн-подібної протеїнази.
3. Для прояву високої інгібіторної активності критичними є гідрофобні взаємодії ліганду з залишками Pro249, Pro248, Tyr269, а також електростатичні взаємодії з залишком Asp165 в центрі зв'язування білку.
4. Сполуки з класу халконів та пренільованих флавоноїдів можуть бути використані у якості сполук-лідерів як потенційні зворотні інгітори папаїн-подібної протеїнази коронавірусу в експериментальних дослідженнях і, після оптимізації їх біологічної активності та фармакокінетики, стати основою для розробки нових противірусних препаратів.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, et al. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review.
2. Ge H, Wang X, Yuan X, et al. The epidemiology and clinical information about COVID-19. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020.
3. <https://www.who.int/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19>
4. Zhou Z, Qiu Y, Ge X. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Anim Dis*. 2021;1(1):5. doi: 10.1186/s44149-021-00005-9
5. Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. 2021.
6. World Health Organization Why Is COVID-19 Data Being Presented as Weekly Statistics? [Online]. World Health Organization. 2024. Available online: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?m49=156&n=c>
7. Comprehensive Review of COVID-19: Epidemiology, Pathogenesis, Advancement in Diagnostic and Detection Techniques, and Post-Pandemic Treatment Strategies. Yiu-Sing C. *Int J Mol Sci*. 2024 Jul 26;25(15):8155. doi: 10.3390/ijms25158155.
8. Greenhalgh T., Knight M., A'court C., Buxton M., Husain L. Management of post-acute COVID-19 in primary care. *BMJ*. 2020;370:m3026. doi: 10.1136/bmj.m3026.
9. Han Q., Zheng B., Daines L., Sheikh A. Long-term sequelae of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of one-year follow-up studies on post-COVID symptoms. *Pathogens*. 2022;11:269. doi: 10.3390/pathogens11020269.
10. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020.
11. Kumar S, Nyodu R, Maurya VK, et al. Morphology, genome organization, replication, and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In: Saxena SK, editor. *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and therapeutics*. Singapore: Springer; 2020
12. Bai Z., Cao Y., Liu W., Li J. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. *Viruses*. 2021.
13. Kim D., Lee J.-Y., Yang J.-S., Kim J. W., Kim V. N., et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell*. 2020.
14. Interactions of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (RBD): a structural perspective. Subhomoi Borkotoky, Debajit Dey, Zaved Hazarika. *Mol Biol Rep*. 2022 Dec 23;50(3):2713–2721. doi: 10.1007/s11033-022-08193-4

15. Walls, A. C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. 2020.
16. Lu, X., Pan, J., Tao, J. & Guo, D. SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN- β response by targeting initial step of IFN- β induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. 2011.
17. Mu, J. et al. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. *Sci. China Life Sci.* 2020.
18. Chang, C. K., Hou, M. H., Chang, C. F., Hsiao, C. D. & Huang, T. H. The SARS coronavirus nucleocapsid protein—forms and functions. *Antivir. Res.* 2014.
19. Alharbi S. N., Alrefaei A. F. Comparison of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) M protein with its counterparts of SARS-CoV and MERS-CoV species. *J. King Saud. Univ. Sci.* 2021.
20. Schoeman D., Fielding B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Viol. J.* 2019.
21. Weiss, S. R. & Navas-Martin, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. 2005.
22. Nieto-Torres, J. L. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. 2015.
23. Mandala, V. S. et al. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. 2020.
24. Maclachlan, N. J., and Dubovi, E. J. (2016) *Fenner's Veterinary Virology*, Academic press.
25. Redondo N., Zaldívar-López S., Garrido J. J., Montoya M. SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns. *Frontiers in Immunology.* 2021.
26. Báez-Santos Y. M., St John S. E., Mesecar A. D. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral Res.* 2015.
27. Angelini M. M., Akhlaghpour M., Neuman B. W., Buchmeier M. J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio.* 2013.
28. Wolff G., Melia C. E., Snijder E. J., Bárcena M. Double-membrane vesicles as platforms for viral replication. *Trends Microbiol.* 2020.
29. Medina-Enríquez M. M., Lopez-León S., Carlos-Escalante J. A., Aponte-Torres Z., Cuapio A., et al. ACE2: the molecular doorway to SARS-CoV-2. *Cell Biosci.* 2020.
30. D. Shin, R. Mukherjee, D. Grewe, D. Bojkova, K. Baek, A. Bhattacharya, L. Schulz, M. Widera, A. R. Mehdipour, G. Tascher, P. P. Geurink, A. Wilhelm, G. J.

- van der Heden van Noort, H. Ovaa, S. Müller, K.-P. Knobeloch, K. Rajalingam, B. A. Schulman, J. Cinatl, G. Hummer, S. Ciesek, I. Dikic, *Nature*. 2020.
31. Z. Lou, Z. Rao, *Annu. Rev. Biochem.* 2022.
 32. A. Zhukova, L. Blassel, F. Lemoine, M. Morel, J. Voznica, O. Gascuel, C. R. Biol. 2021.
 33. S. Temmam, K. Vongphayloth, E. Baquero, S. Munier, M. Bonomi, B. Regnault, B. Douangboubpha, Y. Karami, D. Chrétien, D. Sanamxay, V. Xayaphet, P. Paphaphanh, V. Lacoste, S. Somlor, K. Lakeomany, N. Phommavanh, P. Pérot, O. Dehan, F. Amara, F. Donati, T. Bigot, M. Nilges, F. A. Rey, S. van der Werf, P. T. Brey, M. Eloit, *Nature*. 2022.
 34. P. A. Rota, M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Peñaranda, B. Bankamp, K. Maher, M.-H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. T. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Günther, A. D. M. E. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson, W. J. Bellini, *Science*. 2003.
 35. Y. K. Bosken, T. Cholko, Y.-C. Lou, K.-P. Wu, C.-E. A. Chang, *Front. Mol. Biosci.* 2020.
 36. N. Barretto, D. Jukneliene, K. Ratia, Z. Chen, A. D. Mesecar, S. C. Baker, *J. Virol.* 2005.
 37. A. Narayanan, S. A. Toner, J. Jose, *Biochem. Soc. Trans.* 2022.
 38. T. E. T. Mevissen, D. Komander, *Annu. Rev. Biochem.* 2017.
 39. J. Lei, Y. Kusov, R. Hilgenfeld, *Antivir. Res.* 2018.
 40. S. van Boheemen, M. de Graaf, C. Lauber, T. M. Bestebroer, V. S. Raj, A. M. Zaki, A. D. M. E. Osterhaus, B. L. Haagmans, A. E. Gorbalenya, E. J. Snijder, R. A. M. Fouchier, M. J. Buchmeier, *mBio*. 2012.
 41. Y. M. Báez-Santos, S. J. Barraza, M. W. Wilson, M. P. Agius, A. M. Mielech, N. M. Davis, S. C. Baker, S. D. Larsen, A. D. Mesecar, *J. Med. Chem.* 2014.
 42. E. Hartenian, D. Nandakumar, A. Lari, M. Ly, J. M. Tucker, B. A. Glaunsinger, *J. Biol. Chem.* 2020.
 43. M. Simeoni, T. Cavinato, D. Rodriguez, D. Gatfield, *Commun. Biol.* 2021.
 44. R. K. Suryawanshi, R. Koganti, A. Agelidis, C. D. Patil, D. Shukla, *Trends Microbiol.* 2021
 45. P. C. Y. Woo, Y. Huang, S. K. P. Lau, K.-Y. Yuen, *Viruses*. 2010.
 46. I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967.
 47. W. Rut, Z. Lv, M. Zmudzinski, S. Patchett, D. Nayak, S. J. Snipas, F. El Oualid, T. T. Huang, M. Bekes, M. Drag, S. K. Olsen, *Sci. Adv.* 2020.

48. SARS-CoV-2 papain-like protease inhibits ISGylation of the viral nucleocapsid protein to evade host anti-viral immunity / Rhamadiani A.F. et al. // *J Virol*. 2024 Sep 17;98(9):e0085524. doi: 10.1128/jvi.00855-24
49. Z. Fu, B. Huang, J. Tang, S. Liu, M. Liu, Y. Ye, Z. Liu, Y. Xiong, W. Zhu, D. Cao, J. Li, X. Niu, H. Zhou, Y. J. Zhao, G. Zhang, H. Huang, *Nat. Commun.* 2021.
50. Lecour S, Lamont KT. Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini Rev Med Chem.* (2011) 11:1191–9. 10.2174/13895575111091191
51. Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalber A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur J Clin Nutr.* (2010) 64:S112–20. 10.
52. Singh A, Holvoet S, Mercenier A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clin Exp Allergy* (2011) 41:1346–59.
53. Crowe KM, Francis C. Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. *J Acad Nutr Diet.* (2013) 113:1096–103.
54. Williamson G, Holst B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *Brit J Nutr.* (2008) 99:S55–8. 10.1017.
55. Araújo J.R., Gonçalves P., Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr. Res.* 2011;31:77–87. doi: 10.1016/j.nutres.2011.01.006.
56. Dragovicuzelac, V.; Levaj, B.; Mrkic, V.; Bursac, D.; Boras, M. The Content of Polyphenols and Carotenoids in Three Apricot Cultivars Depending on Stage of Maturity and Geographical Region. *Food Chemistry* 2007, 102, 966–975.
57. Nileeka Balasuriya BW, Vasantha Rupasinghe HP (2011) Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *FFHD* 1:172.
58. Wang T-Y, Li Q, Bi K-S (2018) Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm Sci* 13:12–23.
59. Lewandowska H., Kalinowska M., Lewandowski W., Stępkowski T.M., Brzóska K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *J. Nutr. Biochem.* 2015;32:1–19. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.11.006.

60. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* 2007;18:427–442. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.11.004.
61. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;79:727–747. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
62. Dai J., Mumper J.R. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules.* 2010;15:7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313.
63. Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005;45:287–306. doi: 10.1080/1040869059096.
64. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 5:e47.
65. D'Amelia V, Aversano R, Chiaiese P, Carputo D (2018) The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochem Rev* 17:611–625.
66. LeJeune TM, Tsui HY, Parsons LB, Miller GE, Whitted C, Lynch KE, Ramsauer RE, Patel JU, Wyatt JE, Street DS, Adams CB, McPherson B, Tsui HM, Evans JA, Livesay C, Torrenegra RD, Palau VE (2015) Mechanism of action of two flavone isomers targeting cancer cells with varying cell differentiation status. *PLoS ONE* 10:e0142928.
67. Abreu AC, Coqueiro A, Sultan AR, Lemmens N, Kim HK, Verpoorte R, van Wamel WJB, Simões M, Choi YH (2017) Looking to nature for a new concept in antimicrobial treatments: isoflavonoids from *Cytisus striatus* as antibiotic adjuvants against MRSA. *Sci Rep* 7:3777.
68. Solnier J, Martin L, Bhakta S, Bucar F (2020) Flavonoids as novel efflux pump inhibitors and antimicrobials against both environmental and pathogenic intracellular mycobacterial species. *Molecules.*

- 69.Catarino MD, Talhi O, Rabahi A, Silva AMS, Cardoso SM (2016) The antiinflammatory potential of flavonoids. *Stud Nat Prod Chem* 48:65–99.
- 70.Chen D., Wan S.B., Yang H., Yuan J., Chan T.H., Dou Q.P. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Adv. Clin. Chem.* 2011;53:155–177. doi: 10.1016/b978-0-12-385855-9.00007-2.
- 71.Fantini M., Benvenuto M., Masuelli L., Frajese G.V., Tresoldi I., Modesti A., Bei R. In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16:9236–9282. doi: 10.3390/ijms16059236.
- 72.Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008;52:507–526. doi: 10.1002/mnfr.200700326.
- 73.Lee K.W., Lee H.J. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors.* 2006;26:105–121. doi: 10.1002/biof.5520260202.
- 74.Kampa M., Nifli A.-P., Notas G., Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2007;159:79–113. doi: 10.1007/112_2006_0702.
- 75.Duthie G.G., Duthie S.J., Kyle J.A.M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: Implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.* 2000;13:79–106. doi: 10.1079/095442200108729016.
- 76.Park E.-J., Pezzuto J.M. The Pharmacology of Resveratrol in Animals and Humans. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015;1852:1071–113. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.01.014.
- 77.Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;81(Suppl. S1):230S–242S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.230S.
- 78.Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* 1998;56:317–333. doi: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x.

79. Tripoli E., La Guardia M., Giammanco S., di Majo D., Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* 2007;104:466–479. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.054.
80. Weichselbaum E., Buttriss J.L. Polyphenols in the diet. *Nutr. Bull.* 2010;35:157–164. doi: 10.1111/j.1467-3010.2010.01821.x.
81. Turrini E., Ferruzzi L., Fimognari C. Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015;2015:938475. doi: 10.1155/2015/938475.
82. Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *Am. J. Med.* 2002;113:71S–88S. doi: 10.1016/S0002-9343(01)00995-0.
83. Lambert J.D., Hong J., Yang G., Liao J., Yang C.S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;81(Suppl. S1):284S–291S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.284S.
84. Su Y. Ph.D. Thesis. University of Arkansas for Medical Sciences; Little Rock, AR, USA: Dec 4, 2008. Molecular Regulation of Breast Cancer Susceptibility by Dietary Factors.
85. Asensi M., Ortega A., Mena S., Feddi F., Estrela J.M. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2011;48:197–216. doi: 10.3109/10408363.2011.631268.
86. Konczak I., Zhang W. Anthocyanins—More Than Nature’s Colours. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004;5:239–240. doi: 10.1155/S1110724304407013.
87. Lila M.A. Anthocyanins and Human Health: An in Vitro Investigative Approach. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004;5:306–313. doi: 10.1155/S111072430440401X.
88. Dai J., Mumper J.R. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules.* 2010;15:7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313.

89. Yang Y, Islam MS, Wang J, Li Y, Chen X (2020) Traditional chinese medicine in the treatment of patients infected with 2019-new coronavirus (SARS-CoV-2): a review and perspective. *Int J Biol Sci* 16:1708–1717.
90. Guerrero L, Castillo J, Quinones M, Garcia-Vallve S, Arola L, Pujadas G, Muguerza B (2012) Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *PLoS ONE* 7:e49493.
91. Actis-Goretta L, Ottaviani JJ, Fraga CG (2006) Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem* 54:229–234.
92. Lim H, Min DS, Park H, Kim HP (2018) Flavonoids interfere with NLRP3 inflammasome activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 355:93–102.
93. Chen I-Y, Moriyama M, Chang M-F, Ichinohe T (2019) Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3a activates the NLRP3 inflammasome. *Front Microbiol* 10:50.
94. Shah A (2020) Novel coronavirus-induced NLRP3 inflammasome activation: a potential drug target in the treatment of COVID-19.
95. Yi, L.; Li, Z.; Yuan, K.; Qu, X.; Chen, J.; Wang, G.; Zhang, H.; Luo, H.; Zhu, L.; Jiang, P.; et al. Small Molecules Blocking the Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus into Host Cells. *J. Virol.* **2004**, 78, 11334–11339.
96. Tallei, T.E.; Tumilaar, S.G.; Niode, N.J.; Kepel, B.J.; Idroes, R.; Effendi, Y.; Sakib, S.A.; Emran, T. Bin Potential of Plant Bioactive Compounds as SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) and Spike (S) Glycoprotein Inhibitors: A Molecular Docking Study. *Scientifica* **2020**, 2020, 1–18.
97. Paraiso, I.L.; Revel, J.S.; Stevens, J.F. Potential use of polyphenols in the battle against COVID-19. *Curr. Opin. Food Sci.* **2020**, 32, 149.
98. Eskier, D.; Karakulah, G.; Suner, A.; Oktay, Y. RdRp mutations are associated with SARS-CoV-2 genome evolution. *PeerJ* **2020**, 8, e9587.
99. El-Missiry, M.A.; Fekri, A.; Kesar, L.A.; Othman, A.I. Polyphenols are potential nutritional adjuvants for targeting COVID-19. *Phyther. Res.* **2021**, 35, 2879–2889.

100. Lin, S.C.; Ho, C.T.; Chuo, W.H.; Li, S.; Wang, T.T.; Lin, C.C. Effective inhibition of MERS-CoV infection by resveratrol. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 1–10.
101. Utomo, R.Y.; Meiyanto, E. Revealing the Potency of Citrus and Galangal Constituents to Halt SARS-CoV-2 Infection. *Preprints* **2020**, 2020030214.
102. Srinivas NR (2009) Structurally modified 'dietary flavonoids': are these viable drug candidates for chemoprevention? *Curr Clin Pharmacol* 4:67–70.
103. Ajazuddin SS (2010) Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia* 81:680–689.
104. Zhao J, Yang J, Xie Y (2019) Improvement strategies for the oral bioavailability of poorly water-soluble flavonoids: an overview. *Int J Pharm* 570:118642.
105. Exploring noncovalent protease inhibitors for the treatment of SARS and SARS-like coronaviruses / Freitas B. T. et al. // *ACS Infect Dis.* 2022 Feb 24;8(3):596–611.doi: [10.1021/acsinfecdis.1c00631](https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00631).