



Идентификация флавоноида цитрусовых как потенциального ингибитора протеазы SARS-CoV-2 main с помощью вычислений

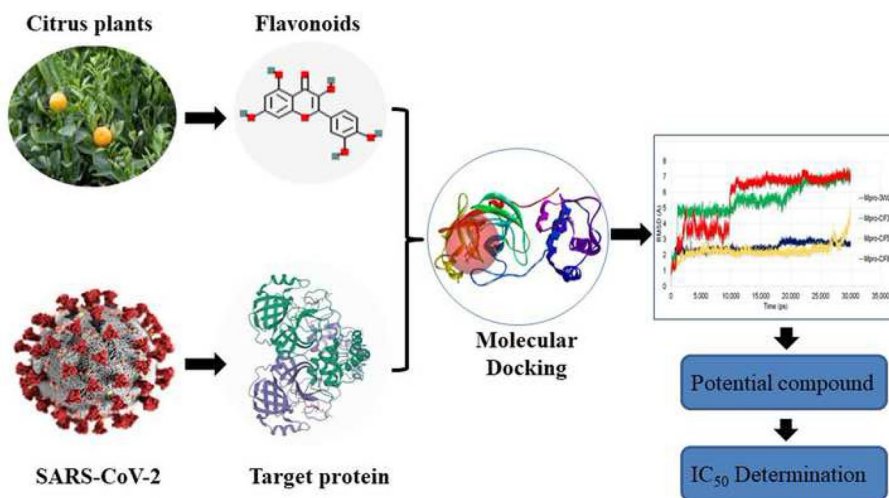
Neelutpal Gogoi¹ · Пурвита Чоудхури² · Ашис Кумар Госвами¹ · Арагоор Das^{1,3} · Дипак Четия¹ · Бхаскарджйоти Гогои⁴

Получено: 13 августа 2020 г. / Принято: 20 октября 2020 г. © Springer
Nature Switzerland AG 2020

Аннотация

Хотя разработка вакцины ведется с головокружительной скоростью, в настоящее время нет эффективного противовирусного препарата для лечения тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом 2 (SARS-CoV-2), вызывающим COVID-19. Таким образом, настоящее исследование направлено на изучение возможностей, предлагаемых доступными в природе и многочисленными флавоноидными соединениями в качестве перспективного противовирусного препарата для борьбы с вирусом. Библиотеку из 44 флавоноидов цитрусовых подвергли скринингу против высококонсервативной основной протеазы (M_{профи}) SARS-CoV-2 с помощью молекулярного докинга. Соединения, показавшие лучшую энергию CDocker, чем сокристаллический ингибитор M_{профи} были дополнительно подтверждены гибкой стыковкой внутри активного сайта; с последующей оценкой сходства и токсичности препарата параметры. Нетоксичные соединения были дополнительно подвергнуты моделированию молекулярной динамики и предсказанной активности (IC₅₀) с использованием анализа 3D-QSAR. Впоследствии были выполнены водородные связи и анализ дегидратации лучшего соединения, чтобы оценить сродство связывания с M_{профи}. Было обнаружено, что из 44 флавоноидов цитрусовых пять соединений показали более низкую энергию связи с M_{профи} чем сокристаллический лиганд. Кроме того, эти соединения также образуют H-связи с двумя важными каталитическими остатками His41 и Cys145 активных центров M_{профи}. Три соединения, прошедшие фильтр сходства с наркотиками, показали стабильную конформацию во время моделирования МД. Среди них самый низкий прогнозируемый IC₅₀ значение наблюдали для Таксифолина. Таким образом, это исследование предполагает, что таксифолин может быть потенциальным ингибитором основной протеазы SARS-CoV-2 и может быть в дальнейшем анализируется в экспериментах *in vitro* и *in vivo* для управления продолжающейся пандемией.

Графический аннотация



Ключевые слова COVID-19 · SARS-CoV-2 · Флавоноиды · Основная протеаза · Молекулярный докинг · Молекулярная динамика

Расширенная информация об авторе доступна на последней странице статьи.

Введение

Пандемия COVID-19, вызванная SARS-CoV-2, превратилась в глобальную угрозу, от которой страдают более 17 миллионов человек во всем мире [1]. Быстрое и динамичное распространение болезни озадачило руководителей здравоохранения во всем мире. С участием 668 910 случаев смертности во всем мире на сегодняшний день (6 августа 2020 г.), и в связи с отсутствием эффективного лечения поиски лекарства или вакцины против SARS-CoV-2 ускорились [1]. В этот кризис возобновившийся интерес к традиционным фитомедицинским растениям или натуральным соединениям привлек значительное внимание из-за их лечебных свойств, низкой токсичности и побочных эффектов [2 , 3]. В настоящее время антагонистический подход путем блокирования целостной системы репликации SARS-CoV-2 рассматривается как одна из эффективных противовирусных терапевтических стратегий. SARS-CoV-2 представляет собой вирус с одноцепочечной РНК с положительным смыслом. Как и любой другой вирус, он использует аппарат клетки-хозяина для трансляции своего большого полипротеина, необходимого для размножения. Однако, чтобы быть функциональным, полипротеин должен расщепляться основной вирусной протеазой (M_{профи}) и другие папаиноподобные протеазы. Поскольку ингибирование M_{профи} остановит репликацию вируса, этот фермент стал одной из наиболее охарактеризованных и привлекательных мишеней для лечения SARS-CoV-2 [4 , 5].

Учитывая острую необходимость в эффективном терапевтическом средстве против вируса SARS-CoV-2, несколько исследователей подчеркнули важность природных соединений [2 , 3 , 6]. Натуральные растительные продукты на протяжении поколений использовались в традиционных китайских, а также в индийских аюрведических лекарствах в качестве противовирусных препаратов. Более того, природные соединения также являются основным источником большого количества современных лекарств. Важным природным соединением, заслуживающим упоминания, является хлорохин и гидроксихлорохин, полученные из вторичных метаболитов хинного дерева, которые проходят клинические испытания и продемонстрировали потенциальные свойства против SARS-CoV-2 [7]. Среди наиболее легко доступных вторичных метаболитов - флавоноиды, в большом количестве обнаруженные в цитрусовых, и исследования продемонстрировали их противовирусную активность [8 , 9]. Фактически, в нескольких исследованиях обсуждалась важность флавоноидов как противовирусного средства против других респираторных заболеваний, включая SARS-CoV-1 [10 , 11]. Следовательно, изучение флавоноидов цитрусовых в качестве ингибиторов SARS-CoV-2 может оказаться полезным в поиске альтернативного варианта лечения первой линии.

Вычислительные подходы в неотложных обстоятельствах предоставляют прекрасную возможность для проверки гипотезы о потенциальном лекарственном действии природных соединений. Настоящее исследование направлено на выявление предполагаемого соединения-кандидата в качестве потенциального терапевтического агента для COVID-19 путем использования компьютерных подходов к скринингу природных флавоноидных соединений цитрусовых в качестве потенциальных ингибиторов основной протеазы (M_{профи}) SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Выбор и подготовка библиотеки соединений флавоноидных соединений

В общей сложности 44 флавоноида были собраны из уже опубликованных статей для создания библиотеки соединений [12]. Библиотека флавоноидов была выбрана на основе химического скелета C₆-C₃-C₆. Хотя библиотека флавоноидных соединений кажется довольно маленькой, эти соединения химически похожи на сокристаллический ингибитор SARS-CoV-2 M_{профи} И, таким образом, увеличивает вероятность обнаружения потенциального ингибитора. Была подготовлена база данных библиотеки соединений и проведена минимизация энергии с использованием стандартного протокола Discovery Studio 2018 (DS v 2018) [13].

Подготовка целевого фермента и выбор сайта связывания

Рентгеновская кристаллическая структура фермента основной протеазы (M_{профи}), (ID PDB: 6M2N), сокристаллизованный с флавоноидным типом (C₆-C₃-C₆) ингибитор (3WL) был получен с веб-сайтов банка данных белков [14 , 15]. Целевой фермент был очищен, подготовлено и сведено к минимуму потребление энергии с использованием стандартного протокола DS v 2018 перед исследованием стыковки [16]. Сфера активного сайта связывания с координатами X: -33,0907, Y: -63,8424, Z: 41,7832 и радиусом 9,2 Å была выбрана вокруг сокристаллического ингибитора (3WL), присутствующего с ферментом для стыковки.

Стыковка на основе моделирования библиотеки соединений

Вся библиотека соединений была стыкована с мишенью с помощью основанного на моделировании протокола стыковки CDocker DS v 2018, который использует алгоритм молекулярной динамики (MD) на основе CHARMm для стыковки соединений с активным сайтом связывания рецептора [17]. После стыковки позиции связывания соединений анализировали и сравнивали с позициями связывания сокристаллического ингибитора (3WL) мишени.

Гибкая стыковка и расчет свободной энергии связи

В протоколе CDocker целевой белок или фермент рассматривается как жесткая структура, что может повлиять на точность позиционирования и оценки лигандов в процессе стыковки. Однако в природе белки или ферменты не являются жесткими, и, следовательно, гибкость белков является основным фактором, влияющим на

методом перекрестной проверки методом частичных наименьших квадратов (PLS) LOO (исключение-один). Фотка 50 значения служили зависимыми переменными для построения модели, которая проверяет набор тестов для стабильность и предсказуемость.

Анализ атомных вкладов в средство связывания

Различные атомы соединения вносят индивидуальный вклад в средство связывания и стабильность в активном сайте связывания целевого белка. Эти свойства могут предоставить ценную информацию для выбора соединения в качестве ведущего кандидата для дальнейшего процесса разработки и открытия лекарств. Роль конкретных атомов в общей аффинности связывания в лучших позах для выбранных соединений вместе с сокристаллическим ингибитором 3WL была рассчитана с использованием инструмента SeeSAR bioinformatics [28].

Результаты и обсуждение:

В предварительном исследовании стыковки, энергия CDocker, а также энергия взаимодействия CDocker были рассчитаны и учтены для скрининга соединений. CDocker energy из Discovery Studio (DS) v 2018 предоставляет сравнительно точную информацию о средстве связывания соединений в активном центре целевых белков [17]. С другой стороны, энергия взаимодействия CDocker обеспечивает

Таблица 1 Предварительные результаты стыковки пяти основных флавоноидных соединений на основе моделирования

Составной код	Составной имя	CDocker Энергия (ккал / энергия действия моль)	CDocker Inter- (ккал / моль)
3WL	-	-30,6785	-31,338
CF3	Таксифолин	-30,8173	-36,7392
CF5	Эриодиктиол	-32,5776	-37,1241
CF7	Isoscutellarein	-33,0279	-36,7776
CF8	Лютеолин	-32,9575	-36,1835
CF10	Кверцетин	-33,8277	-37,0433

Таблица 2 Гибкая стыковочная энергия связи пяти лучших флавоноидных соединений по сравнению с сокристаллическим ингибитором

Соединение	CDocker энергия	CDocker взаимодействия (ккал / моль)	Оценка LibDock	Нет из H-Bond	Привязка энергия (ккал / моль)
3WL	-34,8212	-35,2188	102,348	2	-24,9866
Кверцетин	-39,6003	-42,9988	102,055	4	-31,5229
Таксифолин	-38,3342	-45,9748	109,909	5	-38,6097
Isoscutellarein	-37,2348	-38,4 · 106	92,9587	2	-25,8374
Эриодиктиол	-37,1527	-42,5989	97,6221	4	-39,0123
Лютеолин	-36,3285	-41,5773	104,515	6	-35,0685

рисунок 1 Стыковочное взаимодействие а 3WL, б Таксифолин (CF3), с Эриодиктиол (CF5), d Иэоскутеллареин (CF7), e Лютеолин (CF8) и F Кверцетин (CF10) с M про. Зеленая пунктирная линия указывает на Н-связи между лигандами и взаимодействующими остатками M профи

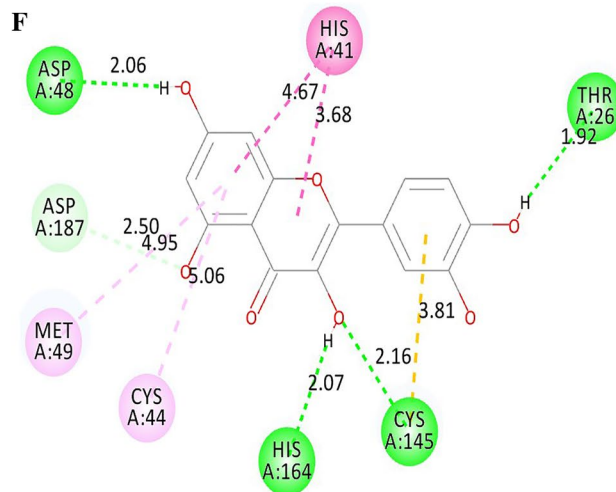
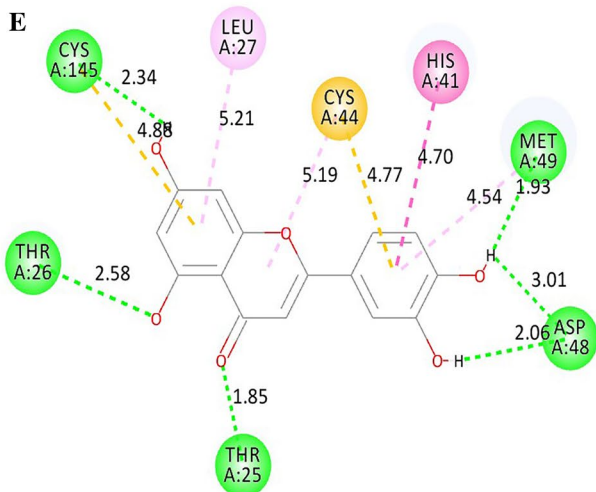
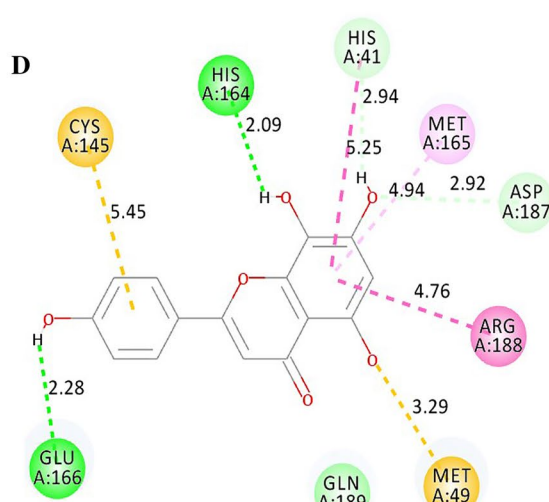
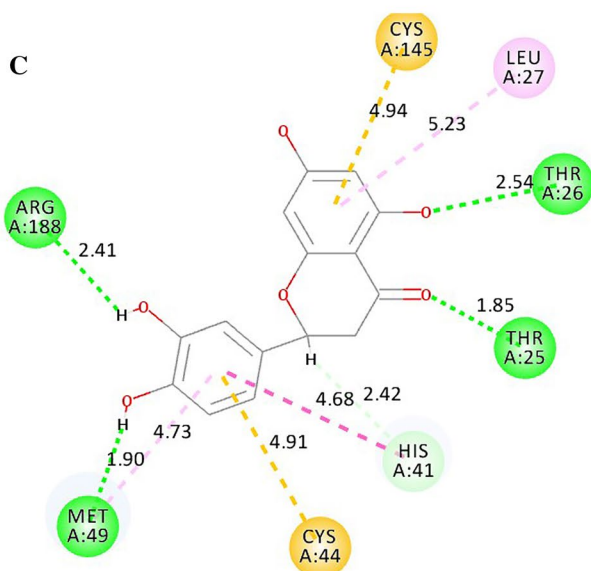
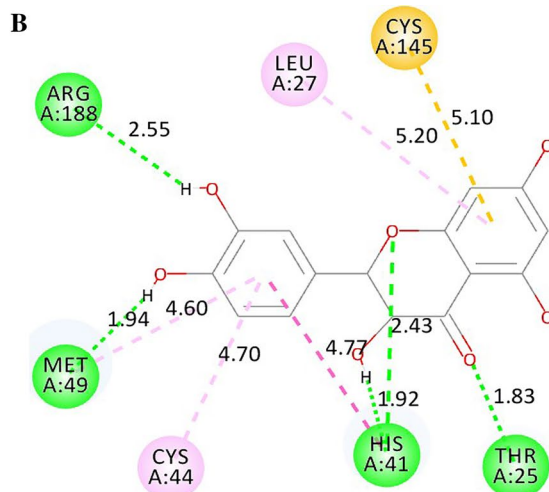
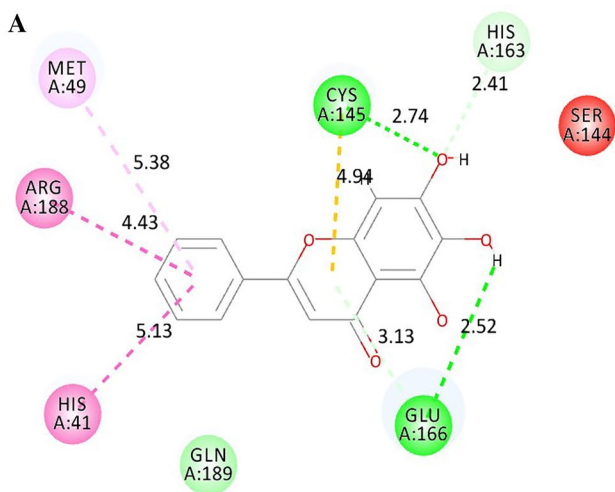
различные несвязанные взаимодействия внутри сайта связывания целевого сайта белка [29]. В этом исследовании, поскольку соединениями для скрининга были флавоноидные соединения цитрусовых, флавоноидоподобный сокристаллический лиганд 3WL M профи использовался в качестве контроля для всего исследования. Молекулярный докинг показал, что 5 соединений из 44 выбранных флавоноидных соединений видов цитрусовых показали лучшую энергию CDocker и энергию взаимодействия CDocker, чем сокристаллический лиганд 3WL (Таблица 1).

Принимая во внимание динамический характер физиологических условий, 5 лучшим соединениям было разрешено повторно совмещаться с целевым белком в гибком режиме. Во время гибкой стыковки остатки сайта связывания целевого белка оставались гибкими. Гибкий стыковочный анализ 5 лучших соединений также показал лучшую энергию CDocker, а также энергию взаимодействия CDocker (Таблица 2). Энергия связи соединений с целевым белком M профи был рассчитан для понимания спонтанности образования комплекса лекарство-мишень / лиганд-рецептор, предполагающего стабильный комплекс лекарство-мишень. Расчетная энергия связи соединений показала более низкую энергию связи по сравнению с контрольным ингибитором сокристалла 3WL, показанным в таблице. 2.

В настоящем исследовании 5 лучших соединений образовали большее количество Н-связей с целевым белком, чем сокристаллический ингибитор 3WL. Это может свидетельствовать о том, что тестируемые соединения обладают более высокой переносимостью против предполагаемых мутаций целевого белка, чем 3WL [30]. Взаимодействие и количество образованных Н-связей для 5 экранированных соединений с M профи

показаны на рис. 1. На рис. 1 было замечено, что соединения Taxifo-

лин, эриодиктиол, лютеолин и кверцетин образуют 4 или более Н-связей с активным центром SARS-CoV-2 M профи, тогда как соединения изоскутеллареин и сокристаллический ингибитор 3WL образовывали 2 Н-связи с целевым белком. Анализ остатков, участвующих во взаимодействиях между соединениями и M профи, показали, что все соединения взаимодействуют с двумя важными каталитическими остатками His41 и Cys145



активные центры $M_{\text{про}}$. Эти два остатка присутствуют в каталитическом домене SARS-CoV-2 $M_{\text{про}}$ и активно участвуют в каталитической активности $M_{\text{про}}$. Следовательно, связывание флавоноидных соединений с этими остатками может снизить каталитическую активность $M_{\text{про}}$ что в конечном итоге приведет к снижению репликации вируса.

Затем 5 соединений, показывающих наилучшие результаты с точки зрения энергии CDocker, энергии взаимодействия CDocker, расчетной энергии связи и количества H-связей, были подвергнуты оценке сходства лекарственного средства и оценке различных параметров токсичности. Было замечено, что 3 соединения, а именно таксифолин, эриодиктиол и лютеолин, не проявили какой-либо токсичности в отношении параметров токсичности, использованных в исследовании. С другой стороны, соединения Isoscutellarein и Quercetin показали наличие мутагенных свойств. Кверцетин также показал наличие онкогенных свойств. Результаты прогноза токсичности и анализа свойств лекарственного средства приведены в таблице 3. Среди всех проверенных соединений таксифолин обладал самой высокой вероятностью лекарственного средства, за ним следовали изоскутеллареин и лютеолин. На основе набора данных для обучения, используемого ORISIS Data Warriort, соединения с более высокими или положительными значениями вероятности лекарственного средства считаются хорошими кандидатами на лекарство. Поскольку соединения Isoscutellarein и Quercetin показали наличие токсических эффектов, мы не рассматривали эти соединения для дальнейшего анализа. Нетоксичные соединения, а именно таксифолин, эриодиктиол и лютеолин, были дополнительно подвергнуты исследованиям с помощью моделирования молекулярной динамики.

Моделирование молекулярной динамики было проведено, чтобы понять, как лиганды связываются с рецептором, имитируя эксперименты *in vitro* и *in vivo* [4]. Таким образом, RMSD, RMSF и ROG модели $M_{\text{про}}$ -комплексы лигандов рассчитывали за период моделирования 30 нс и сравнивали с контролем ($M_{\text{про}}$ -3WL) для наблюдения за стабильностью комплексов. Для расчета RMSD, RMSF и ROG комплексов использовали полные комплексы белок-лиганд. После завершения моделирования были проанализированы графики RMSD для всех соединений, где было обнаружено, что $M_{\text{про}}$ -3WL и $M_{\text{про}}$ -CF5 (Eriodictyol) имел почти аналогичные отклонения с контрольным комплексом ($M_{\text{про}}$ -3WL) в период моделирования. Однако $M_{\text{про}}$ -CF3 (таксифолин) и $M_{\text{про}}$ -CF8 (лютеолин) имел сравнительно более высокое отклонение

чем $M_{\text{про}}$ -3WL; где $M_{\text{про}}$ -CF8 потребовалось больше времени (почти 10 нс) для достижения состояния плато (рис. 2 А). Колебания отдельных остатков в течение периода моделирования были нанесены на график, где RMSF остатков для $M_{\text{про}}$ -3WL и $M_{\text{про}}$ -CF5 имели практически схожий рисунок с минимальными отклонениями друг от друга. Для комплекса $M_{\text{про}}$ -CF3 и $M_{\text{про}}$ -CF8, наблюдались значительные отклонения, которые могут указывать на то, что присутствие лигандов влияло на стабильность фермента $M_{\text{про}}$ и изменил его динамическое поведение. Примечательно, что повторный анализ комплексов белок-лиганд показал аналогичные отклонения RMSD, указывающие на сходимость результатов. Сравняя RMSD комплексов, $M_{\text{про}}$ -CF8 показывал колебания по регионам. $M_{\text{про}}$ -CF3 показал значительные колебания в пределах остатков 248–256 (рис. 2 Б). Эти данные также подтверждаются расчетным радиусом инерции (ROG) для $M_{\text{про}}$ -лигандные комплексы (рис. 2 С).

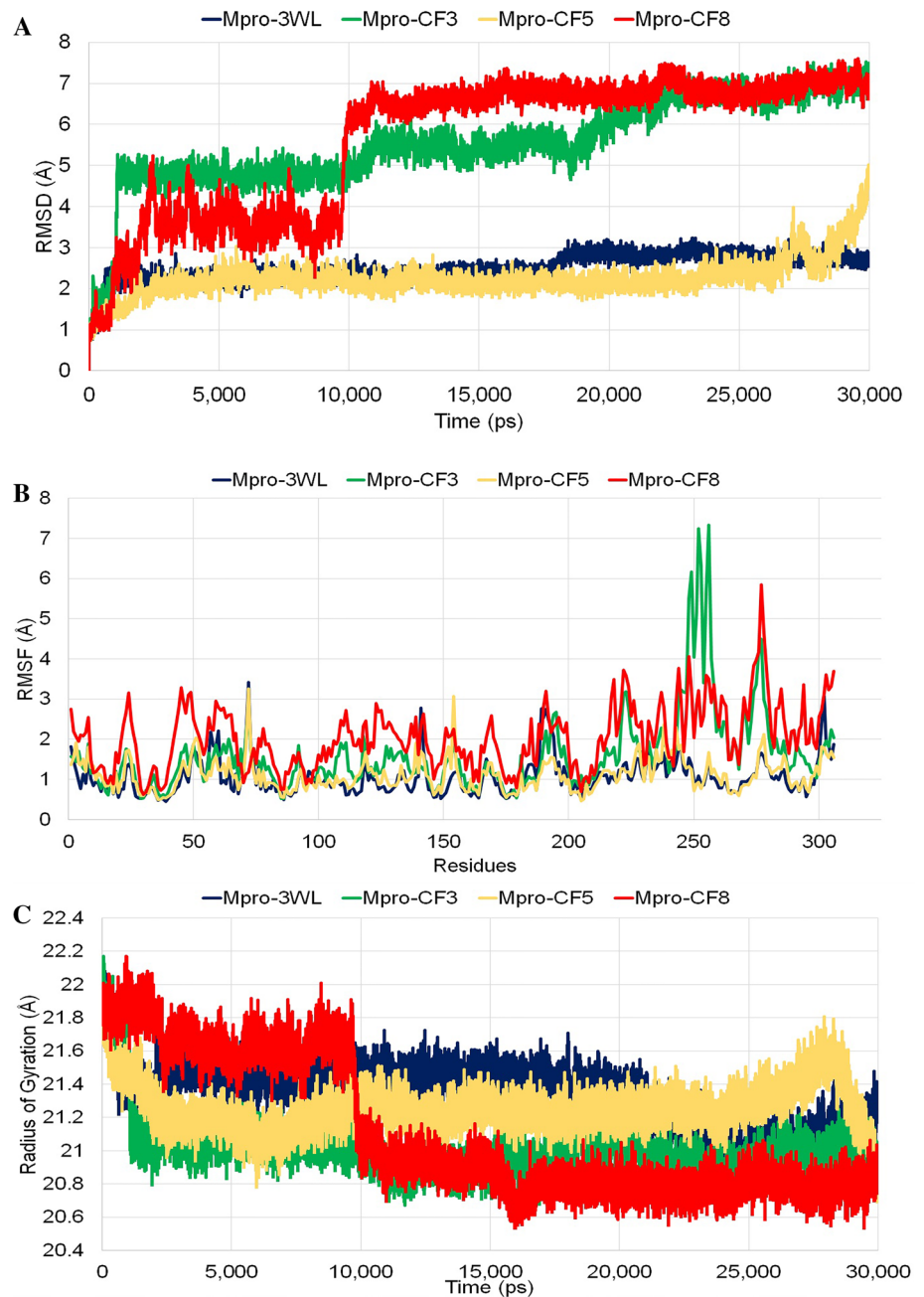
В данной работе мы дополнительно проанализировали взаимодействие соединений с $M_{\text{про}}$ и проверили образование водородных связей после 30 нс МД моделирования. Картина взаимодействия соединений после МД моделирования в течение 30 нс представлена на рис. 3. После 30 нс МД моделирования сокристаллический лиганд 3WL образовал 4 H-связи, тогда как соединения Таксифолин и Эриодиктиол образовали 7 и 4 H-связи соответственно с целевым белком. Лютеолин образовал 3 H-связи с остатками активного центра SARS-CoV-2 $M_{\text{про}}$ после МД моделирования в течение 30 нс. Хотя все соединения образовывали H-связи с каталитическими остатками, то есть His41 и Cys145, как это наблюдалось во время молекулярного стыковки, но после 30 нс моделирования только таксифолин взаимодействовал с этими остатками, образуя H-связи. Сокристаллический лиганд 3WL образовывал слабое взаимодействие с Cys145 после 30 нс МД моделирования.

Структурные конформации комплексов белок-лиганд до и после МД моделирования также наблюдались при суперпозиции комплексов и показаны на рис. 4. При анализе моделирования методом МД мы проанализировали различные водородные связи, образовавшиеся в активном центре целевых белков с флавоноидными соединениями в процессе моделирования до 30 нс. Количество образованных водородных связей и их расстояния в течение периода моделирования для каждой конформации были получены (рис. 5). В $M_{\text{про}}$ -3WL всего найдено 5 водородных связей комплекса 3WL, из которых 1 H-связь с

Таблица 3 Анализ токсичности и сходства лекарственных средств

Соединение	Сходство с наркотиками	Мутагенный	Онкогенное	Репродуктивный Эффективный	Раздражающий
3WL	0,28194	Никто	Никто	Никто	Никто
Таксифолин	0,44477	Никто	Никто	Никто	Никто
Эриодиктиол	-0,22006	Никто	Никто	Никто	Никто
Isoscutellarein	0,28194	Высоко	Никто	Никто	Никто
Лютеолин	0,28194	Никто	Никто	Никто	Никто
Кверцетин	-0,082832	Высоко	Высоко	Никто	Никто

Рис. 2 а Среднеквадратичное отклонение комплексов рецептор-лиганд; **б** Среднеквадратичные колебания остатков комплексов рецептор-лиганд и **с** Радиус вращения комплексов рецептор-лиганд в течение 30 нс моделирования. Во всех случаях комплекс M_{pro}-3WL представлен синей линией, M_{pro}-CF3 представлен зеленой линией, M_{pro}-CF5 представлен желтой линией, а буква M_{pro}-CF8 представлен красной линией



Остаток Glu166 показал почти постоянное среднее расстояние с небольшим отклонением. Однако другие 4 Н-связи с Thr190, Asn142 и Glu166 первоначально имели очень большое среднее расстояние, но примерно через 18 нс оно уменьшилось и стабилизировалось. В M_{pro}-CF3 комплекс 7 Н-связи наблюдались, где Н-связь с остатком Leu50 показывала существенные отклонения около 10-20 нс и впоследствии стабилизировалась к концу моделирования. В M_{pro}- Наблюдали 4 Н-связи комплекса CF5, среди которых 2 Н-связи с остатком Asp48 оставались стабильными на протяжении всего моделирования. Н-связь с

Остаток Ser46 стабилизировался в течение 4 нс моделирования, в то время как Н-связь с остатком Glu166 оставалась очень нестабильной со значительными колебаниями расстояний на протяжении моделирования. В M_{pro}-CF8 комплекс 3 Н-связи были сформированы, и расстояние связи с Asn119 варьировалось на протяжении моделирования. Связь с Asp48 показала отклонение около 18–26 нс, а затем вернулась в свое предыдущее состояние. Расстояние для водородной связи с Ser46 постепенно уменьшалось до менее 5 Å. Двухмерное взаимодействие, созданное для комплексов до и после моделирования, показало, что число

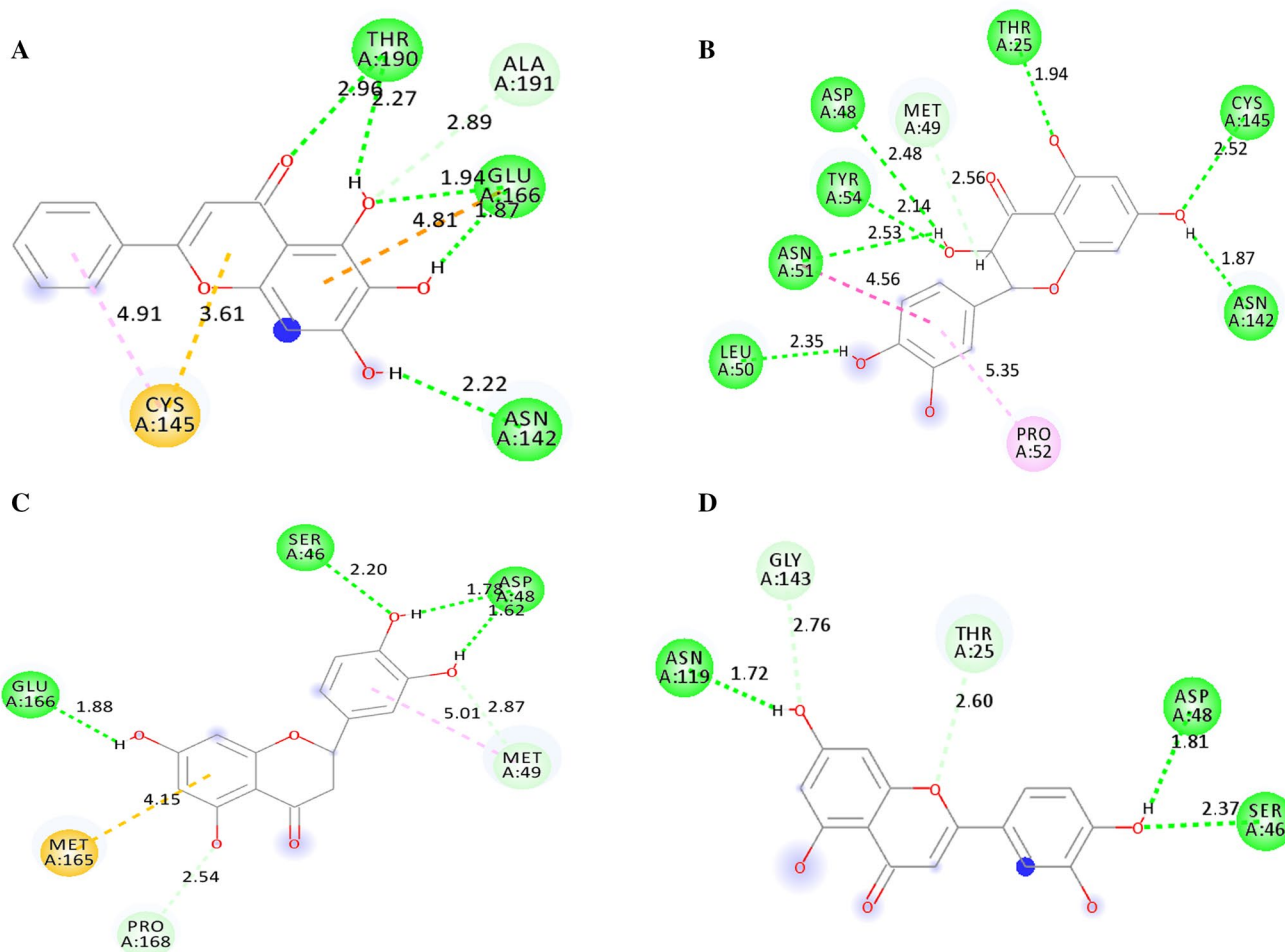


Рис. 3 Взаимодействие а 3WL, б Таксифолин, с Эриодиктиол и д Лутеолин с $M_{\text{про}}$ после МД моделирования в течение 30 нс. Зеленая пунктирная линия указывает на Н-связи между лигандами и взаимодействующими остатками $M_{\text{про}}$

образовавшихся водородных связей увеличилось для $M_{\text{про-3WL}}$ и $M_{\text{про-CF3}}$. Для $M_{\text{про-CF5}}$ количество Н-связей осталось прежним, но взаимодействующие остатки изменились. Но для $M_{\text{про-CF8}}$ количество Н-связей уменьшилось после моделирования.

Во время анализа методом МД-моделирования свободные энергии связи (ΔG) комплексов белок-лиганд рассчитывали до 30 нс с использованием метода на основе MM-PBSA. В результате среднее ΔG комплексов $M_{\text{про-3WL}}$ оказалось равным $-51,1666$ ккал / моль. Среднее ΔG $M_{\text{про-CF3}}$, $M_{\text{про-CF5}}$ и $M_{\text{про-CF8}}$ составили $-60,3367$ ккал / моль, $-68,3025$ ккал / моль и $-55,7587$ ккал / моль, соответственно. Из анализа MM-PBSA было обнаружено, что комплексы, образованные между флавоноидами и мишенью, обладают более низким ΔG чем комплекс рецептор-со-кристаллический лиганд. Это свидетельствует об образовании стабильных

комплексов со спонтанным взаимодействием тестовых лигандов в активном связывающем кармане. Свободные энергии связи (ΔG) комплексов белок-лиганд в период МД-моделирования показаны на рис. 6 .

Прогнозируемая активность (IC_{50}) Содержание соединений определяли с помощью анализа 3D-QSAR. Как IC_{50} значение 3WL пока не сообщается, IC_{50} значение 3WL было предсказано путем создания модели 3D-QSAR из ингибитор размещен на сайте PostEra [26]. Для расчета энергетического потенциала в методе 3D-QSAR использовались трехмерные структуры набора соединений. Рассчитанные потенциальные энергии затем использовались в качестве дескрипторов для построения модели 3D-QSAR для сопоставления 3D-структур и их биологической активности. Сгенерированная модель QSAR дает информацию о корреляции между молекулярным полем и

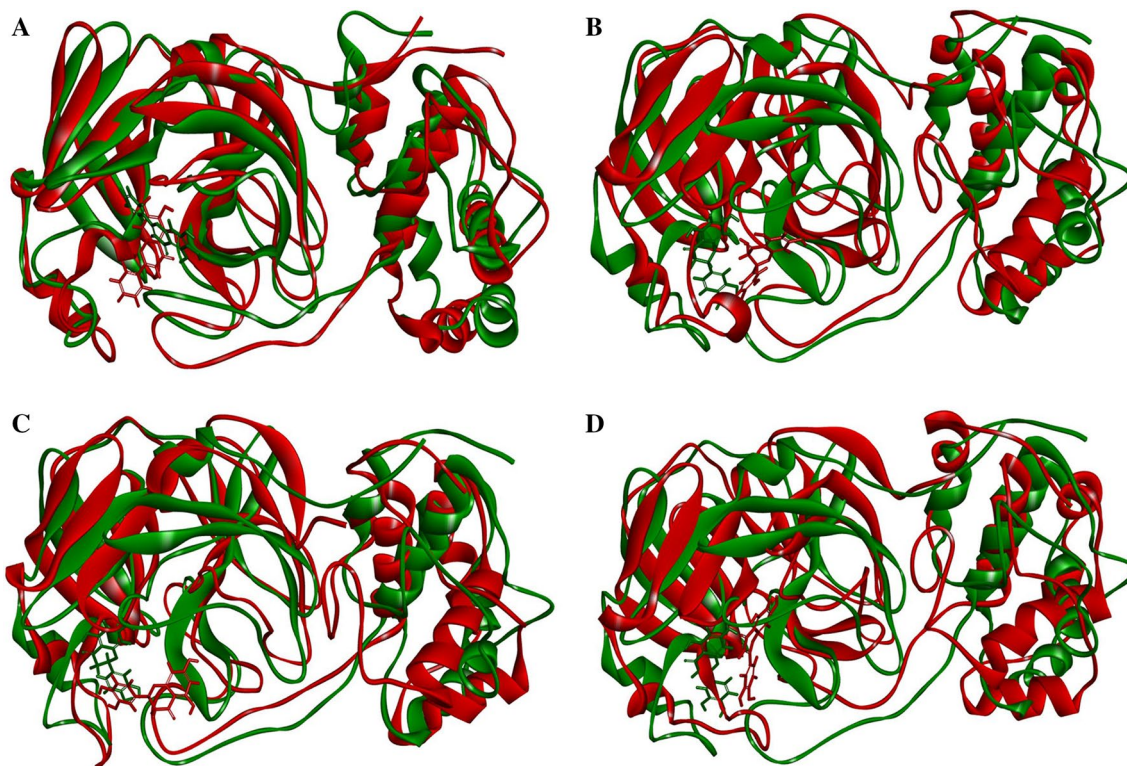


Рис. 4 Суперпозиция белкового лигандного комплекса **а** М_{про}-3WL, **б** М_{про}-CF3, **с** М_{про}-CF5 и **д** М_{про}-CF8. Комплексы зеленого цвета представляю собой комплексы белок-лиганд до моделирования МД, а красные.

цветные комплексы представляют собой комплексы белок-лиганд после 30 нс МД моделирования

биологическая активность соединений [31 год]. В этом исследовании, прогнозируемая активность, т.е. IC₅₀ соединений, а также контроль были определены с использованием следующей линейной уравнение.

$$\text{Активность (прогнозируемая)} = \sum_{i=1}^{N_{EP}} CEP(i) VEP(i) + \sum_{i=1}^{N_{VDW}} CVDW(i) VVDW(i)$$

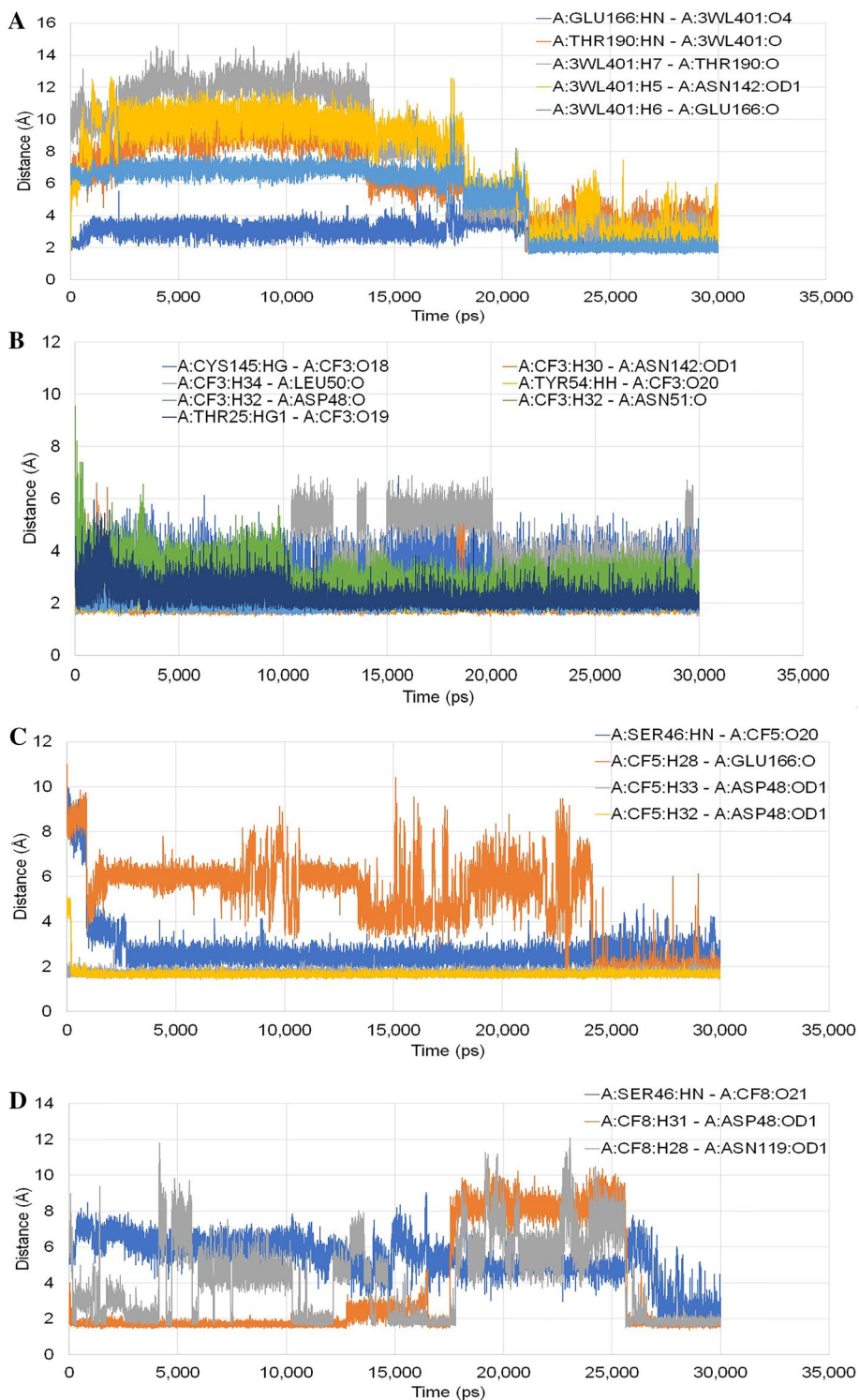
где НЭП: количество дескрипторов электростатического потенциала (ЭП); CEP (i): коэффициент модели для дескриптора электростатического потенциала i; VEP: значение электростатического потенциала в точке сетки; NVDW: количество дескрипторов ван-дер-ваальсова (VDW) взаимодействия; CVDW (i): модельный коэффициент для дескриптора VDW i; VVDW: энергия взаимодействия Ван-дер-Ваальса в узле сетки.

Линейный график обучающей выборки и тестовой выборки изображен на рис. 7. Решительный p_2 ценность для обучения

набор оказался равным 0,912, а для набора тестов - 0,846 во время валидации. Из 3D-QSAR analysis, прогнозируемая IC₅₀ значение 3WL оказалось 5,98 мкМ, тогда как соединение Таксифолин проявляло быть 9,63 мкМ, затем лютеолин (14,47 мкМ) и Eriodicтиол (16,08 мкМ). Как фактическая IC₅₀ значение 3WL не имеет пока не сообщалось, прогнозируемый IC₅₀ значение не даст реального представления о его минимальной ингибирующей концентрации. Таким образом, комплексы рассматривались для дальнейшего анализа SeeSAR для оценки роли отдельных атомов в аффинности связывания.

Для дальнейшей оценки аффинности связывания 3WL и таксифолина с М_{профи} до и после 30 нс моделирования методом МД, анализ HYDE (водородные связи и дегидратация) выполнялся с использованием SeeSAR из BiosolveIT [28]. Анализ HYDE последовательно указывает на образование водородных связей между лигандом и

Рис. 5 Расстояние различных водородных связей, образованных за период моделирования для а 3WL; б Таксифолин, с Эриодиктиол и д Лутеолин



рецептор, гидрофобный эффект, а также десольватация. HYDE также помогает в прогнозировании конкретной области комплекса, которая подвергается благоприятному и неблагоприятному связыванию рецептора лиганда. Оценка HYDE определяла свободную энергию Гибба, вычисляя разницу между

связанное и несвязанное состояния комплекса [32]. Показаны конкретные атомы, которые были благоприятными для хорошего сродства связывания (темно-зеленая сфера), и их индивидуальные значения HYDE для лучшего соединения Таксифолина и сокристаллического ингибитора 3WL как до, так и после МД моделирования.

Рис. 6 Колебания свободных энергий связи (ΔG) комплексов белок-лиганд во время период моделирования МД. Синяя линия представляет комплекс M_{pro}-3WL, коричневый линия представляет M_{pro}-CF3, серая линия представляет M_{pro}-CF5 и желтая линия представляет M_{pro}-CF8

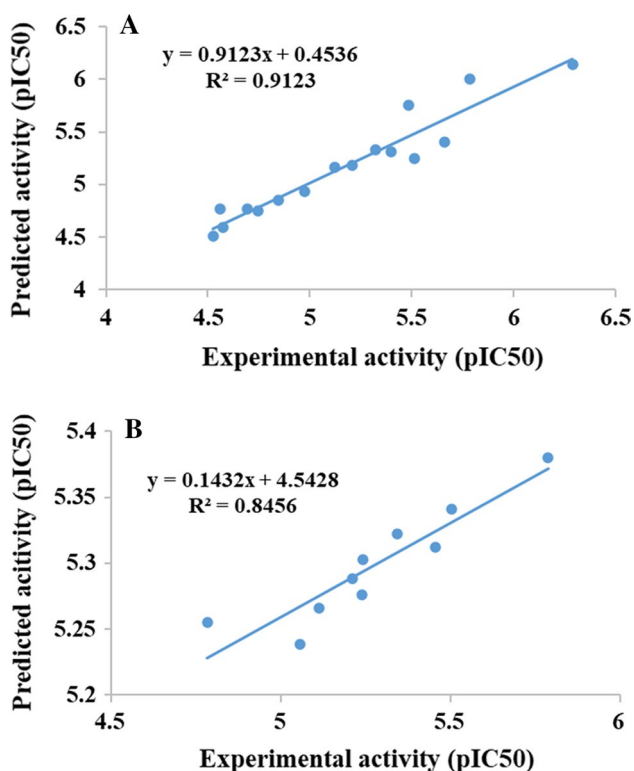
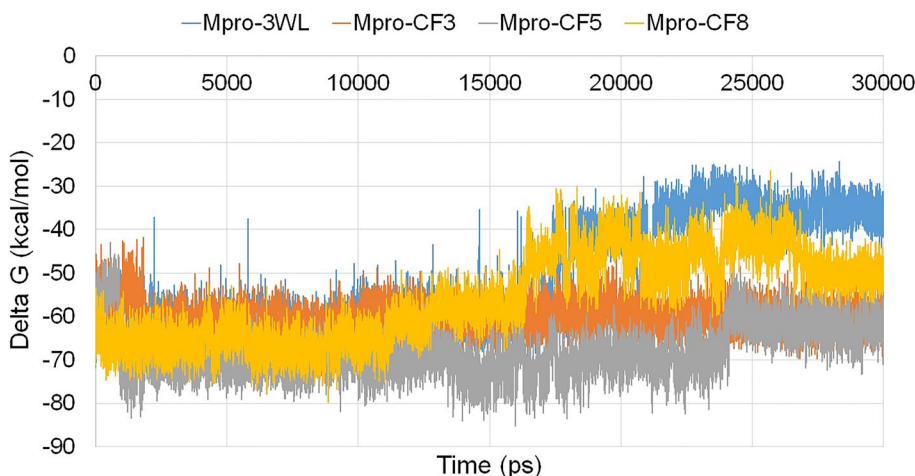


Рис. 7: 3D-QSAR график а тренировочный набор и б набор тестов

на рис. 8. Идентификация роли атомов, присутствующих в лигандах, имеет решающее значение для прогнозирования общей аффинности связывания или взаимодействий с целевыми сайтами белка. На рис. 8 а, было замечено, что в случае 3WL (5,6,7 - тригидрокси - 2 - фенил - 4Н - хромен - 4 - один), до МД моделирования, фенильное кольцо во 2-м положении имело основной вклад в общую оценку HYDE (ккал / моль). Но в основном атом кислорода 6-гидроксильной группы, атом углерода карбонильной группы в положении 4 и атом кислорода в положении 1 бициклической кольцевой системы (с красными коронками) имели отрицательные

влияние на общую аффинность связывания 3WL. Аналогично, в случае Таксифолина ((2R, 3S) - 2 - (3,4 - дигидроксифенил) - 3,5,7 - тригидрокси - 3,4 - дигидро - 2Н - 1 - бензопиран - 4 - один), до Моделирование методом МД, атом кислорода в положении 1 и атом кислорода гидроксильной группы в положении 3 оказали отрицательное влияние на аффинность связывания соединения. Более того, атом углерода в положении 7 и атом кислорода гидроксильной группы в положении 7 также продемонстрировали отрицательное влияние на средство связывания. С другой стороны, атомы 3,4-дигидроксифенильной группы в положении 2 бициклического кольца показали положительный вклад в общую аффинность связывания молекулы. В бициклическом кольце атом кислорода кетонной группы и атом углерода в положениях 6 и 8 оказывают положительное влияние на аффинность связывания молекулы (рис. 8 б).

HYDE-анализ комплексов был проведен также после МД моделирования и представлен на (рис. 8 CD). На рис. 8 с, было замечено, что в случае 3WL (5,6,7 - тригидрокси - 2 - фенил - 4Н - хромен - 4 - один), фенильное кольцо во втором положении имело основной вклад в общую оценку HYDE (ккал / моль). Кроме того, атомы углерода в положениях 2 и 3 и атомы кислорода гидроксильных групп в положениях

Позиции 5, 6 и 7 также показали положительный вклад в общую аффинность связывания. Однако было замечено, что атом кислорода карбонильной группы в положении 4 (с красной короной) оказывает отрицательное влияние на общую аффинность связывания 3WL. Аналогично, в случае Таксифолина ((2R, 3S) - 2 - (3,4 - дигидроксифенил) - 3,5,7 - тригидрокси - 3,4 - дигидро - 2Н - 1 - бензопиран - 4 - 1), после МД моделирования атом кислорода в положении 1 и атом кислорода гидроксильной группы в положениях 3 и 5 оказали отрицательное влияние на аффинность связывания соединения. Атом углерода в положении 6 3,4-дигидроксифенильной циклической кольцевой системы, присутствующей в положении 2, также оказывает большое отрицательное влияние на аффинность связывания. С другой стороны, атомы углерода 3,4-дигидроксифенильной группы в положениях 2 и 5 и атомы кислорода

Рис. 8 Визуализация связывания М профин С

участием а 3WL и б

Таксифолин до моделирования МД и с 3WL

и d Таксифолин после МД моделирования в

SeeSAR с количественным определением

HYDE важных неводородных атомов

которые способствуют связыванию средства

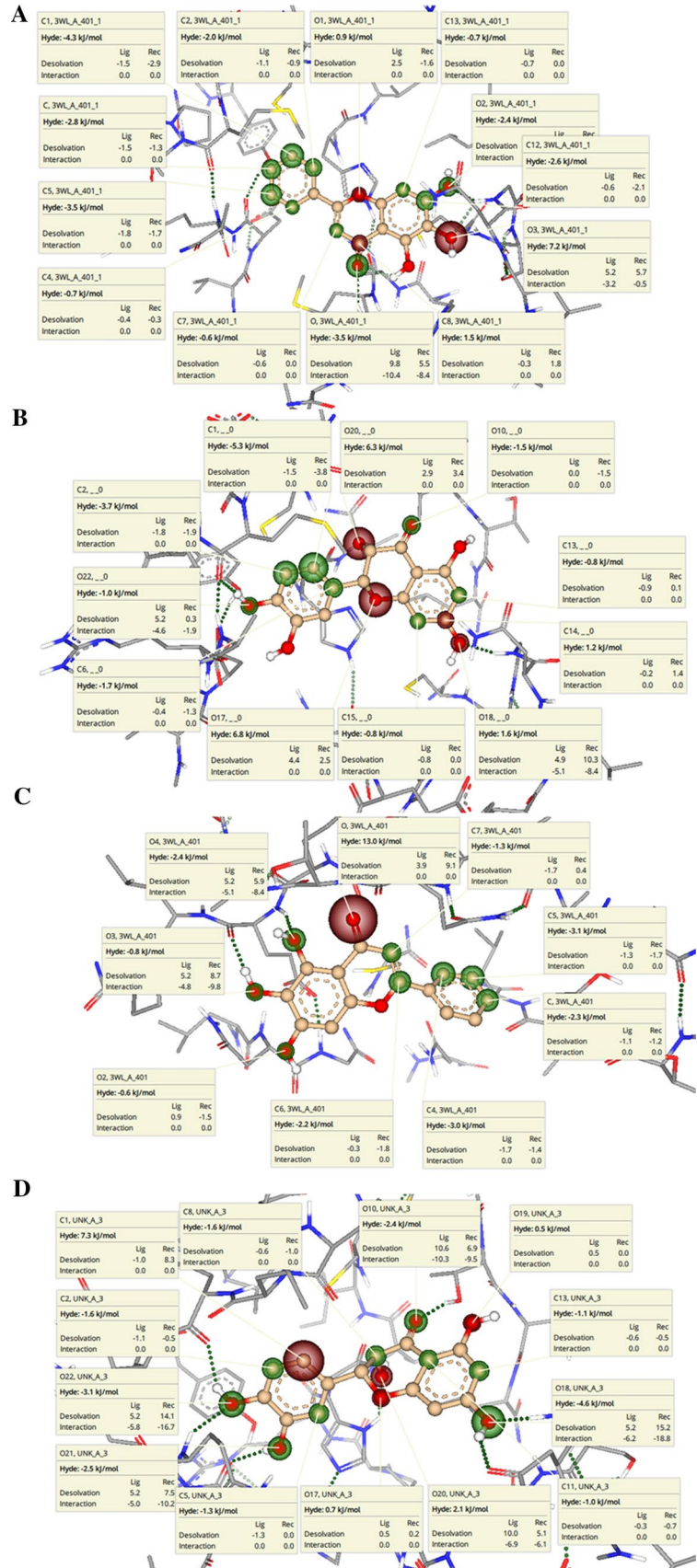


Таблица 4 Прогнозируемые диапазоны аффинности связывания 3WL и таксифолина с М_{профи} до и после МД моделирования

Соединение	Перед моделированием МД		После МД моделирования	
	Нижняя граница для предполагаемая близость	Верхняя граница для предполагаемая близость	Нижняя граница для предполагаемая близость	Верхняя граница-агу для оценки близость
3WL	0,344957 мМ	34,273 мМ	20,240 мМ	2010.969 мМ
Таксифолин	68,357 мМ	6791,721 мМ	1,838 мМ	182,666 мМ

гидроксильных групп в положениях 3 и 4 показали положительный вклад в общую аффинность связывания молекулы. Из бициклического кольца атом кислорода кетона

группа и атом углерода в положении 3, 4а и 6, и атом кислорода

гидроксильной группы в положении 7 имели положительный

влияние на аффинность связывания молекулы (рис. 8 г). Диапазоны аффинности

связывания таксифолина и сокристаллического ингибитора 3WL также были

рассчитаны до и после моделирования МД и показаны в таблице 4. По

результатам было обнаружено, что до МД-моделирования таксифолин обладал

меньшей аффинностью связывания с целевым белком М_{профи} из-за большого

отрицательного воздействия, обусловленного ориентацией атома кислорода в

положении 1 и атома кислорода гидропиксельной группы в положении 3. Однако

в случае комплексов после МД-моделирования таксифолин показал лучшее

средство связывания с целевым белком М_{профи} чем сокристаллический лиганд

3WL. Это говорит о том, что в ходе реакции Таксифолин обладает лучшим

средством связывания с М_{профи} SARS-CoV-2.

Таксифолин - широко распространенный природный флавоноид, и отходы лесной промышленности являются экономически выгодным источником для его извлечения. Ранее сообщалось о том, что таксифолин обладает противовирусным действием против вируса Коксаки В и антирадикальной активностью [33 , 34]. Мы полагаем, что исследования потенциальной ингибирующей активности таксифолина против респираторных вирусов не проводились. Стоит отметить, что наше исследование подтверждает недавно опубликованный отчет о потенциальной активности таксифолина против основной протеазы SARS-CoV-2 [35 год].

Заключение

В этом исследовании мы проверили флавоноидные соединения видов цитрусовых на их активность против SARS-CoV-2, нацеленного на М_{профи} вируса. На основании компьютерного анализа мы пришли к выводу, что таксифолин является лучшим лекарственным соединением среди всех выбранных флавоноидов цитрусовых без токсичности. Таксифолин связывается с целевым белком со сравнительно лучшей аффинностью связывания, чем сокристаллический флавоноид-подобный ингибитор 3WL. Он образует H-связи с двумя важными каталитическими остатками SARS-CoV-2 М_{профи} после молекулярного докинга и остается стабильным до завершения МД моделирования в течение 30 нс. Результаты исследования показывают его потенциальную ингибирующую активность против SARS-CoV-2.

М_{профи} со значением IC₅₀ 9,63 мкМ. Существенный эффект Таксифолина против вируса наблюдается во время *in silico*

исследование может быть дополнительно подтверждено экспериментами *in vitro* и

in vivo для клинического применения соединения. Настоящее исследование

поможет в будущих усилиях по обнаружению потенциального и эффективного

лечения COVID-19.

Благодарности Мы выражаем признательность за поддержку программному обеспечению для разработки лекарств Департамента фармацевтических наук Университета Дибругарх, созданному при поддержке Комиссии университетских грантов Нью-Дели (Индия) в рамках UGC-SAP (DRS-I) [F.3 -13 / 2016 / DRS-I (SAP-II)]. Neelutpal Gogoi также благодарит компанию BioSolveIT GmbH, Санкт-Августин, Германия, за предоставление специальной лицензии на программное обеспечение SeeSAR для выполнения части вычислительного анализа.

Вклад авторов NG, BG, PC & AKG разработали идею исследовательской работы. NG&BG выполнила программную экспериментальную часть. NG, BG проанализировали результаты, а ПК подтвердили их. NG, BG, PC и AKG подготовили рукопись. Компания AD&DC внесла свой вклад в разработку рукописи. Все авторы доработали и одобрили рукопись.

Финансирование Это исследование не получало какого-либо специального гранта от финансирующих агентств государственного, коммерческого или некоммерческого сектора.

Соблюдение этических норм

Конфликт интересов Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Рекомендации

1. Информационная панель ВОЗ по коронавирусной болезни (COVID-19) Информационная панель ВОЗ по коронавирусной болезни (COVID-19). <https://covid19.who.int/>. Доступ 6 августа 2020
2. Антонио ADS, Wiedemann LSM, Veiga-Junior VF (2020) Роль натуральных продуктов в борьбе с COVID-19. RSC Adv 10: 23379–23393. <https://doi.org/10.1039/d0ra03774e>
3. Islam MT, Sarkar C, El-Kersh DM et al (2020) Натуральные продукты и их производные против коронавируса: обзор доклинических и доклинических данных. PhytHer Res. <https://doi.org/10.1002/ptr.6700>
4. Mahanta S, Chowdhury P, Gogoi N et al (2020) Потенциальная противовирусная активность одобренного перепрофилированного препарата против основной протеазы SARS-CoV-2: *in silico* основанный подход. J Biomol Struct Dyn 0: 1–10. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1768902>
5. Gildenhuis S (2020) Расширение нашего понимания роли конформации полипротеина в жизненном цикле коронавируса. Биохимия J 477: 1479–1482. <https://doi.org/10.1093/biochem/bfz282>

6. Ван З., Ян Л. (2020) Переломить ситуацию: натуральные продукты и химические вещества на основе натуральных продуктов как потенциальные противодействия инфекции SARS-CoV-2. *Фронт Pharmacol* 11: 1013. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01013>
7. Li X, Wang Y, Agostini P et al (2020) Является ли гидроксихлорохин полезным для пациентов с COVID-19? *Дис. Смерти клетки* 11: 512. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2721-8>
8. Закарян Х., Арабян Э., Оо А, Занди К. (2017) Флавоноиды: многообещающие природные соединения против вирусных инфекций. *Arch Virol* 162: 2539–2551. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-03367-y>
9. Cataneo AHD, Kuczera D, Koishi AC et al (2019) Флавоноид цитрусовых нарингенин ослабляет *in vitro* инфицирование человеческих клеток вирусом Зика. *Sci Rep* 9: 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52626-3>
10. Джо С, Ким С., Шин Д.Х., KimMS (2020) Ингибирование протеазы 3CL SARS-CoV флавоноидами. *J Enzyme Inhib Med Chem* 35: 145–151. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1690480>
11. Meneguzzo F, Ciriminna R, Zabini F, Pagliaro M (2020) Обзор имеющихся данных о продуктах, богатых гесперидином, в качестве потенциальных инструментов против COVID-19 и экстракции на основе гидродинамической кавитации как метода увеличения их производства. *Процессы* 8: 1–18. <https://doi.org/10.3390/PR8050549>
12. Gattuso G, Varreca D, Gargiulli C и др. (2007) Флавоноидный состав цитрусовых соков. *Молекулы* 12: 1641–1673. <https://doi.org/10.3390/12081641>
13. N Gogoi D Chetia B Gogoi A Das 2019 Многоцелевой направленный скрининг флавоноидных соединений из видов цитрусовых для выявления антималярийного свинца с прогнозируемым механизмом действия: подход *in vitro* на основе *in Silico* и целых клеток. *Curr Comput Aided Drug Des* 16 :. <https://doi.org/10.2174/1573409916666191226103000>
14. RCSB PDB - 6M2N: протеаза 3CL SARS-CoV-2 (3CL_pro) в комплексе с новым ингибитором. <https://www.rcsb.org/structure/6m2n> . По состоянию на 1 августа 2020 г. RCSB PDB: Home page. <https://www.rcsb.org/> . Доступ 1 августа 2020 г.
15. AK Goswami N Gogoi B J Gogoi H K Sharma 2019 Сетевой подход на основе фармакологии и DFT к идентификации отведений от Homalomena aromatica для многоцелевого *in-silico* скрининга белков Entamoeba histolytica. *Curr Другой* 14 :. <https://doi.org/10.2174/1574885514666190801102336>
17. Ву Г., Робертсон Д.Х., Брукс К.Л., Вьет М. (2003) Подробный анализ молекулярной стыковки на основе сетки: тематическое исследование CDOCKER - алгоритма стыковки MD на основе CHARMM. *J. Comput Chem* 24: 1549–1562. <https://doi.org/10.1002/jcc.10306>
18. Lexa KW, Carlson HA (2012) Гибкость белка в стыковке и картировании поверхности. *Q Rev Biophys* 45: 301–343. <https://doi.org/10.1017/S0033583512000066>
19. Koska J, Spassov VZ, Maunard AJ et al (2008) Полностью автоматизированная молекулярная механика, основанная на методе стыковки белок-лиганд на основе индуцированной подгонки. *J Chem Inf Model* 48: 1965–1973. <https://doi.org/10.1021/ci800081s>
20. Sander T, Freyss J, Von Korff M, Rufener C (2015) DataWarrior: программа с открытым исходным кодом для визуализации и анализа данных с учетом химии. *J Chem Inf Model* 55: 460–473. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>
21. Lin CH, Chang TT, Sun MF et al (2011) Разработка мощного ингибитора против свиного гриппа h1n1: анализ структуры и молекулярной динамики для ингибиторов m2 из базы данных традиционной китайской медицины. *J Biomol Struct Dyn* 28: 471–482. <https://doi.org/10.1080/07391102.2011.10508589>
22. Ноха С.М., Шмидхаммер Х., Спетеа М. (2017) Молекулярный докинг, молекулярная динамика и исследования взаимосвязи структура-активность 14-оксигенированных N-метилморфинан-6-онов как мощных агонистов μ -опиоидных рецепторов. *ACS Chem Neurosci* 8: 1327–1337. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00460>
23. Genheden S, Ryde U (2015) Методы MM / PBSA и MM / GBSA для оценки аффинности связывания лиганда. Мнение экспертов по наркотикам *Discov* 10: 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460>
24. Rastelli G, Del Rio A, Gianluca Degliesposti MS (2010) Быстрые и точные предсказания свободных энергий связывания с использованием MM-PBSA и MM-GBSA. *J Comput Chem* 31: 797–810. <https://doi.org/10.1002/jcc.21372>
25. Vora J, Patel S, Sinha S. et al (2019) Виртуальный скрининг на основе структуры, 3D-QSAR, исследования молекулярной динамики и ADMET для выбора естественных ингибиторов против структурных и неструктурных мишеней Chikungunya. *J Biomol Struct Dyn* 37: 3150–3161. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1509732>
26. PostEra | COVID-19. <https://covid.postera.ai/covid> . Доступ 1 августа 2020 г.
27. Чандрабос Селварадж, Сунил Кумар Трипати KKR и SKS (2011) Разработка инструмента для прогнозирования значений pIC50 на основе значений IC50 - калькулятор значений pIC50 Ассоциация биотехнологий и фармации. В: *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* <https://www.abap.co.in/tool-development-prediction-pic50-value-s-ic50-values-pic50-value-Calculator> . По состоянию на 1 августа 2020 г.
28. BioSolveIT-SeeSAR. <https://www.biosolveit.de/SeeSAR/> . Доступ 1 августа 2020 г.
29. S Rampogu MRampogu Lemuel 2016 Сетевой подход к установлению взаимосвязи между сахарным диабетом 2 типа и его осложнениями на молекулярном уровне в сочетании с механизмом молекулярного докинга. *Biomed Res Int* 2016 :. <https://doi.org/10.1155/2016/6068437>
30. Лю Х, Ван ХJ (2020) Потенциальные ингибиторы протеазы М коронавируса М 2019-nCoV из клинически одобренных лекарств. *Дж. Генет Геномика* 47: 119–121
31. Ахмед Н., Анвар С., Тет Хтар Т. (2017) Исследование 3D-QSAR на основе стыковки трициклических гуанидиновых аналогов батцелладина К в качестве противомалярийных агентов. *Front Chem* 5:36. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00036>
32. Schneider N, Hindle S, Lange G et al (2012) Существенные улучшения в крупномасштабной повторной регистрации и скрининге с использованием новой функции оценки HYDE. *J. Comput Aided Mol Des* 26: 701–723. <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9531-0>
33. Галочкина А.В., Аникин В.Б., Бабкин В.А. и др. (2016) Вирус-ингибирующая активность флавоноида из Larix sibirica дигидрокверцетина в отношении вируса Коксаки В4 на модели вирусного панкреатита. *Arch Virol* 161: 929–938. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-0100-0>
34. Roubalová L, Purchartová K, Rapoušková V. et al (2015) Сульфатирование модулирует клеточное поглощение, антирадикальную активность и биологические эффекты флавоноидов *in vitro*: исследование кверцетина, изокверцитрина и таксифолина. *Bioorganic Med Chem* 23: 5402–5409. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.055>
35. Фишер А., Селльнер М., Нераньян С. и др. (2020) Потенциальные ингибиторы новой протеазы коронавируса, идентифицированные виртуальным скринингом 606 миллионов соединений. *Int J Mol Sci* 21: 3626. <https://doi.org/10.3390/ijms21103626>

Примечание издателя Springer Nature сохраняет нейтралитет в отношении юрисдикционных претензий на опубликованных картах и институциональных принадлежностях.

Принадлежности

Neelutpal Gogoi ¹ · Пурвита Чоудхури ² · Ашис Кумар Госвами ¹ · Арагоо Das ^{1,3} · Дипак Четия ¹ · Бхаскарджйоти Гогои ⁴

* Бхаскарджйоти Гогои
gogoi.bhaskar2608@gmail.com

¹ Департамент фармацевтических наук, факультет науки и техники,
Университет Дибругарх, Дибругарх 786004, Индия

² Департамент исследований в области здравоохранения, Модель исследования
здоровья в сельских районах, Трипура 799035, Индия

³ Центр биотехнологии и биоинформатики, факультет
биологических наук, Университет Дибругарх, Дибругарх 786004,
Индия

⁴ Департамент биотехнологии Королевской школы биологических наук Королевского
глобального университета, Гувахати 781035, Индия