

## بررسی اثربخشی ترکیب‌های گیاهی در دسترس به‌عنوان مهارکننده پروتئاز اصلی SARS-CoV-2

حامد شهریارپور<sup>1</sup>، حسین نادری‌منش<sup>2</sup>، سید شهریار عرب<sup>3\*</sup>، نجمه دهقان بنادکی<sup>4</sup>

- 1- کارشناسی ارشد بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
 2- دکتری تخصصی بیوفیزیک، استاد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
 3- دکتری تخصصی بیوفیزیک، دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
 4- دکتری تخصصی بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: sh.arab@modares.ac.ir

تلفن: 02182883494

پذیرش: 1402/12/7

دریافت: 1402/1/28

### چکیده

همه‌گیری کووید-19 یک بحران بهداشتی جهانی ایجاد کرده است و توسعه درمان‌های مؤثر برای جلوگیری از شیوع این بیماری و نجات جان میلیون‌ها نفر ضروری است. یکی از پروتئین‌های کلیدی درگیر در چرخه تکثیر SARS-CoV-2، ویروسی که باعث کووید-19 می‌شود، آنزیم پروتئاز اصلی، 3CL<sup>pro</sup> است. این آنزیم به دلیل اهمیت بالایی که دارد، موضوع پژوهش‌های مولکولی، ساختاری و بالینی است و تلاش‌هایی برای تولید داروهایی که می‌توانند فعالیت آن را مهار کنند، انجام شده است. یکی از این داروها ترکیب شیمیایی N3 است که اثر مهار بالایی در برابر 3CL<sup>pro</sup> دارد. هرچند از دیدگاه طب سنتی، کمتر به این موضوع پرداخته شده است، اما در این پژوهش مطالعه‌های شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تمام اتم (MD) برای بررسی قابلیت 21 ترکیب بالقوه گیاهی بر مهار آنزیم 3CL<sup>pro</sup> انجام شده است. سه ترکیب با بالاترین احتمال مهارکنندگی از نتایج داکینگ مولکولی انتخاب شدند و تحت 100ns شبیه‌سازی MD قرار گرفتند تا پایداری و ویژگی‌های ساختاری - دینامیکی - انرژی آنها بررسی شود. علاوه بر پایداری کمپلکس‌ها، نتایج حاصل از شبیه‌سازی نشان داد که هر سه ترکیب انتخابی ما ویژگی‌های ساختاری - دینامیکی قابل مقایسه با N3 را به 3CL<sup>pro</sup> القا می‌کنند. بنابراین انتظار می‌رود که توانایی مهارکنندگی مشابهی در برابر این آنزیم داشته باشند. ترکیب شماره 5 مطلوب‌ترین انرژی اتصال را داشت و به‌عنوان بهترین جایگزین گیاهی برای N3 پیشنهاد شد. نتایج پژوهش ما می‌تواند به‌طور مستقیم برای طراحی مطالعه‌های تجربی با هدف مهار آنزیم 3CL<sup>pro</sup> استفاده شود. در نتیجه، هزینه زمانی - مالی چنین مطالعاتی را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: SARS-CoV-2، پروتئاز اصلی، مهارکننده، داکینگ مولکولی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی.

## 1- مقدمه

از زمان شیوع بیماری کروناویروس جدید (COVID-19) در دسامبر 2019، دنیا با یک تهدید جدی و چالش برانگیز روبه‌رو بوده است [1]. تا 30 دسامبر سال 2022 تقریباً 664 میلیون مورد بیمار گزارش شده و بیش از 6,7 میلیون نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست داده‌اند [2]. عامل ایجادکننده این بیماری همه‌گیر یک ویروس RNA دار تک‌ رشته‌ای سنس مثبت<sup>1</sup> (+ssRNA) است که به دلیل شباهت ژنومی آن به SARS-CoV با نام SARS-CoV-2 (سندرم حاد تنفسی شدید کرونا 2) شناخته می‌شود [3]. درحالی‌که پیشرفت‌های چشمگیری در حیطه تولید درمان‌های قبل از عفونت<sup>2</sup> مانند واکسن‌ها حاصل شده است، کشف داروهای جدید بسیار اهمیت دارد [4]. هرچند تا به امروز، تعدادی مولکول با منشأ زیستی و غیرزیستی با خاصیت ضد ویروس توسعه یافته و وارد چرخه درمان شده‌اند، اما در مواردی مطالعه‌های بالینی میزان اثربخشی آنها را با چالش روبه‌رو کرده است، برای مثال داروهای تجاری مانند رمدسیویر<sup>3</sup> [5] و هیدروکسی کلروکین<sup>4</sup> [6] در آغاز به‌عنوان داروهای ضد ویروسی برای درمان COVID-19 معرفی شدند و هزینه بسیاری را به بیماران تحمیل کردند، اما آزمایش‌های بالینی نشان داد که آنها بی‌اثر هستند یا سطوح غیرقابل‌قبولی از عوارض جانبی نشان می‌دهند [7؛ 8]. بنابراین جستجو برای کشف داروهای درمانی جدید با اثربخشی مطلوب ضد ویروس و مشخصه ایمنی مناسب همچنان ادامه دارد [9]. تجربه COVID-19 به جامعه علمی نشان داد که در چالش‌های به این شکل، سرعت توسعه دارو، یافت و اعتبارسنجی ترکیب‌های داروهای بالقوه اهمیت بسیاری دارد. بنابراین طراحی دارو به کمک رایانه (CADD)<sup>5</sup> که قابلیت کشف، طراحی و بهینه‌سازی ترکیب‌های شبه‌دارو

را با صرفه‌جویی بسیار در هزینه مالی و زمانی، در مقیاس میلیونی فراهم می‌کند، اهمیت دارد [10]. هرچند CADD نیز نیازمند ساختارهای سه‌بعدی با کیفیت بالا از پروتئین‌های مهم هدف است [11]. بنابراین تلاش جامعه علمی بر تعیین ساختار پروتئین‌های مهم اثرگذار در چرخه تکثیر ویروس SARS-CoV-2 و تعیین ساختار آنها متمرکز شد. ساختارهای سه‌بعدی پروتئین‌های مهم SARS-CoV-2 مثل Spike، RdRp، و PL<sup>pro</sup> در سال‌های پیشین تعیین شده است [11].

یکی از امیدوارکننده‌ترین کاندیدای پروتئینی برای طراحی داروهای درمانی COVID-19، آنزیم پروتئاز اصلی<sup>6</sup> SARS-CoV-2 که پروتئاز شبه 3-کیموتریپسین<sup>7</sup> نیز نامیده می‌شود، است [12]. ساختار آن در سال 2020 با روش کریستالوگرافی اشعه ایکس تعیین شده است [13]. نقش این پروتئین برای فرایند پروتئولیز (که یک مرحله ضروری برای تکثیر RNA ویروسی به شمار می‌آید) حیاتی است [14]. این آنزیم پلی‌پروتئین ویروسی را هیدرولیز می‌کند و بیش از یازده محل برش را برای تولید پروتئین‌های غیرساختاری ویروس تشخیص می‌دهد. بنابراین نقش اساسی در تکثیر ویروسی و بلوغ پروتئین‌های غیرساختاری ایفا می‌کند [15]. وجود داشتن همولوگ انسانی 3CL<sup>pro</sup>، این پروتئین را به یکی از جذاب‌ترین اهداف دارویی تبدیل می‌کند. علاوه بر آن، 3CL<sup>pro</sup> در بین کروناویروس‌ها بسیار محافظت شده است [16].

آنزیم 3CL<sup>pro</sup> ویروس SARS-CoV-2، یک سیستمین پروتئاز است و از دمین I شامل باقیمانده‌های محدوده 10-99، دمین II محدوده 100-192 و درنهایت دمین III، محدوده 198-303 تشکیل شده است. بخش انتهای C متعلق به دمین III بوده و بخش انتهای N در دمین I قرار دارد. جایگاه فعال آنزیم نیز بین دمین‌های II و I است. در این محل باقیمانده‌های Cys-145 و His-41 کاتالیزوری حضور

1 Positive-Sense  
2 Pre-infection treatments  
3 Remdesivir  
4 Hydroxychloroquine  
5 Computer-Aided Drug Design

6 Main Protease (Mpro)  
7 3-chymotrypsin-like proteases (3CLpro)

برابر پروتئاز اصلی SARS-CoV-2 از خود فعالیت مهارکنندگی قوی نشان می‌دهند [38؛ 39].

نقش طب سنتی نیز به شکل اکید در درمان کوید 19 در مقاله‌ها گزارش شده است [40]. در واقع، گیاهان دارویی منبع مهمی از مولکول‌ها با خواص دارویی مختلف از جمله خواص ضد ویروسی به شمار می‌آیند [41] که می‌توانند برای مقابله با COVID-19 استفاده شوند. گیاهان دارویی به‌ویژه آنهایی که در طب سنتی به کار می‌روند، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند، زیرا شامل ترکیب‌های زیست‌فعال هستند که می‌توانند به‌عنوان داروی با حداقل عوارض جانبی فراوری شوند [42]. برای مثال الاجیک اسید<sup>13</sup> یک پلی‌فنول موجود در میوه‌ها و سبزیجات است که پتانسیل مهار 3CL<sup>pro</sup> از خود نشان داده است [26]. ترکیب‌های C1 و C2 موجود در زردچوبه نیز در مقایسه با ترکیب‌های مرجع شیکونین<sup>14</sup> و لوپیناویر<sup>15</sup> یک مهارکننده 3CL<sup>pro</sup> استاندارد نشان دادند [28]. غربال‌گری مجازی ترکیب‌های گیاهی ضد ویروسی نشان داد که بوندوسلپین<sup>16</sup> D پتانسیل مهارکنندگی گسترده‌ای بر پروتئاز اصلی SARS-CoV و MERS-CoV دارد [29]. یک مطالعه غربال‌گری مجازی روی ترکیب‌های گیاهی نشان داد که آمتوفلاون<sup>17</sup> موجود در گیاهان از جمله جینکو بیلوبا<sup>18</sup> خاصیت ضد ویروسی بالایی دارد [43]. مطالعه داکینگ مولکولی<sup>19</sup> و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی<sup>20</sup> پلی‌فنول‌های چای سبز به‌عنوان مهارکننده‌های 3CL<sup>pro</sup> نشان دادند که اپی‌گالوکاتچین گالات<sup>21</sup>، اپی‌کاتچینگالات و گالوکاتچین-3-گالات پتانسیل مهار این آنزیم را دارند [44]. بایکالئین، فلاونوئید موجود در ریشه گیاه بشقابی<sup>22</sup> است که مطالعه‌های

دارند که به‌طور مستقیم در واکنش شکست پیوند پپتیدی نقش ایفا می‌کنند. در جایگاه فعال 3CL<sup>pro</sup> گروه تیول سیستئین به‌عنوان نوکلئوفیل و باقیمانده هیستیدین به‌عنوان دهنده پروتون عمل می‌کند [17؛ 18]. قابل توجه است که پروتئاز 3CL<sup>pro</sup> به‌صورت دایمر در محلول‌های آبی و کریستال‌ها وجود دارد. در این دایمر، دمین III از یک پروتئاز با دمین III از پروتئاز دیگر در تعامل است [19].

طراحی ترکیب‌های شبه‌دارو مانند مهارکننده‌های غیرکووالانسی چون ML300 [20]، مهارکننده‌های پپتیدومیمتیک مثل تلاپرویر<sup>8</sup> [21]، پپتیدهای هیدرولیزشده از سبوس برنج مثل AVP4 [22] و D-تتراپتیدها [23]، بازکاربرد دارویی<sup>9</sup> و غربال‌گری مجازی ترکیب‌های طبیعی نمونه‌ای از راهبردهای استفاده‌شده برای کشف مولکول‌های کوچک بر پروتئاز اصلی SARS-CoV-2 است [24-26]. در این راستا، غربال‌گری مجازی یک رویکرد محاسباتی مؤثر و قابل اعتماد است که برای شناسایی سریع ترکیب‌های زیست‌فعال<sup>10</sup> بر یک هدف مورد علاقه مفید است [27]. بنابراین بسیاری از مطالعه‌های *in silico* شیوه‌نامه‌های غربال‌گری مجازی را به‌عنوان گام اولیه برای شناسایی مهارکننده‌های بالقوه 3CL<sup>pro</sup> به‌کار برده‌اند [28-31] که برخی از آنها به‌صورت تجربی تأیید شده‌اند [32-35]. با استفاده از بستر طراحی دارو براساس ساختار، غربال‌گری مجازی دارو و غربال‌گری با توان بالا، پیش‌تر چندین ترکیب دارویی از جمله اِسلن<sup>11</sup> و کارموفور<sup>12</sup> (که مهارکننده‌های قوی پروتئاز اصلی SARS-CoV-2 بودند) کشف شدند [36؛ 37]. همچنین با توجه به شباهت ژنومی و ساختاری بین SARS-CoV و SARS-CoV-2 نشان داده شد که چندین مهارکننده مانند N3 و PF-00835231 (که به‌طور بالقوه بر پروتئاز اصلی SARS-CoV طراحی شده‌اند) در

13 Ellagic acid  
14 Shikonin  
15 Lopinavir  
16 Bonducellpin D  
17 Amentoflavone  
18 Ginkgo biloba  
19 Molecular Docking  
20 Molecular Dynamics Simulation  
21 Epigallocatechin gallate  
22 Scutellaria baicalensis

8 Telaprevir  
9 Drug Repositioning  
10 Bioactive  
11 Ebselen  
12 Carmofur

اصلی SARS-CoV-2 است. در این پژوهش به کمک داکینگ مولکولی ترکیب‌های مختلف گیاهی از نظر قدرت اتصال و نحوه اتصال به پروتئاز 3CL<sup>PRO</sup> بررسی شدند و سه ترکیب (که بهترین نتایج را داشتند) برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انتخاب شدند. سه ترکیب به همراه ترکیب مرجع N3 به وسیله ابزارهای دینامیک مولکولی بررسی شدند و ساختارهای نهایی از نظر پایداری و سطوح مختلف انرژی مطالعه شدند. بررسی‌های نهایی منجر به معرفی بهترین ترکیب از گیاه دارچین با خاصیت مهارکنندگی بالاتر، از بین ترکیب‌ها آزمایش شد.

### 3- مواد و روش‌ها

بررسی مقاله‌های متمرکز بر منابع در دسترس کووید 19 شامل <https://covidreference.com/>، PUBMED و Google scholar انجام شد. نام علمی گیاهان در پایگاه‌های داده دارویی پابچم<sup>28</sup> و دراگ بنک<sup>29</sup> و ساختار کریستالی سه‌بعدی آنزیم 3CL<sup>PRO</sup> در بانک اطلاعات پروتئین به‌عنوان واژه‌های کلیدی برای جستجو استفاده شد. در نهایت با استفاده از نرم‌افزار مندلی<sup>30</sup> ارجاع‌دهی انجام شد.

### 3-1 آماده‌سازی ساختارهای ورودی داکینگ

ساختار کریستالی 3CL<sup>PRO</sup> (PDB ID: 6LU7) از بانک اطلاعات پروتئین دانلود شد و برای به‌تصویر کشیدن ساختار سه‌بعدی این پروتئین و شناسایی اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال آنزیم در نرم‌افزار دیسکاوری استودیو<sup>31</sup> استفاده شد. مولکول‌های آب و لیگاند متصل به جایگاه فعال موجود در ساختار کریستالی آنزیم قبل از داکینگ حذف شدند. سپس اتم‌های هیدروژن به‌منظور یونیزاسیون و ایجاد پیوندهای هیدروژنی به پروتئین اضافه شدند (شکل 1).

آزمایشگاهی نشان داده‌اند با اتصال به جایگاه فعال 3CL<sup>PRO</sup> می‌تواند آن را مهار کند. علاوه بر این، بایکالین در مطالعه‌های کشت سلولی نشان داده است که فعالیت ضد ویروسی بر SARS-CoV-2 از خود نشان می‌دهد [45]. مطالعه داکینگ مولکولی ترکیب‌های موجود در گیاه آلیوم نشان داد که اسکوالن<sup>23</sup>، ۱،۴-دی‌هیدرو-۲،۳-بنزوکساتین 3-اکسید<sup>24</sup>، ۱،۲،۳-پروپانتریل استر<sup>25</sup>، ترانس-13-اکتادسنوئیک اسید<sup>26</sup> و متیل-11-هگزادسنوات<sup>27</sup> میل پیوند زیادی به 3CL<sup>PRO</sup> دارند [46]. لازم به ذکر است که جستجو برای یافتن ترکیب‌های گیاهی ضد کووید 19 با روش غربال‌گری مجازی فقط محدود به 3CL<sup>PRO</sup> نیست و ویلاگومز و همکاران نشان دادند که آلکامیدها و پیرامیدها و به‌طور خاص پیرسیکلوبوتانامید B، پتانسیل زیادی برای مهار پروتئین ACE2 انسانی و RdRp ویروس کرونا دارد [24].

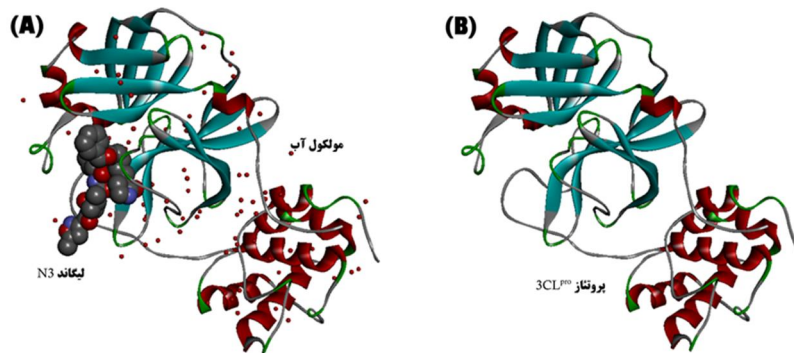
به گفته سازمان جهانی بهداشت، بیش از 80 درصد از جمعیت آفریقا از طب سنتی برای حل مشکل اولیه سلامت استفاده می‌کنند. با این وجود استفاده از طب سنتی، منحصر به آفریقا یا سایر کشورهای در حال توسعه نیست بلکه در کشورهای پیشرفته یا صنعتی نیز توجهی ویژه نسبت به مواد زیست فعال گیاهان دارویی وجود دارد [47]. در این پژوهش با توجه به خواص ضد ویروسی گیاهان دارویی ایران و در دسترس بودن همگانی آنها بر آن شدیم تا مولکول جایگزین بالقوه گیاهی ترکیب N3 را برای مهار پروتئاز اصلی 3CL<sup>PRO</sup> از ترکیب‌های حاصل از گیاهان بومی کشور پیدا کرده و معرفی کنیم.

### 2- هدف از پژوهش

هدف از انجام این طرح، یافتن ترکیب‌های گیاهی بالقوه و در دسترس عموم به‌منظور مهارکنندگی آنزیم پروتئاز

28 PubChem  
29 DrugBank  
30 Mendeley  
31 Discovery Studio

23 Squalene  
24 1,4-dihydro-2,3-benzoxathiin 3-oxide  
25 1,2,3-propanetriyl ester  
26 Trans-13-octadecenoic acid  
27 Methyl-11-hexadecenoate



شکل 1 نمایش سه‌بعدی فایل 6LU7

قبل و بعد از ویرایش در نرم‌افزار دیسکاور استودیو

است، شناسایی و دانلود شدند. این ترکیب‌ها از جمله ترکیب‌های موجود در گیاهان هستند که در جدول 1 نشان داده شده‌اند. این ترکیب‌های گیاهی نسبت به ترکیب‌های شیمیایی از لحاظ اقتصادی بهینه‌تر و سمیت کمتری دارند.

### 2-3 آماده‌سازی لیگاندها

با جستجو در پایگاه‌های داده ترکیب‌های دارویی (PubChem - DrugBank)، مولکول‌های شبیه به مهارکننده‌های آنزیم 3CL<sup>pro</sup> و همچنین داروهایی که پیش‌تر به‌عنوان مهارکننده این خانواده از ویروس‌ها استفاده شده

جدول 1 ترکیب‌های استفاده‌شده به‌منظور داکینگ مولکولی

منبع گیاهی	شناسه دارو	نام ترکیب	ردیف	منبع گیاهی	شناسه دارو	نام ترکیب	ردیف
تاتوره	DB00747	Scopolamine	12	زغال‌اخته	11228693	Morrisonide	1
شایبزرک	DB00572	Atropine	13	دارچین	6850781	Cassia oil	2
ختمی	DB00768	Olopatadine	14	آویشن	2958	Cerubidin	3
ختمی	DB11079	Trolamine salicylate	15	دارچین	240	Benzaldehyde	4
زعفران	DB01394	Colchicine	16	دارچین	6850775	Cassia bark extract	5
چای سبز	DB11304	Phenoxyethanol	17	دارچین	637511	Cinnamaldehyde	6
جعفری	5280443	Apigenin	18	آویشن	54600453	NSC219748	7
سیر	DB02571	Allysine	19	دارچین	91864536	UNII-H1059K9GIN	8
زنجبیل	3473	[6]-Gingerol	20	آویشن	6850745	Thyme oil	9
خرنوب	102601728	Herbal Propionate	21	آویشن	1691	Triferric doxorubicin	10
-	146025593	Inhibitor N3	22	آویشن	27924	Phorbol 12-myristate 13-acetate	11

#### 4- مطالعه‌های داکینگ مولکولی

داکینگ مولکولی به وسیله نرم افزار آتوداک وینا<sup>32</sup> انجام شد. برای آماده سازی فایل های ورودی لیگاند و پروتئین به فرمت PDBQT (که قابل بهره برداری در آتوداک باشد) از ابزار اتوداک که برنامه کمکی برای آتوداک است، استفاده شد. براساس پژوهش های پیشین جایگاه فعال این آنزیم شناسایی شده و برای تعیین جایگاه فعال از منوی Grid Box حفره داخلی پروتئین در سه جهت X,Y,Z با مقادیر 11/296-، 10/283 و 66/281 و اندازه های 26، 32 و 30 تنظیم و سپس برنامه اجرا شد.

نتایج داکینگ مولکولی به کمک نرم افزار آتوداک وینا به صورت فایل PDBQT کمپلکس پروتئین-لیگاند به دست آمد. سپس به کمک نرم افزار دیسکاوری استودیو تبدیل به فایل pdb شد و پس از آن به کمک نرم افزارهای تجزیه و تحلیل مثل ADT، دیسکاوری استودیو و LigPlot+ بررسی شد.

#### 5- شبیه سازی دینامیک مولکولی

##### 1-5 برنامه استفاده شده

برای انجام شبیه سازی از برنامه گرومکس<sup>33</sup>، نسخه 5,1,4 استفاده شد. شبیه سازی های انجام شده در این مطالعه در جدول 2 آمده است.

32 AutoDock Vina

33 Gromacs

جدول 2 فهرست شبیه‌سازی‌های انجام‌شده در این مطالعه

شبهه‌سازی انجام‌شده	مدت زمان شبیه‌سازی	برنامه استفاده‌شده
پروتئاز اصلی + N3	100 نانوثانیه	گرومکس نسخه 5,1,4
پروتئاز اصلی + ترکیب شماره 3	100 نانوثانیه	
پروتئاز اصلی + ترکیب شماره 5	100 نانوثانیه	
پروتئاز اصلی + ترکیب شماره 8	100 نانوثانیه	

#### 6- تولید ساختارهای اولیه

توپولوژی مولکول‌های نهایی انتخاب‌شده در فرایند داکینگ مولکولی برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از سرور ATB<sup>34</sup> آماده شد. همچنین پروتئین پروتئاز اصلی با کد 6LU7 از پایگاه داده RCSB PDB دانلود شد. مولکول پروتئین در نرم‌افزار VMD<sup>35</sup> مشاهده شد و مولکول‌های آب و لیگاند از فایل حذف شدند.

#### 9- افزودن یون و خنثاکردن بار

براساس اصل خنثابودن (که برای همه محلول‌ها برقرار است) جعبه شبیه‌سازی هم باید از نظر بار خنثا باشد. با توجه به وجود چهار بار منفی در سیستم، چهار یون سدیم به جعبه شبیه‌سازی اضافه و به‌طور تصادفی با مولکول‌های آب جایگزین شد. اجزای سیستم بعد از اضافه‌کردن مولکول‌های آب و یون‌ها در جدول 3 ارائه شده است.

#### 7- تعیین میدان نیرو

میدان نیروی GROMOS54.A7 از سرور ATB دانلود و برای انجام شبیه‌سازی استفاده شد. براساس مقاله‌ها [48] این میدان نیرو به‌خوبی پروتئین‌ها را توصیف کرده و با توپولوژی ساخته‌شده با سرور ABT نیز تطابق دارد.

#### 8- ایجاد جعبه و حلال‌پوشی

در این مرحله، یک سلول واحد مکعبی با مختصات 8, 9 و 7,8 نانومتر به‌طوری‌که کل سیستم پروتئین و لیگاند را پوشش دهد، تشکیل شد و کمپلکس شامل لیگاند و پروتئین در مرکز جعبه به مختصات 3,9, 4,5 و 3,8 قرار گرفت. جعبه با مولکول‌های آب قطبی از نوع spc216 پر و کمپلکس حلال‌پوشی شد.

34 Automated Topology Builder

35 Visual Molecular Dynamics

جدول 3 توصیف سیستم در شبیه سازی

تعداد کل اتم‌ها	یون‌های Na <sup>+</sup>	مولکول‌های آب	لیگاند	پروتئین
54495	4	17114	N3	6LU7
54521	4	17132	شماره 3	6LU7
54475	4	17117	شماره 5	6LU7
54511	4	17129	شماره 8	6LU7

### 10- کمینه‌سازی انرژی سیستم

بهینه‌سازی انرژی به تعداد 50000 مرحله با استفاده از الگوریتم سریعترین فرود<sup>36</sup> انجام شد تا میان‌کنش‌های نامناسب درون ساختار ناشی از روش کریستالوگرافی و همچنین جهت‌گیری نامناسب مولکول‌های آب و پروتئین نسبت به هم بهینه شود [49]. پس از بهینه‌سازی برای اطمینان از حداقل‌سازی انرژی با استفاده از دستور انرژی<sup>37</sup>، انرژی پتانسیل سیستم بررسی شد.

### 11- به تعادل رساندن دما و فشار سیستم

با هدف تنظیم دمای هر سیستم روی 300 درجه کلوین، 100 پیکو ثانیه شبیه‌سازی با استفاده از ترموستات برندنسن<sup>38</sup> و در شرایط حجم ثابت (NVT) انجام شد. برای اطمینان از تنظیم دما، نمودار دما<sup>39</sup> برای سیستم رسم شد. پس از تنظیم دما روی 300 درجه کلوین و با هدف تنظیم فشار سیستم روی 1 اتمسفر، با استفاده از باروستات پارانیلو-رحمان<sup>40</sup>، شبیه‌سازی سیستم به مدت 100 پیکو ثانیه و در شرایط فشار ثابت (NPT) انجام شد. برای اطمینان از تنظیم دما، نمودار density و pressure برای سیستم رسم گردید.

### 12- نتایج

1-12 نتایج مطالعه‌های شبیه‌سازی داکینگ مولکولی میل<sup>41</sup> اتصال و جزئیات برهم‌کنشی بین پروتئین 3CL<sup>pro</sup> و 21 ترکیب انتخابی از گیاهان دارویی انتخابی با استفاده از نرم‌افزار آتوداک وینا به دست آمد و با مهارکننده N3 به‌عنوان ترکیب مهاری استاندارد [39] مقایسه شد. نتایج در جدول 4 گزارش شده است. ترکیب مرجع با رنگ آبی مشخص شده است.

36 Steepest Descent  
37 Energy  
38 Berendsen  
39 Temperature  
40 Parrinello-Rahman

41 Affinity



جدول 4 نتایج امتیازدهی داکینگ مولکولی ترکیب‌های انتخاب شده

ردیف	نام ترکیب	$\Delta G$ (Kcal/mol)	ردیف	نام ترکیب	$\Delta G$ (Kcal/mol)
1	Morroniside	-7.3	12	Scopolamine	-6.9
2	Cassia oil	-4.9	13	Atropine	-6.6
3	Cerubidin	-8.5	14	Olopatadine	-7
4	Benzaldehyde	-4.2	15	Trolamine salicylate	-4.1
5	Cassia bark extract	-8.6	16	Colchicine	-6.6
6	Cinnamaldehyde	-4.2	17	Phenoxyethanol	-5
7	NSC219748	-4.5	18	Apigenin	-6.7
8	UNII-H1059K9GIN	-8.6	19	Allysine	-4.6
9	Thyme oil	-4.7	20	[6]-Gingerol	-5.1
10	Triferric doxorubicin	-8.3	21	Herbal Propionate	-5.6
11	Phorbol 12-myristate 13-acetate	-6.5	22	Inhibitor N3	-7.4

لیگاند شماره 3: با توجه به نتایج شبیه‌سازی داکینگ مولکولی ترکیب شماره 3 به همراه آنزیم 3CL<sup>pro</sup> مشخص شد که با آمینواسیدهای Phe140, Leu141, Ser144, His163, His164 و Glu166 برهم‌کنش‌های هیدروژنی و با زنجیره‌های جانبی آمینواسیدهای Gly143, Cys145, Asn142, His41, Met165, Arg188, Gln189, Thr190 و Pro168 برهم‌کنش‌های آب‌گریز از خود نشان می‌دهند (شکل 2).

لیگاند شماره 5: با توجه به نتایج شبیه‌سازی داکینگ مولکولی ترکیب شماره 5 به همراه آنزیم 3CL<sup>pro</sup> مشخص شد که با آمینواسیدهای Thr24, Thr25, Cys44, Gly143, Ser144, Cys145 و Glu166 برهم‌کنش‌های هیدروژنی و با زنجیره‌های جانبی آمینواسیدهای His41, Thr45, Met49, Phe140, Leu141, His163, His172, Asn142, Arg188, Met165 و Gln189 برهم‌کنش‌های آب‌گریز از خود نشان می‌دهند (شکل 2).

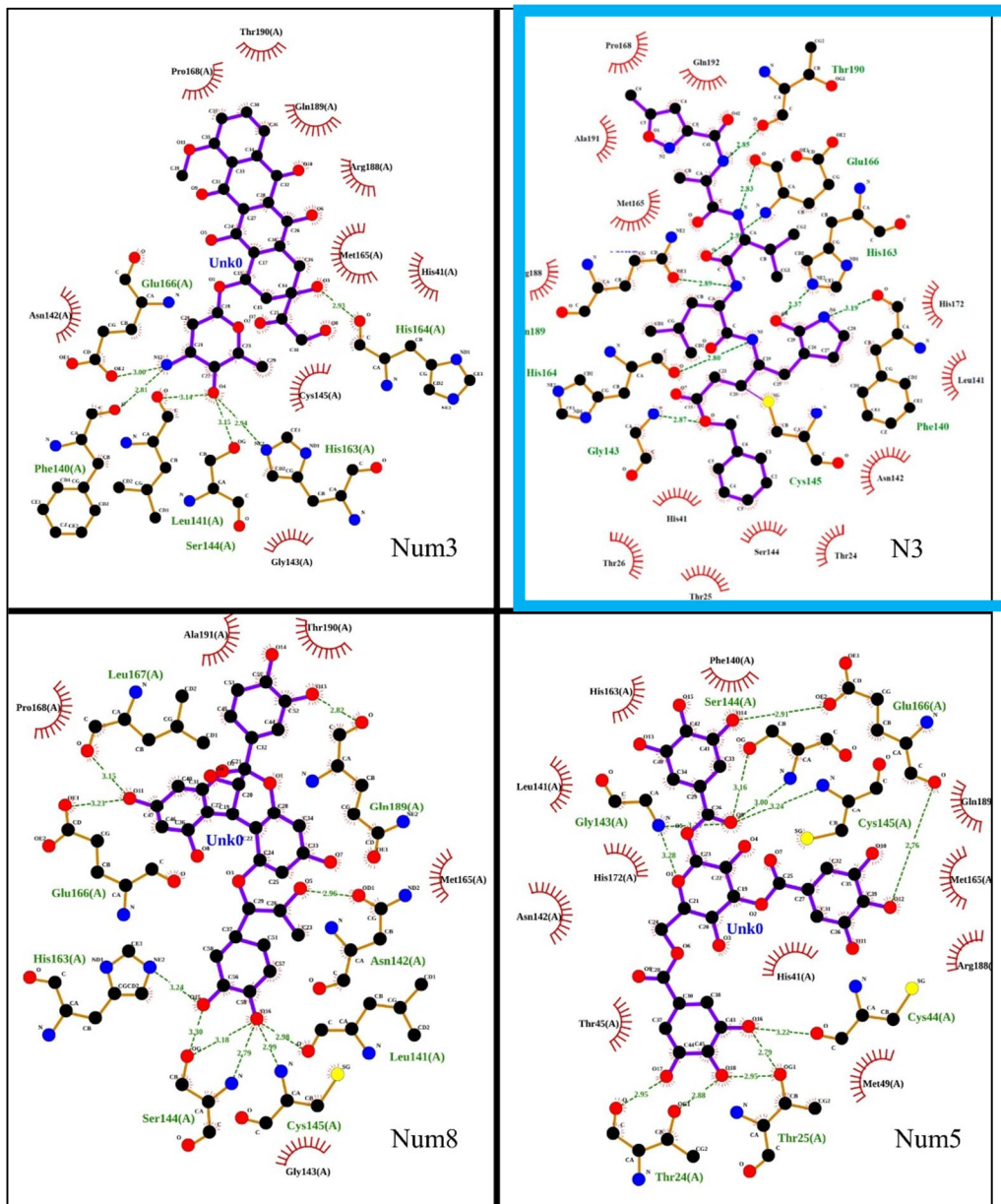
لیگاند شماره 8: همچنین نتایج شبیه‌سازی داکینگ مولکولی ترکیب شماره 8 به همراه آنزیم 3CL<sup>pro</sup>

مقادیر میل اتصال، از 4,1- تا 8,6- کیلوکالری بر مول متغیر است. به طور کلی، مقادیر میل اتصال لیگاندها نشان می‌دهد که سه لیگاند (شماره‌های 3, 5 و 8) به‌دست‌آمده از 21 ترکیب مطالعه‌شده، بهترین لیگاندهایی هستند که می‌توانند به‌عنوان مهارکننده‌های بالقوه 3CL<sup>pro</sup> استفاده شوند. میل اتصال این سه ترکیب نسبت به لیگاند مرجع (شماره 22) بهتر بوده و به‌ترتیب لیگاند شماره 8, 5 و 3 است. محل اتصال سه ترکیب ذکرشده با جایگاه فعال آنزیم در ادامه آنالیز شد.

لیگاند مرجع N3: نتایج شبیه‌سازی داکینگ مولکولی ترکیب مرجع N3 به همراه آنزیم 3CL<sup>pro</sup> نشان داد که این ترکیب با آمینواسیدهای Phe140, Cys145, Gly143, His164, Gln189, His163, Thr190 و Glu166 برهم‌کنش‌های هیدروژنی و با زنجیره‌های جانبی آمینواسیدهای Pro168, Gln192, Ala191, Met165, Arg188, His172, Leu141, Asn142, Thr24, Ser144, His41, Thr26 و Thr25 برهم‌کنش‌های آب‌گریز دارد (شکل 2).

آمینواسیدهای Thr190, Ala191, Pro168, Met165 و Gly143 برهم کنش های آب گریز از خود نشان می دهند (شکل 2).

مشخص شد که با آمینواسیدهای Ser144, Cys145, Leu141, His163, Asn142, Glu166, Gln189 و Leu167 برهم کنش های هیدروژنی و با زنجیره های جانبی



شکل 2 نمایش دوبعدی از تعامل بین چهار مولکول مطالعه شده و 3CL<sup>PRO</sup> با استفاده از نرم افزار LigPlot+. کادر آبی رنگ مشخص کننده میان کنش های ترکیب مرجع N3 است.

### 13- آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک

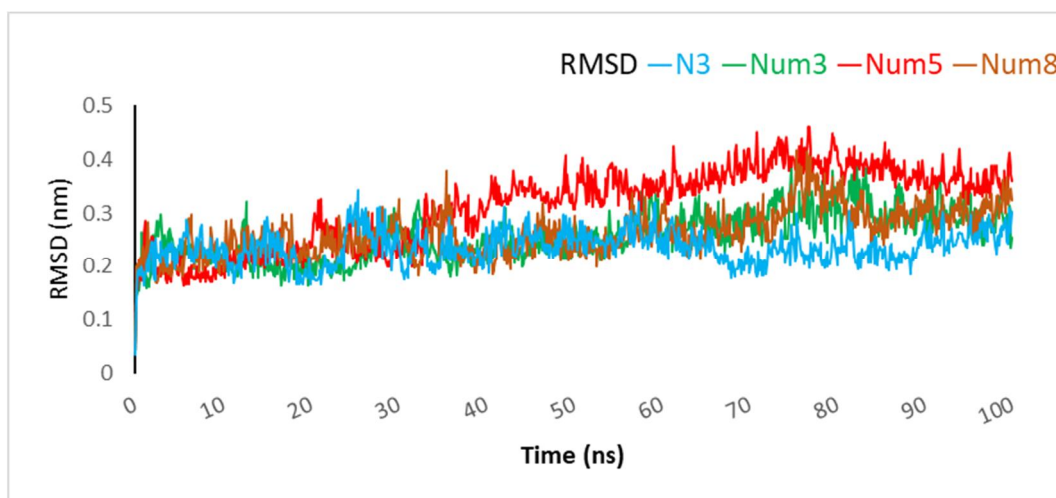
مولکولی

#### 13-1 آنالیز خطای جذر میانگین مربعات<sup>42</sup> (RMSD)

نمودار شکل 3، مربوط به RMSD بیانگر این موضوع است که ترکیب‌های مطالعه‌شده، ترکیب مرجع N3، ترکیب شماره 3، ترکیب شماره 5 و ترکیب شماره 8 در محدوده قابل قبولی از RMSD با میانگین مقدار 3 آنگستروم هستند و این نشان می‌دهد که این ترکیب‌ها به حفره جایگاه فعال آنزیم 3CL<sup>pro</sup> محدود می‌شوند و لیگاند به‌طور پایدار به محل اتصال پروتئاز متصل است و اگر با دقت نمودارهای مربوط به RMSD بررسی شود، مشاهده می‌شود که تمام سیستم‌ها متعادل‌شدن را از زمان 75 نانوثانیه شروع کرده‌اند، این به آن معناست که ساختار پروتئین در ظاهر بین زمان 75 تا 100 نانوثانیه بدون تغییر باقیمانده است.

---

42 Root Mean Square Deviation

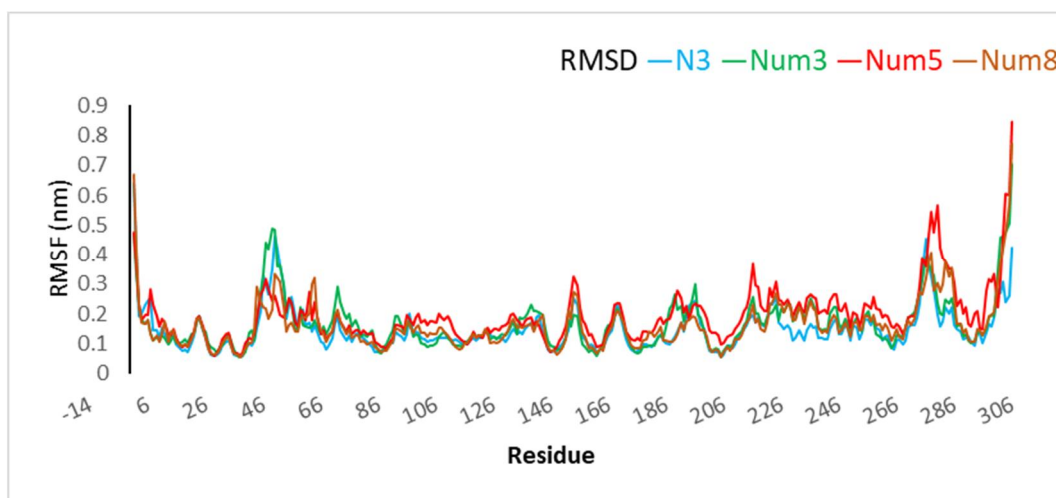


شکل 3 نمودار مربوط به تغییرات RMSD برای مقایسه پایداری کمپلکس‌های پروتئین- لیگاند در مدت زمان 100 نانوثانیه

### 13-2 آنالیز نوسان‌های ریشه میانگین مربعات<sup>43</sup> (RMSF)

با توجه به اهمیت انعطاف‌پذیری باقیمانده‌های یک پروتئین بر عملکرد زیستی آن [50]، انعطاف‌پذیری باقیمانده‌های آنزیم 3CL<sup>pro</sup>، بعد از اتصال مهارکننده به آنزیم با استفاده از RMSF بررسی شد. مقادیر RMSF برای اتم‌های کربن آلفای هر باقیمانده در مدت زمان 100 نانوثانیه شبیه‌سازی MD محاسبه شد. همان‌طور که در نمودار شکل 4 نشان داده شده است، کمپلکس‌های N3- 3CL<sup>pro</sup>، Num3-3CL<sup>pro</sup>، Num5-3CL<sup>pro</sup> و Num8- 3CL<sup>pro</sup>، به ترتیب به‌طور متوسط دارای 0,15، 0,17، 0,19 و 0,16 نانومتر نوسان در باقیمانده‌های خود دارد. افزایش ناچیز مقدار RMSF سه کمپلکس مطالعه‌شده نسبت به کمپلکس مرجع، نشان‌دهنده اتصال مطلوب این لیگاندها در مقایسه با کمپلکس مرجع به آنزیم است.

43 Root Mean Square Fluctuation

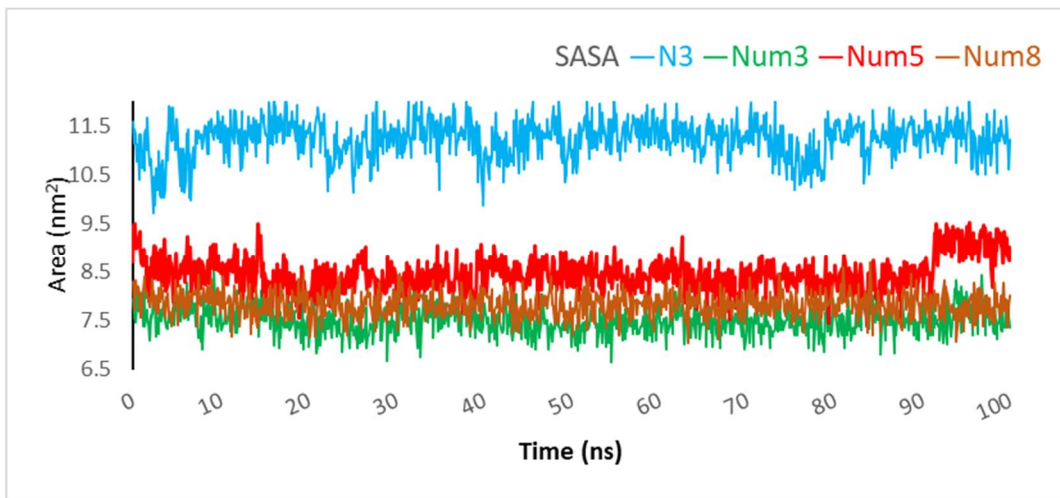


شکل 4 نمودار مربوط به تغییرات RMSF برای مقایسه انعطاف‌پذیری کمپلکس‌های پروتئین- لیگاند در مدت زمان 100 نانوثانیه

### 13-3 آنالیز سطح در دسترس حلال<sup>44</sup> (SASA) لیگاند

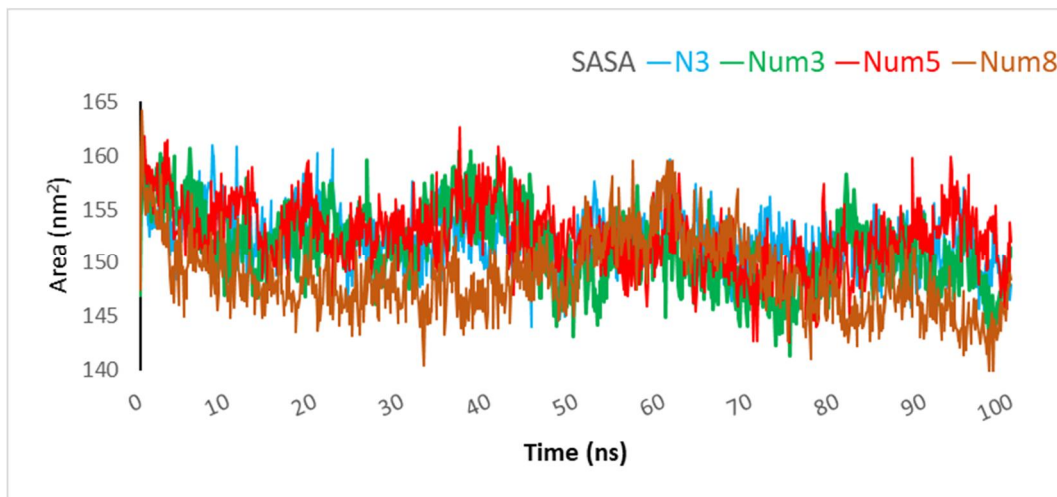
SASA برای چهار ترکیب مطالعه شده به صورت جداگانه و مقایسه‌ای و چهار حالت پروتئین و همچنین چهار حالت کمپلکس محاسبه شد و تغییرات ساختاری پروتئین پس از اتصال هر ترکیب به جایگاه فعال آنزیم پیش‌بینی شد (نمودار شکل‌های 6 تا 8). در نهایت میل اتصال چهار ترکیب به پروتئین با استفاده از این داده‌ها مقایسه شد. میانگین مقدار SASA برای ترکیب‌های N3، Num3، Num5 و Num8 به ترتیب برابر 11,2، 7,5، 8,5 و 7,8 نانومتر مربع است. میانگین مقدار SASA برای پروتئین در حالتی که ترکیب مهارکننده حضور ندارد، به ترتیب برابر 152,1، 151,3، 152,5 و 148,7 نانومتر است. میانگین مقدار SASA برای کمپلکس‌های N3-3CL<sup>pro</sup>، Num3-3CL<sup>pro</sup>، Num5-3CL<sup>pro</sup> و Num8-3CL<sup>pro</sup> به ترتیب برابر با 151,0، 149,9، 149,8 و 148,2 نانومتر است. مقادیر به دست آمده نشان می‌دهد زمانی که مهارکننده به جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شود، با ایجاد برهم‌کنش‌های بیشتر با پروتئین، مقدار SASA برای کمپلکس‌ها را کاهش پیدا می‌کند.

<sup>44</sup> Solvent-Accessible Surface Area

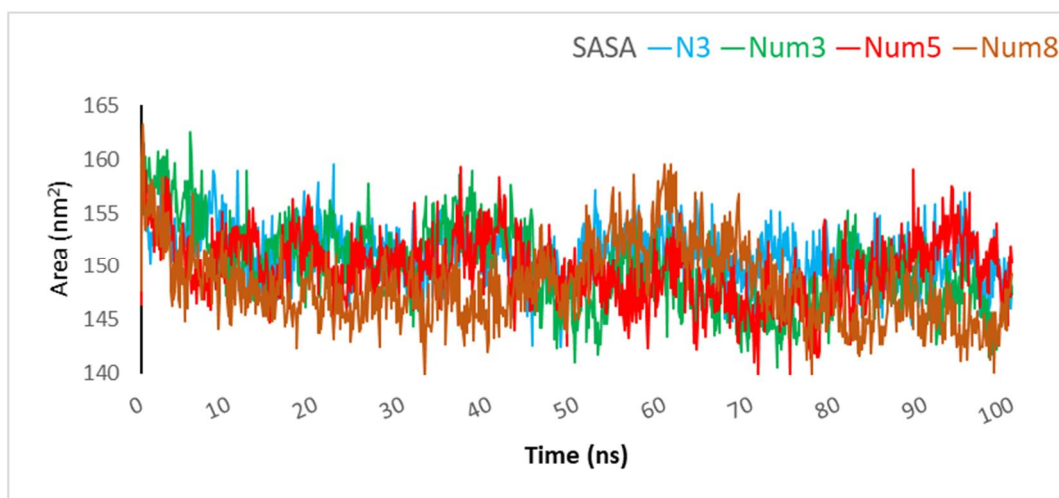


شکل 6 نمودار مربوط به مقایسه تغییرات سطح در دسترس حلال چهار لیگاند در مدت زمان 100 نانوثانیه

#### 13-4 آنالیز سطح در دسترس حلال پروتئین



شکل 7 نمودار مربوط به مقایسه تغییرات سطح در دسترس حلال پروتئین در چهار حالت در مدت زمان 100 نانوثانیه



شکل 8 نمودار مربوط به مقایسه تغییرات سطح در دسترس حلال چهار کمپلکس پروتئین- لیگاند در مدت زمان 100 نانوثانیه

### 13-5 آنالیز پیوند هیدروژنی

Glu166 دارد. همچنین میان‌کنش‌های آب‌گریزی با Asp187، His41، Asn142، Met165، Thr45، Gly143 و Thr190 دارد.

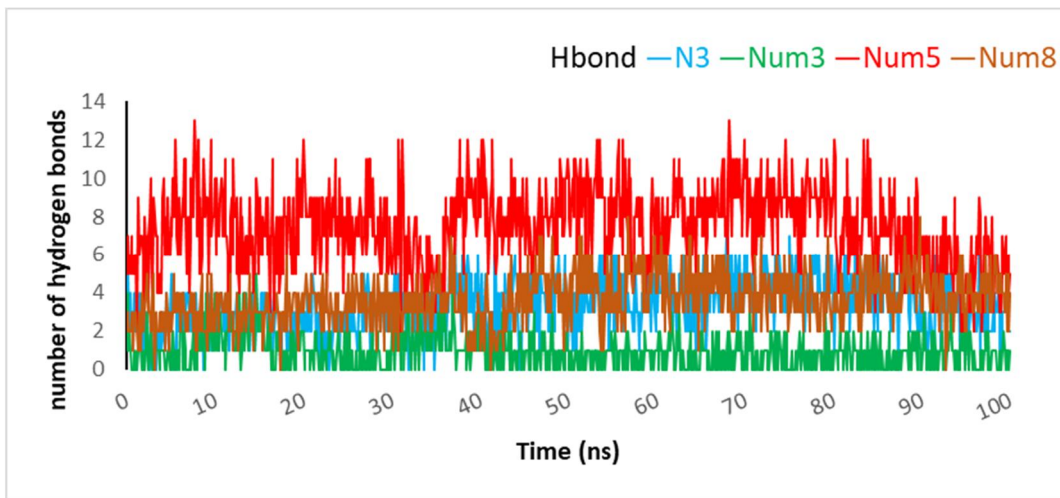
لیگاند شماره 3 بعد از شبیه‌سازی MD دو پیوند هیدروژنی با Gln189 و یک پیوند هیدروژنی با His41 دارد و میان‌کنش‌های آب‌گریزی با Thr25، Leu27، His41، His164، Cys44، Pro39، Val42، Cys145، Arg188 و Asp48، Thr190، Thr45، Ser46 دارد.

لیگاند شماره 5 بعد از شبیه‌سازی MD سه پیوند هیدروژنی با Glu166 و یک پیوند هیدروژنی با His163، His172، Gly143 و Cys145 و دو پیوند هیدروژنی با Thr26 دارد و میان‌کنش‌های آب‌گریزی با His164، Leu141، Asn142، His41، Met49، Phe140، Ser144 و Asn119 و Leu27 دارد.

لیگاند شماره 8 بعد از شبیه‌سازی MD دو پیوند هیدروژنی با Gln189 و Glu166 و یک پیوند هیدروژنی با Val186، Asn142 و Ser144 دارد و میان‌کنش‌های آب‌گریزی با His164، Gly143، Ser144، Ala191، Asp187، His41، Glu166، Met165، Asn142 و Thr190 دارد.

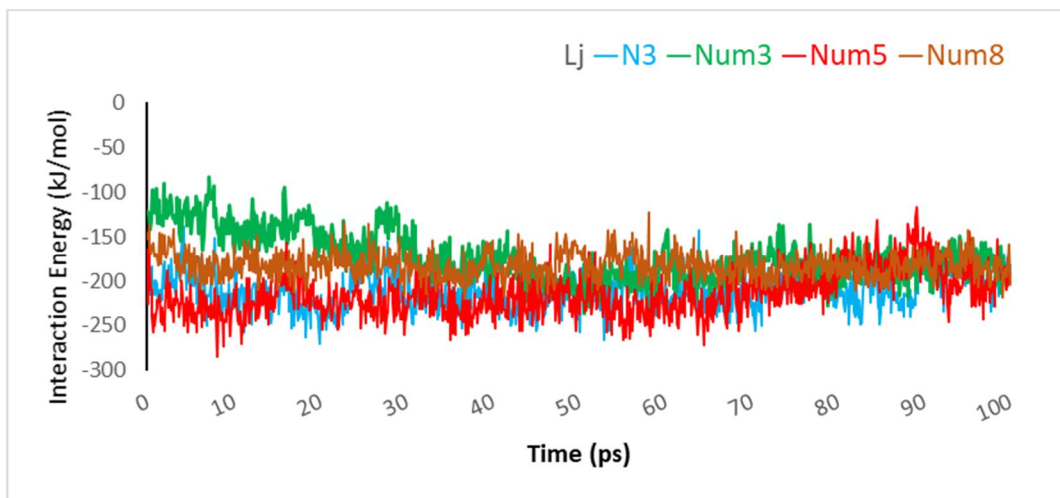
برای پی‌بردن به پایداری اتصال بین ترکیب‌های لیگاند و  $3CL^{pro}$ ، برهم‌کنش پیوند هیدروژنی بین چهار ترکیب با آنزیم، با استفاده از 1000 فریم تولیدشده از داده‌های مسیر شبیه‌سازی بررسی شد. نمودار شکل 9 وجود پیوند هیدروژنی بین چهار ترکیب مطالعه‌شده و  $3CL^{pro}$  را نشان می‌دهد. در زمان اولیه از MD، کمپلکس N3- $3CL^{pro}$  حدود دو پیوند هیدروژنی تشکیل شد، پس از 40 نانوثانیه، میانگین پیوندهای هیدروژنی تشکیل‌شده به‌وسیله این کمپلکس 4 بود. همچنین نشان می‌دهد که در فاز دینامیک تعداد پیوندهای هیدروژنی به سه عدد رسیده است. بقیه نمودارهای مربوط به کمپلکس‌های مطالعه‌شده نشان می‌دهند که طی شبیه‌سازی کمپلکس‌های Num5- $3CL^{pro}$  و Num8- $3CL^{pro}$  نسبت به کمپلکس مرجع تعداد بیشتری پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند درحالی‌که کمپلکس Num3- $3CL^{pro}$  تعداد کمتری پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهد.

آنالیز میان‌کنش‌های مولکولی قبل و بعد از شبیه‌سازی MD نشان می‌دهد که بعد از شبیه‌سازی لیگاند N3 دو پیوند هیدروژنی با Gln189 و دو پیوند هیدروژنی با



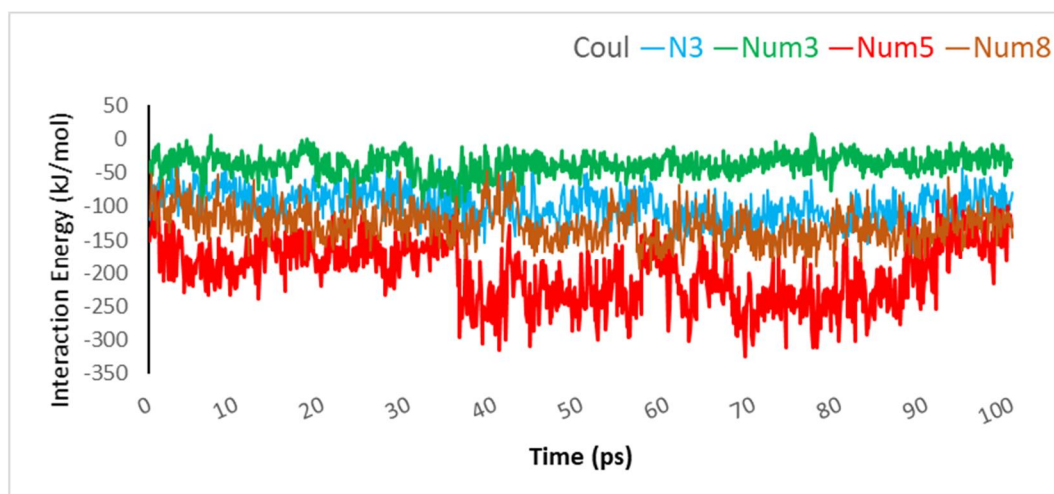
شکل 9 نمودار مربوط به تغییرات تعداد پیوندهای هیدروژنی برای مقایسه کمپلکس‌های پروتئین- لیگاند در 100 نانوثانیه شبیه‌سازی با معیار 0,35 نانومتر

آنالیز انرژی پروتئین-لیگاند کمپلکس‌های  $N3-3CL^{pro}$ ،  $Num3-3CL^{pro}$ ،  $Num5-3CL^{pro}$  و  $Num8-3CL^{pro}$  برهم‌کنش‌های کوتاه برد و اندروالس و الکترواستاتیک:



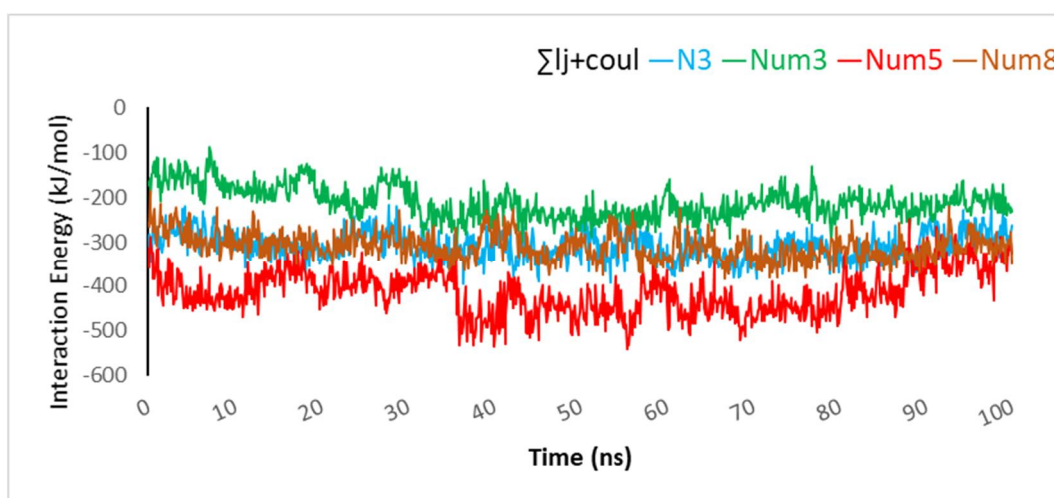
شکل 10 نمودار مربوط به مقایسه انرژی پتانسیل لنارد- جونز چهار کمپلکس در مدت زمان 100 نانوثانیه





شکل 11 نمودار مربوط به مقایسه انرژی پتانسیل کولومبیک چهار کمپلکس در مدت زمان 100 نانوثانیه

آنالیز مجموع انرژی پروتئین لیگاند کمپلکس های  $N3-3CL^{pro}$ ،  $Num3-3CL^{pro}$ ،  $Num5-3CL^{pro}$  و  $Num8-3CL^{pro}$  برهم کنش های کوتاه برد و اندروالس و الکترواستاتیک:



شکل 12 نمودار مربوط به مقایسه مجموع انرژی پتانسیل لنارد-جونز و کولومبیک چهار لیگاند در مدت زمان 100 نانوثانیه

الکترواستاتیک می باشند. نیروهای واندروالسی با استفاده از مدل پتانسیل لنارد-جونز به دست می آید و نیروهای الکترواستاتیک با استفاده از مدل پتانسیل کولومبیک محاسبه می شود [51]. مشاهده شد که برهم کنش بین پروتئین و لیگاند نیروهای واندروالس و الکترواستاتیک

### 13-6 آنالیز انرژی برهم کنش لیگاند-پروتئین

برهم کنش های بین مولکول های لیگاند و پروتئین در جایگاه فعال آنزیم، به صورت چشمگیری در پایداری، میل اتصال و انتخاب نوع مهارکننده اثرگذار هستند. برهم کنش های غیرپیوندی شامل نیروهای واندروالس و

برای چهار کمپلکس مطالعه شده انرژی منفی داشته که بیانگر سهم غالب جاذبه بین پروتئین و لیگاند بوده و در حد مطلوبی است (نمودار شکل‌های 10 و 11). همچنین در نمودار شکل 12 نشان داده شده است که مقدار مجموع انرژی واندوالس و الکترواستاتیک برای کمپلکس های Num5-3CL<sup>pro</sup> مقدار منفی تری نسبت به کمپلکس‌های دیگر می‌باشد.

#### 14- بحث و نتیجه‌گیری

تا به امروز ترکیب‌هایی با دیدگاه‌های مختلف برای مهار این پروتئاز توسعه یافته که به‌رغم برخی مزیت‌ها، هرکدام دچار یک مجموعه محدودیت است، برای مثال چومنانپوئن<sup>45</sup> و همکاران از راه مطالعه‌های غربال‌گری مجازی 10 پپتیدهای زیست‌فعال را معرفی کردند که می‌تواند به‌عنوان مهارکننده‌های بالقوه این پروتئاز معرفی شوند [52]. از طرف دیگر، کورونادو<sup>46</sup> و همکاران نیز یک استراتژی با قابلیت بالا برای طراحی D-peptide‌های بر پروتئاز اصلی ارائه دادند که می‌تواند ارزیابی بالینی شود [23]. هرچند پپتیدها به علت خواص جذابی چون دردسترس‌پذیری بالای زیستی و فرار از سیستم ایمنی بسیار مورد توجه هستند [53]، اما قابل توجه است که حتی در صورت عملکرد بالا به دلیل پایداری پایین، نیاز به توسعه روش‌هایی برای افزایش نیمه عمر دارند [54]. از طرف دیگر، هزینه سنتز پپتیدها بالا است [55]. بنابراین امکان فرارگیری وسیع آنها برای عموم مردم وجود ندارد. همچنین باید توجه داشت که مطالعه‌های فارماکوکینتیک نشان داده است که ترکیب N3 به‌عنوان مهارکننده اصلی پروتئاز 3CL<sup>pro</sup> سمیت بالا برای کبد دارد [44] که از تبدیل شدن آن به‌عنوان یک داروی بی‌رقیب ضد ویروس جلوگیری می‌کند. چنین نقص‌هایی در داروهای توسعه یافته بر علیه 3CL<sup>pro</sup>، بر اهمیت کشف

جایگزین‌های مشتق از گیاه که علاوه بر کارایی بالا، ارزان و در دسترس بوده و عوارض جانبی کمی داشته باشند، بسیار مهم است. نکته قابل توجه دیگر این است که با توجه به همه‌گیری ویروس کرونا در سراسر جهان لازم است که هر منطقه و کشور از گیاهان دارویی بومی خود برای توسعه دارو استفاده کند تا بتواند با کمترین هزینه، بیشترین دسترسی را برای بیماران ارائه کند. براساس بررسی‌های ما تا به امروز، هرچند مطالعه‌های طب سنتی، تأثیر برخی گیاهان دارویی ایرانی را بر علیه ویروس کرونا تأیید می‌کند [56]، اما مکانیسم مولکولی آنها و همچنین پتانسیل ماده فعال این گیاهان برای مهار آنزیم 3CL<sup>pro</sup> بررسی نشده است.

در پژوهش حاضر، مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد که از بین 21 ترکیب گیاهی مطالعه شده مشتق از گیاهان دارویی بومی ایران و در مقایسه با لیگاند N3، ترکیب‌هایی با میل اتصال بالاتر به جایگاه فعال آنزیم پروتئاز اصلی انتخاب و سه ترکیب بالقوه که از لحاظ امتیازدهی، تعداد پیوندهای هیدروژنی و میان‌کنش‌های آب‌گریز با لیگاند اصلی (N3) قابل مقایسه بودند، انتخاب شد. لیگاند N3 به‌عنوان ترکیب مرجع، با انرژی اتصال -7,4- کیلوژول بر مول، 8 پیوند هیدروژنی و 13 میان‌کنش آب‌گریز با 3CL<sup>pro</sup>، ترکیب شماره 3، انرژی اتصال -8,5- کیلوژول بر مول و تعداد 5 پیوند هیدروژنی و 9 میان‌کنش آب‌گریز با 3CL<sup>pro</sup>، ترکیب شماره 5، انرژی اتصال -8,6- کیلوژول بر مول، 12 پیوند هیدروژنی و 11 میان‌کنش آب‌گریز با 3CL<sup>pro</sup> و ترکیب شماره 8 نیز انرژی اتصال -8,6- کیلوژول بر مول، 10 پیوند هیدروژنی و 5 میان‌کنش آب‌گریز با 3CL<sup>pro</sup> را نشان داد. آنالیز نتایج شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی نشان داد که ترکیب شماره 5 (Cassia bark extract) مشتق از دارچین در مقایسه با N3، علاوه بر مقدار انرژی اتصال به نسبت بالا نسبت به جایگاه فعال، تعداد پیوندهای هیدروژنی و

45 Chumnanpuen  
46 Coronado

میان‌کنش‌های آب‌گریز به‌نسبت بیشتری داشته و یک مهارکننده بالقوه برای آنزیم پروتئاز اصلی است. همچنین مشخص شد که باقیمانده Glu166 در 3CL<sup>pro</sup> با هر چهار ترکیب مطالعه‌شده در ایجاد پیوند هیدروژنی مؤثر است. در بخش دوم این پژوهش، مطالعه‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام و رفتار کمپلکس از نظر دینامیک ساختاری با استفاده از آنالیزهای با استفاده از آنالیزهای SASA و RMSF، RMSD و از نظر انرژی با آنالیز پارامترهای مرتبط با میان‌کنش شامل پیوند هیدروژنی، برهم‌کنش‌های دور- برد الکترواستاتیک و برهم‌کنش‌های کوتاه- برد واندروالس مطالعه شد. آنالیز RMSD نشان داد که کمپلکس‌های تشکیل‌شده در زمان شبیه‌سازی پایداری دارند. از طرف دیگر آنالیز RMSF بیان می‌کند که الگوی انعطاف‌پذیری القاشده به‌وسیله ترکیب‌های گیاهی با خاصیت مهارى بالقوه و ترکیب مرجع N3 مشابه است. همچنین، آنالیز سطح در دسترس کمپلکس و درمقایسه با ترکیب مرجع، نشانگر میان‌کنش بهتر یا قابل مقایسه ترکیب‌های گیاهی انتخاب‌شده با پروتئین هدف می‌باشد. علاوه بر این، آنالیزهای مرتبط با انرژی نشان می‌دهد که سه ترکیب بالقوه انتخاب‌شده نسبت به ترکیب مرجع میان‌کنش مناسب‌تری دارند. درواقع آنالیز پیوندهای هیدروژنی نشان داد که ترکیب‌های شماره 5 و 8 نسبت به ترکیب مرجع پیوندهای هیدروژنی بیشتری تشکیل می‌دهند. با نگاه جزئی‌تر و آنالیز میان‌کنش‌ها بعد از انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، لیگاندهای N3، ترکیب شماره 3، ترکیب شماره 5 و ترکیب شماره 8 به‌ترتیب 4، 3، 9 و 8 پیوند هیدروژنی با جایگاه فعال آنزیم تشکیل می‌دهند و به‌ترتیب با 7، 13، 9 و 10 باقی‌مانده میان‌کنش آب‌گریزی دارند. آنالیز انرژی نیروهای واندروالس و الکترواستاتیک نیز نشان داد که ترکیب شماره 8 انرژی میان‌کنش مشابه با N3 را نسبت به پروتئاز هدف نشان داده و ترکیب شماره 5 با بهبود میانگین انرژی

اتصال بهترین میان‌کنش با 3CL<sup>pro</sup> را دارد که با نتایج حاصل از آنالیز پیوند هیدروژنی همخوان است. جالب است که طی آنالیز و مقایسه میان‌کنش‌ها بعد از شبیه‌سازی، مشخص شد که ترکیب‌های انتخاب‌شده در جایگاه فعال آنزیم باقی‌مانده‌اند. این در حالی است که ترکیب N3 با ازدست‌دادن برخی میان‌کنش‌ها با باقیمانده‌هایی همچون Phe140، Cys145، Gly143، His164 و His163 شروع به دورشدن از جایگاه فعال کرده است. میانگین انرژی برهم‌کنش کمپلکس‌های N3- 3CL<sup>pro</sup>، Num3-3CL<sup>pro</sup>، Num5-3CL<sup>pro</sup> و Num8- 3CL<sup>pro</sup>، به‌ترتیب، -309,34، -210,84، -413,53 و -309,53 بود درحالی‌که این مقدار در مطالعه‌های پیشین میانگین انرژی برهم‌کنش مربوط به توماتیدین موجود گوجه‌فرنگی سبز [57] و گالوکاتچین-3-گالات موجود در چای سبز [44] در کمپلکس با پروتئین 3CL<sup>pro</sup> به‌ترتیب برابر -202,09 و 224,01 بود.

درنهایت، نتایج حاصل از این پژوهش *in silico* نشان داد که ترکیب شماره 5 (Cassia bark extract) مشتق از دارچین به‌عنوان داروی گیاهی بومی و در دسترس ایرانی می‌تواند به‌طور بالقوه مهارکننده پروتئاز اصلی 3CL<sup>pro</sup> در کروناویروس سارس 2 معرفی شده و در جهت طراحی مشتقات قوی‌تر و همچنین در مطالعه‌های درون‌لوله آزمایشگاهی<sup>47</sup> و درون بدن موجود زنده<sup>48</sup> استفاده شود.

#### منابع

- [1] Chakraborty, I., & Maity, P. (2020). COVID-19 outbreak: Migration, effects on society, global environment and prevention. *Science of the total environment*, 728, 138882.
- [2] Covid, W. (19). *Coronavirus pandemic*.
- [3] Pal, M., Berhanu, G., Desalegn, C., & Kandi, V. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): an update. *Cureus*, 12(3).

47 in vitro

48 In vivo

- (2021). SARS-CoV-2 protein drug targets landscape: a potential pharmacological insight view for the new drug development. *Expert review of clinical pharmacology*, 14(2), 225-237.
- [15] Rohaim, M. A., El Naggat, R. F., Clayton, E., & Munir, M. (2021). Structural and functional insights into non-structural proteins of coronaviruses. *Microbial pathogenesis*, 150, 104641.
- [16] Lichimo, K. (2022). 3CLpro: The discovery of host cell substrates and its relevance as a drug target for SARS-CoV-2 variants of concern. *Undergraduate Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 6.
- [17] Razali, R., Asis, H., & Budiman, C. (2021). Structure-function characteristics of SARS-CoV-2 proteases and their potential inhibitors from microbial sources. *Microorganisms*, 9(12), 2481.
- [18] ul Qamar, M. T., Alqahtani, S. M., Alamri, M. A., & Chen, L. L. (2020). Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *Journal of pharmaceutical analysis*, 10(4), 313-319.
- [19] Goyal, B., & Goyal, D. (2020). Targeting the dimerization of the main protease of coronaviruses: a potential broad-spectrum therapeutic strategy. *ACS combinatorial science*, 22(6), 297-305.
- [20] Turlington, M., Chun, A., Tomar, S., Eggler, A., Grum-Tokars, V., Jacobs, J., ... & Stauffer, S. R. (2013). Discovery of N-(benzo [1, 2, 3] triazol-1-yl)-N-(benzyl) acetamido phenyl carboxamides as severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) 3CLpro inhibitors: identification of ML300 and noncovalent nanomolar inhibitors with an induced-fit binding. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(22), 6172-6177.
- [21] Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., & Sauerhering, L. & Hilgenfeld, R. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. *Science*, 368(6489), 409-412.
- [22] Harnkit, N., Khongsontsi, T., Masuwan, N., Prasartkul, P., Noikaew, T., & Chumnanpuen, P. (2022). Virtual Screening for SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitory Peptides from the Putative Hydrolyzed Peptidome of Rice Bran. *Antibiotics*, 11(10), 1318.
- [23] Hernández González, J. E., Eberle, R. J., Willbold, D., & Coronado, M. A. (2022). A computer-aided approach for the discovery of D-peptides as inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *Frontiers in molecular biosciences*, 8,
- [4] Dehelean, C. A., Lazureanu, V., Coricovac, D., Mioc, M., Oancea, R., Marcovici, I., ... & Cretu, O. (2020). SARS-CoV-2: repurposed drugs and novel therapeutic approaches—insights into chemical structure—biological activity and toxicological screening. *Journal of clinical medicine*, 9(7), 2084.
- [5] Beigel, J. H., Tomashek, K. M., Dodd, L. E., Mehta, A. K., Zingman, B. S., Kalil, A. C., ... & Lane, H. C. (2020). Remdesivir for the treatment of Covid-19—preliminary report. *New England Journal of Medicine*, 383(19), 1813-1836.
- [6] Cavalcanti, A. B., Zampieri, F. G., Rosa, R. G., Azevedo, L. C., Veiga, V. C., Avezum, A., ... & Berwanger, O. (2020). Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 383(21), 2041-2052.
- [7] Horby, P., Lim, W. S., Emberson, J., Mafham, M., Bell, J., Linsell, L., ... & Landray, M. J. (2020). Effect of Dexamethasone in Hospitalized Patients with COVID-19: Preliminary Report. *medRxiv*. 2020; 2020.06. 22.20137273. Publisher Full Text.
- [8] Aygün, İ., Kaya, M., & Alhajj, R. (2020). Identifying side effects of commonly used drugs in the treatment of Covid 19. *Scientific reports*, 10(1), 21508.
- [9] Kumari, M., Lu, R. M., Li, M. C., Huang, J. L., Hsu, F. F., Ko, S. H., ... & Wu, H. C. (2022). A critical overview of current progress for COVID-19: development of vaccines, antiviral drugs, and therapeutic antibodies. *Journal of biomedical science*, 29(1), 68.
- [10] Yu, W., & MacKerell, A. D. (2017). Computer-aided drug design methods. *Antibiotics: methods and protocols*, 85-106.
- [11] Lin, Y. (2022). Review of Modern Computer-aided Drug Design Methods. *International Journal of Biology and Life Sciences*, 1(1), 47-50.
- [12] Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J. R., & Hilgenfeld, R. (2003). Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science*, 300(5626), 1763-1767.
- [13] Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., ... & Yang, H. (2020). Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 582(7811), 289-293.
- [14] Chakraborty, C., Bhattacharya, M., Mallick, B., Sharma, A. R., Lee, S. S., & Agoramoorthy, G.

- [32] Khamto, N., Utama, K., Tateing, S., Sangthong, P., Rithchumpon, P., Cheechana, N., ... & Meepowpan, P. (2023). Discovery of Natural Bisbenzylisoquinoline Analogs from the Library of Thai Traditional Plants as SARS-CoV-2 3CLPro Inhibitors: In Silico Molecular Docking, Molecular Dynamics, and In Vitro Enzymatic Activity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 63(7), 2104-2121.
- [33] Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.
- [34] Jo, S., Kim, S., Shin, D. H., & Kim, M. S. (2020). Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 35(1), 145-151.
- [35] Kolarič, A., Jukić, M., & Bren, U. (2022). Novel small-molecule inhibitors of the SARS-CoV-2 spike protein binding to neuropilin 1. *Pharmaceuticals*, 15(2), 165.
- [36] Ampornanai, K., Meng, X., Shang, W., Jin, Z., Rogers, M., Zhao, Y., ... & Samar Hasnain, S. (2021). Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease by ebsele and its derivatives. *Nature communications*, 12(1), 3061.
- [37] Jin, Z., Zhao, Y., Sun, Y., Zhang, B., Wang, H., Wu, Y., ... & Rao, Z. (2020). Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur. *Nature structural & molecular biology*, 27(6), 529-532.
- [38] Ramos-Guzmán, C. A., Ruiz-Pernía, J. J., & Tuñón, I. (2021). Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease with ketone-based inhibitors unveiled by multiscale simulations: insights for improved designs. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(49), 25933-25941.
- [39] Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., ... & Yang, H. (2020). Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 582(7811), 289-293.
- [40] Kumar, A., Rai, A., Khan, M. S., Kumar, A., Haque, Z. U., Fazil, M., & Rabbani, G. (2022). Role of herbal medicines in the management of patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of traditional and complementary medicine*, 12(1), 100-113.
- [41] Zrig, A. (2022). The effect of phytochemicals of medicinal plants on coronavirus (2019-NCOV) infection. *Pharmaceutical chemistry journal*, 55(10), 1080-1166.
- [24] Gutierrez-Villagomez, J. M., Campos-García, T., Molina-Torres, J., López, M. G., & Vázquez-Martínez, J. (2020). Alkamides and piperamides as potential antivirals against the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *The journal of physical chemistry letters*, 11(19), 8008-8016.
- [25] Antonopoulou, I., Sapountzaki, E., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2022). Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (Mpro) by repurposing/designing drug-like substances and utilizing nature's toolbox of bioactive compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 1306-1344.
- [26] Bahun, M., Jukić, M., Oblak, D., Kranjc, L., Bajc, G., Butala, M., ... & Ulrih, N. P. (2022). Inhibition of the SARS-CoV-2 3CLpro main protease by plant polyphenols. *Food chemistry*, 373, 131594.
- [27] Santana, K., Do Nascimento, L. D., Lima e Lima, A., Damasceno, V., Nahum, C., Braga, R. C., & Lameira, J. (2021). Applications of virtual screening in bioprospecting: facts, shifts, and perspectives to explore the chemo-structural diversity of natural products. *Frontiers in Chemistry*, 9, 662688.
- [28] Gupta, S., Singh, A. K., Kushwaha, P. P., Prajapati, K. S., Shuaib, M., Senapati, S., & Kumar, S. (2021). Identification of potential natural inhibitors of SARS-CoV2 main protease by molecular docking and simulation studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(12), 4334-4345.
- [29] Gurung, A. B., Ali, M. A., Lee, J., Farah, M. A., & Al-Anazi, K. M. (2020). Unravelling lead antiviral phytochemicals for the inhibition of SARS-CoV-2 Mpro enzyme through in silico approach. *Life sciences*, 255, 117831.
- [30] Jukić, M., Janežič, D., & Bren, U. (2021). Potential novel thioether-amide or guanidine-linker class of sars-cov-2 virus rna-dependent rna polymerase inhibitors identified by high-throughput virtual screening coupled to free-energy calculations. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11143.
- [31] Jiménez-Avalos, G., Vargas-Ruiz, A. P., Delgado-Pease, N. E., Olivos-Ramirez, G. E., Sheen, P., Fernández-Díaz, M., ... & Zimic, M. (2021). Comprehensive virtual screening of 4.8 k flavonoids reveals novel insights into allosteric inhibition of SARS-CoV-2 MPRO. *Scientific Reports*, 11(1), 15452.

- Statistics, 2(6), 719-722.
- [50] Bornot, A., Etchebest, C., & De Brevern, A. G. (2011). Predicting protein flexibility through the prediction of local structures. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(3), 839-852.
- [51] Burgoyne, N. J., & Jackson, R. M. (2006). Predicting protein interaction sites: binding hot-spots in protein-protein and protein-ligand interfaces. *Bioinformatics*, 22(11), 1335-1342.
- [52] Harnkit, N., Khongsonthi, T., Masuwan, N., Prasartkul, P., Noikaew, T., & Chumnpanuen, P. (2022). Virtual Screening for SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitory Peptides from the Putative Hydrolyzed Peptidome of Rice Bran. *Antibiotics*, 11(10), 1318.
- [53] Lau, J. L., & Dunn, M. K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(10), 2700-2707.
- [54] Al Musaimi, O., Lombardi, L., Williams, D. R., & Albericio, F. (2022). Strategies for Improving Peptide Stability and Delivery. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1283.
- [55] Mahlapuu, M., Björn, C., & Ekblom, J. (2020). Antimicrobial peptides as therapeutic agents: Opportunities and challenges. *Critical reviews in biotechnology*, 40(7), 978-992.
- [56] S. Ketabchi and M. Papari Moghadamfard. (2021) Medicinal Plants Effective in the Prevention and Control of Coronaviruses. *Complement. Med. J.*, vol. 10, no. 4, pp. 296-307.
- [57] Zrieq, R., Ahmad, I., Snoussi, M., Noumi, E., Iriti, M., Algahtani, F. D., ... & Kadri, A. (2021). Tomatidine and patchouli alcohol as inhibitors of SARS-CoV-2 enzymes (3CLpro, PLpro and NSP15) by molecular docking and molecular dynamics simulations. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10693.
- 1084.
- [42] Süntar, I. (2020). Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 19(5), 1199-1209.
- [43] Hossain, R., Sarkar, C., Hassan, S. M. H., Khan, R. A., Arman, M., Ray, P., ... & Calina, D. (2022). In silico screening of natural products as potential inhibitors of SARS-CoV-2 using molecular docking simulation. *Chinese journal of integrative medicine*, 28(3), 249-256.
- [44] Ghosh, R., Chakraborty, A., Biswas, A., & Chowdhuri, S. (2021). Evaluation of green tea polyphenols as novel corona virus (SARS CoV-2) main protease (Mpro) inhibitors—an in silico docking and molecular dynamics simulation study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(12), 4362-4374.
- [45] Su, H., Yao, S., Zhao, W., Li, M., Liu, J., Shang, W., ... & Xu, Y. (2020). Discovery of baicalin and baicalein as novel, natural product inhibitors of SARS-CoV-2 3CL protease in vitro. *BioRxiv*, 2020-04.
- [46] Listiyani, P., Kharisma, V. D., Ansori, A. N. M., Widyananda, M. H., Probojati, R. T., Murtadlo, A. A. A., ... & Zainul, R. (2022). In silico phytochemical compounds screening of *Allium sativum* targeting the Mpro of SARS-CoV-2. *Pharmacognosy Journal*, 14(3).
- [47] Mlozi, S. H. (2022). The role of natural products from medicinal plants against COVID-19: traditional medicine practice in Tanzania. *Heliyon*, 8(6).
- [48] Schmid, N., Eichenberger, A. P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A. E., & Van Gunsteren, W. F. (2011). Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European biophysics journal*, 40, 843-856.
- [49] Meza, J. C. (2010). *Steepest descent*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational

# Evaluation of the efficacy of available plant compounds as SARS-CoV-2 main protease inhibitors

Hamed Shahriarpour<sup>1</sup>, Hossein Naderi-Manesh<sup>2</sup>, Seyed Shahriar Arab<sup>3\*</sup>,  
Najme Dehghanbanadaki<sup>4</sup>

1- MSc in Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Full Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- PhD in Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

\*Corresponding Author: sh.arab@modares.ac.ir  
Tel: +982182883494

Received:2023/4/17

Accepted: 2024/2/26

## Abstract:

The COVID-19 pandemic has created a global health crisis, and developing effective treatments is essential to prevent the spread of the disease and save millions of lives. One of the key proteins involved in the replication cycle of SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19, is the main protease enzyme, 3CL<sup>pro</sup>. Due to its high importance, this enzyme is the subject of molecular, structural, and clinical investigations, and efforts have been made to develop drugs that can inhibit its activity. One such drug is the chemical compound N3, which has been found to have a high inhibitory effect against 3CL<sup>pro</sup>. However, traditional medicine perspectives on this issue have been less explored. In this research, molecular docking interaction simulation and all-atom molecular dynamics (MD) simulation were conducted to study the potential inhibitory capability of generally available 21 plant-extracted compounds against the 3CL<sup>pro</sup> enzyme. Three compounds with the highest inhibition probability were selected from the molecular docking results and subjected to 100 ns of MD simulation to investigate their stability and structural-dynamic-energetic features. Beside the complexes stability, the results from the simulation demonstrated that, all our selected three compounds induce N3 comparable structural-dynamics characteristics to 3CL<sup>pro</sup> and, therefore, are expected to have a similar inhibitory ability against this enzyme. Compound number 5 was found to have the most favorable binding energy and was proposed as the best plant substitute for N3. The results from this research can be directly used to design experimental research for 3CL<sup>pro</sup> enzyme inhibition, saving the time-financial cost.

**Keywords:** SARS-CoV-2, Main protease, Inhibitor, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulation