

## Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids

Seri Jo, Suwon Kim, Dong Hae Shin & Mi-Sun Kim

**To cite this article:** Seri Jo, Suwon Kim, Dong Hae Shin & Mi-Sun Kim (2020) Inhibition of SARSCoV 3CL protease by flavonoids, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35:1, 145-151, DOI: 10.1080/14756366.2019.1690480

**To link to this article:** <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1690480>



© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



[View supplementary material](#)



Published online: 14 Nov 2019.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 15911



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)



Citing articles: 6 [View citing articles](#)

## Інгібування протеази 3CL коронавірусу SARS-CoV флавоноїдами

Seri Jo, Suwon Kim, Dong Hae Shin  and Mi-Sun Kim 

Фармацевтичний коледж і Вища фармацевтична школа, Університет ім. Юха В., Сеул, Республіка Корея

### РЕЗЮМЕ

Тяжкий гострий респіраторний синдром (ТГРС, SARS) і близькосхідний коронавірусний респіраторний синдром викликали значну паніку. Тому дослідження цих вірусів необхідні. Зростає кількість досліджень щодо впливу флавоноїдів на коронавіруси (CoV). Вважається, що протівірусна активність деяких флавоноїдів відносно CoV безпосередньо пов'язана з пригніченням 3С-подібної протеази (3CLpro). У цій статті наведена бібліотека флавоноїдів для систематичного дослідження сполук, які пригнічують протеазу 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Встановлено, що гербацетин, ройфолін і пектоллінарин ефективно блокують ферментативну активність 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Взаємодія цих трьох флавоноїдів також була підтверджена за допомогою методу триптофанової флуоресценції. Індукований докінг-аналіз показав, що S1, S2 та S30 сайти беруть участь у зв'язуванні з флавоноїдами. Порівняння з попередніми дослідженнями показало, що Triton X-100 грав вирішальну роль у хибно-позитивних або завищених показниках інгібуючої активності флавоноїдів. При систематичному аналізі ці три флавоноїди вважаються шаблонами для розробки функціонально удосконалених інгібіторів.

### ІСТОРИЯ СТАТТІ

Отримано 26 серпня 2019 р.  
Переглянуто 27 жовтня 2019 р.  
Прийнято 29 жовтня 2019 р.

### КЛЮЧОВІ СЛОВА

ТОРС-коронавірус; протеаза 3CLpro коронавірусу SARS-CoV; флавоноїди; FRET; інгібуючі сполуки




### Вступ


Коронавіруси – це великі оболонкові позитивно спрямовані одноланцюгові РНК-віруси, які здатні інфікувати як тварин, так і людину<sup>1</sup>. Коронавіруси, як і *Artiviriviridae* та *Roniviridae*, належать до родини *Coronaviridae*, порядку *Nidovirales*. Ці CoV здатні інфікувати різних хазяїв, зокрема птахів, свиней та людей. Коронавіруси людини є основною групою CoV, які пов'язані з виникненням різних респіраторних захворювань, від звичайної застуди до тяжкої пневмонії та бронхіоліту<sup>2</sup>. Сьогодні коронавірус людини визнаний одним з вірусів, які найшвидше еволюціонують, що обумовлено його особливістю швидкого заміщення нуклеотидів та рекомбінації генів<sup>3</sup>. Тяжкий гострий респіраторний синдром (ТГРС) – перша підтверджена атипова пневмонія, виявлена в китайській провінції Гуандун, яка поширилася у декількох країнах. Найбільш частими симптомами ТГРС є кашель, висока температура (>38 С), озноб, судороги, головні болі, запаморочення та прогресуючі зміни в легенях, що підтверджуються рентгенологічно, та лімфопенія<sup>4</sup>. Тяжкість захворювання обумовлює рівень смертності від 3% до 6%, хоча цей показник може зрости від 43% до 55% серед людей старше 60 років<sup>5</sup>. Первинна епідемія ТГРС згодом була взята під контроль, але у кінці в Китаї був виявлений вірус, схожий на коронавірус ТГРС (SARS CoV)<sup>6,7</sup>. Крім того, пандемія близькосхідного коронавірусного респіраторного синдрому (БКРС, MERS), що нещодавно виникла, була спричинена новим коронавірусом близькосхідного респіраторного синдрому (MERS-CoV) і викликає занепокоєння щодо можливого рецидиву ТГРС або пов'язаних з ним небезпечних захворювань<sup>8,9</sup>. Оскільки немає вакцини та ефективної терапії цих вірусних інфекцій, розробка лікарських засобів проти ТГРС з метою контролю майбутніх спалахів залишається серйозною проблемою.


Геноми SARS-CoV і MERS-CoV містять дві відкриті рамки читання ORF1a та ORF1b, які транскрибуються з утворенням двох від-

повідних вірусних поліпротеїнів pp1a та pp1ab рибосомами хазяїна. ORF1a кодує дві цистеїнові протеази, папаїн-подібну протеазу (PLpro) та 3С-подібну протеазу (3CLpro). У той час як PLpro розрізає перші три сайти розщеплення свого поліпротеїну, 3CLpro відповідає за розщеплення решти 11 локалізацій, що призводить до вивільнення загалом 16 неструктурних білків (nsP) як в SARS-CoV, так і в MERS-CoV. Гомодімерна форма 3CLpro активна в присутності субстратів. Кристалічна структура обох 3CLpro показали, що кожен мономер складається з трьох структурних доменів: домен I і II утворюють хімотрисиноподібну архітектуру з каталітичним цистеїном, які пов'язані з третім С-кінцевим доменом за допомогою довгої петлі<sup>10</sup>. Щодо протеолітичного сайту, всі 3CLpro переважно мають глютамін в позиції P1, а лейцин, основні залишки, невеликі гідрофобні залишки в позиціях P2, P3 та P4 відповідно<sup>11</sup>. В позиціях P10 і P20 обов'язковими є невеликі залишки. В той же час, відносно позиції P30 стійких преференцій немає. Оскільки процес саморозщеплення необхідний для розмноження коронавірусу, 3CLpro є гарною мішенню для розробки лікарських препаратів проти коронавірусної інфекції.

У цьому дослідженні ми використовували протеолітичний метод для дослідження сполук, що пригнічують 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. У дослідженні використовували синтетичний пептид, мічений парео Edans-Dabcyl FRET (метод резонансного переносу енергії флуоресценції)<sup>12</sup> для пошуку сполук, що пригнічують 3CLpro коронавірусу SARS-CoV з бібліотеки флавоноїдів. Нещодавні дослідження показали, що флавоноїди мають протівірусну активність відносно деяких вірусів, включаючи SARS-CoV<sup>13–17</sup>. Однак про дослідження на молекулярному рівні щодо коронавірусу SARS-CoV не повідомлялося. Таким чином, нами проведений протеолітичний аналіз із використанням флавоноїдів, з подальшим експериментальним докінгом з індукованою відповідністю з найкращими варіантами. Після отримання результатів, ми спробували визначити структурний і функціональний взаємозв'язок

CONTACT Mi-Sun Kim  shfwk31@ewha.ac.kr  Department of Pharmacy, Ewha W. University, Seoul 03760, Republic of Korea; Dong Hae Shin  dhshin55@ewha.ac.kr

 Department of Pharmacy, Ewha W. University, Seoul 03760, Republic of Korea

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

флавоноїдів, що мають вирішальне значення для зв'язування з 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Інформація може застосовуватися для розробки синтетичних сполук з кращою спорідненістю.

## Матеріали та методи

### Експресія та очищення білка

Кодуюча послідовність протеази nsp5-pp1a/pp1ab 3CL (хімолі-рипсिनорподібної) (3CLpro) коронавірусу SARS-CoV була отримана з бази даних NCBI (NP\_828863.1). Каталітичний домен 3CLpro (M1~T196) був хімічно синтезований компанією Bioneer (Daejeon, Korea) та клонований в експресійний вектор pBT7 бактеріофагу T7. Плазмідна ДНК була трансформована в *E. coli* BL21 (DE3) для експресії білка. Клітини *E. coli* BL21 (DE3) вирощували на чашках з агаром Лурія-Бертані (ЛБ), що містить 150 мкг/мл ампіциліну. Кілька колоній збирали та вирощували в пробірках з кришкою з 10 мл бульйону ЛБ, що містить 150 мкг/мл ампіциліну. Вихідний матеріал для клітин, що складається з 0,85 мл культури і 0,15 мл гліцерину, готували та заморожували при 193 К для використання у великій культурі. Заморожену клітинну масу вирощували в 5 мл середовища ЛБ та розводили в 1000 мл свіжого середовища ЛБ. Культуру інкубували при 310 К, струшуючи до досягнення оптичної щільності OD<sub>600</sub> 0,6-0,8. На цьому етапі експресію 3CLpro коронавірусу SARS-CoV індукували з використанням ізопропіл- $\beta$ -D-1-тіогалактопіранозиду (ІПТГ) в кінцевій концентрації 1 мМ. Потім культуру вирощували при 310 К протягом 3 год в шейкер-інкубаторі. Клітини збирали шляхом центрифугування при 7650g (6500 об/хв) протягом 10 хвилин у високошвидкісній рефрижераторній центрифугі при 277 К. Суспензію культивованих клітин ресуспендували в 25 мл буфера, що складається з 50 мМ тріс-НСІ, рН 8, 100 мМ NaCl, 10 мМ імідазолу, 1 мМ фенілметилсульфоні-лфториду (PMSF), 10 Іgm<sup>-1</sup> ДНКазі І. Суспензію клітин руйнували за допомогою ультразвукового дезінтегратора (Digital Sonifier 450, Branson, USA). Клітинний дебрис осаджали центрифугуванням при 24900g (15000 об/хв) протягом 30 хвилин у високошвидкісній рефрижераторній ультра-центрифугі при 277 К.

Білок очищали за допомогою катіонної хроматографії з використанням колонки Hi-Trar SP об'ємом 5 мл (GE Healthcare, Piscataway, Нью-Джерсі, США). Колонку врівноважували буфером, що складається з 50 мМ MES, рН 6,5, після цього завантажували змішані фракції. Колонку елюювали за допомогою лінійного градієнта NaCl до 1 М NaCl, а білок елюювали при 0,23 М NaCl. Електрофорез в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (ДСН-ПААГ) показав одну смугу близько 22 кДа (21895,09 кДа), що відповідає молекулярній масі каталітичного домену 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Білок концентрували до 16 мг/мл для аналізу протеази в буфері, що складається з 0,23 М NaCl і 50 мМ MES, рН 6,5.

### Аналіз протеази 3CLpro коронавірусу SARS-CoV за допомогою методу FRET

Синтезований на замовлення флуорогенний субстрат DABCYLKTSAVLQSGFRKME-EDANS (ANYGEN, Gwangju, Кванджу, Korea) використовували як субстрат для протеолітичного аналізу 3CLpro18 коронавірусу SARS-CoV.<sup>18</sup> Цей субстрат містить послідовність розщеплення білків nsp4/nsp5, GVLQ↓SG<sup>19</sup>, і працює як універсальний пептидний субстрат для багатьох коронавірусів, включно з 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Пептид розчиняли в дистильованій воді та інкубували з кожною протеазою. Для вимірювання спектральної флуоресценції використовували мікропланшетний аналізатор SpectraMax і3х (Molecular Devices). Протеолітичну активність визначали при 310 К за збільшенням флуоресценції ( $\lambda_{\text{збудження}}=340$  нм,

$\lambda_{\text{емісія}}=490$  нм, ширина смуги = 9,15 нм відповідно) EDANS при гідролізі пептиду в залежності від часу. Кількісні визначення проводили в чорних 96-лункових планшетах (Nunc) в 300 мкл аналітичних буферів, до складу яких входили протеаза та субстрат, як зазначено нижче; Для кількісного визначення 3CLpro коронавірусу SARS-CoV 4,05 мкл 0,074 мМ протеази, що містить 50 мМ Тріс, рН 6,5, інкубували з 7,5 мкл 0,1 мМ субстрату при 310 К протягом 2 год перед виміром відношми одиниці флуоресценції (RFU). Перед проведенням аналізу досліджували спектри випромінювання 64 флавоноїдів після їх освітлення при 340 нм, щоб уникнути збігу зі спектром випромінювання EDANS. Кожна сполука була додатково для тестування. Кінцева концентрація протеази, пептиду та хімічної речовини, використаних під час проведення аналізу, становила 1; 2,5 і 20 мкМ кожна. Спочатку 3CLpro коронавірусу SARS-CoV та хімічну речовину змішували та попередньо інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Реакцію ініціювали додаванням субстрату та кожному лунку інкубували при 310 К протягом 16 годин. Після цього ми виміряли флуоресценцію суспензії на чорному 96-лунковому планшеті за допомогою методу кінцевої точки SpectraMax і3х, де довжина хвилі збудження була зафіксована до 340 нм, а довжина хвилі емісії встановлена на 490 нм за пропускну здатності 9,15 нм відповідно. Усі реакції проводилися в трьох паралельних аналізах. Серед перших 64 флавоноїдів (Додаткова таблиця 1), три з них були відібрані для подальшого аналізу в діапазоні концентрацій 2-320 мкМ. Значення IC<sub>50</sub>, яке є значенням, за якого відбувається 50%-ве пригнічення каталітичної активності 3CLpro коронавірусу SARS-CoV, розраховували за допомогою нелінійного регресійного аналізу з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Сан-Дієго, Каліфорнія, США).

### Аналіз протеази 3CLpro коронавірусу SARS-CoV за допомогою методу FRET в присутності Triton X-100

Аналіз протеази 3CLpro коронавірусу SARS-CoV в присутності Triton X-100 проведений з метою диференціації штучної інгібуючої активності хімічних речовин за допомогою неспецифічного зв'язування з протеазами шляхом утворення агрегатів або комплексів. Дослідження проводилося за концентрації 0,01%.

### Абсорбційна спектроскопія з використанням триптофану протеази 3CLpro коронавірусу SARS-CoV

З метою підтвердження практичної здійсненності незалежного методу аналізу, проведено дослідження спектрів флуоресценції триптофану 3CLpro коронавірусу SARS-CoV з потенційними інгібіторами.<sup>20</sup> Флуоресцентні вимірювання реєстрували за допомогою багаторежимного мікропланшетного аналізатора SpectraMax і3х (Molecular Devices) за довжини хвиль збудження та емісії 290 нм і 300-500 нм відповідно. Оптимальні довжини хвиль збудження та емісії визначались за допомогою програмного забезпечення SoftMax Pro. Один триптофан 3CLpro коронавірусу SARS-CoV продемонстрував флуоресцентне випромінювання з піком при 350 нм після збудження на довжині хвилі 290 нм. Навпаки, флавоноїди були майже не флуоресцентними в тих самих умовах експерименту. Кожні 40 мкМ хімічної речовини інкубували з 1 мкМ 3CLpro коронавірусу SARS-CoV протягом 1 години та вимірювали інтенсивність флуоресценції суміші.

### Підготовка ліганда, мішені та докінг з індукованою відповідністю

Усі розрахунки моделювання докінгу та оцінювання проводилися за допомогою програмного пакета Schrödinger (Maestro, версія 11.8.012). Сполуки взяті з бази даних PubChem в форматі

SDF та об'єднані в один файл. Потім файл був імпортований в програмний пакет Maestro та підготовлений для докінгу з використанням LigPrep. Атомні координати кристалічної структури 3CLpro (4WY3) коронавірусу SARS-CoV отримані з Банку даних білкових структур і підготовлені шляхом видалення всіх розчинників і додавання водню та мінімальної мінімізації в присутності зв'язаного ліганда з використанням застосунка Protein Preparation Wizard (Майстра приготування білка). Іонізатор використовували для створення іонізованого стану всіх сполук при цільовому рН 7±2. Ці підготовлені низькоенергетичні конформери ліганда використовували як вхідний сигнал для докінгу з індукованою відповідністю. Протокол докінгу з індукованою відповідністю<sup>21</sup> запускався з графічного інтерфейсу користувача програмного забезпечення Maestro 11.8.012. Відбір та уточнення рецепторів проводили на залишках в межах 5 Å кожного ліганда для кожного комплексу ліганд-білок. Завдяки інструменту Prime<sup>22</sup> (інструмент моделювання гомології "Prime", з набору програм виробництва Schrödinger, LLC), відбір бічних білкових ланцюгів і моделі прогнозування, а також скелет білка-мішені були мінімізовані по енергії. Для кожного з лігандів генерували загальну кількість конформацій рецептора з індукованою відповідністю. Повторний докінг проводили з тестовими лігандами в їхні відповідні структури в межах 30 ккал/моль їхньої найнижчої енергетичної структури. Нарешті, положення лігандів оцінювалися з використанням комбінації функцій підрахунку інструментів Prime та GlideScore<sup>23</sup>.

## Результати

Вихід клітин, зібраних для очищення каталітичного домену 3CLpro коронавірусу SARS-CoV, склав 2,69 г на 1000 мл культури

*E.coli*. Кількість очищеного білка, синтезованого без мітки, складало 16 мг. Для зберігання та кількісного визначення розчин білка концентрували до 16 мг/мл. Концентрований розчин розбавляли до 1мкМ під час проведення інгібіторного аналізу.

Була також сформована бібліотека флавоноїдів, що складається з 10 різних каркасів (Рисунок 1). Вона містить п'ять ізофлавононів, один ізофлаван, 17 флавононів, 11 флавонолів, 7 флаванолів, 7 флаванонів, 4 флаванонолів, один пренілфлавоноїд, 9 халконів та 2 неклассифікованих флавоноїдів (Додаткова таблиця 1). Ми користувалися бібліотекою для аналізу 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. За допомогою 64 флавоноїдів досліджено інгібуючий ефект кожної сполуки при 20 мкМ. Серед них виражену інгібуючу активність виявлено у гербацетину (3,4',5,7,8-пентагідроксифлавонон), роїфоліну (апігенін-7-О-рамноглюкозид) і пектолінаріну (5,7-дигідрокси 4',6'-діметоксифлавонон 7-рутинозид) (Рисунок 2). Дані щодо спорідненості зв'язування наносили на графік логарифмічної залежності концентрації інгібітору від відсотка інгібування флуоресценції (Рисунок 2). Три сполуки показали сильне зниження інтенсивності флуоресценції і, відповідно, проявляли інгібуючу активність відносно 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Значення IC<sub>50</sub> розраховували за допомогою дозозалежних кривих інгібування гербацетину, роїфоліну та пектолінаріну. Виміряні значення становили 33,17; 27,45 і 37,78 мкМ відповідно. Оскільки флавоноїди відомі як агрегуються через складність і, таким чином, неспецифічно інгібують різні протеази, також був проведений аналіз за додавання Triton X-100<sup>24</sup>. Перед дослідженнями ми протестували вплив Triton X-100 на каталітичну активність 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Як показано на Додатковому рисунку 1, спостерігалось лише незначне збільшення активності

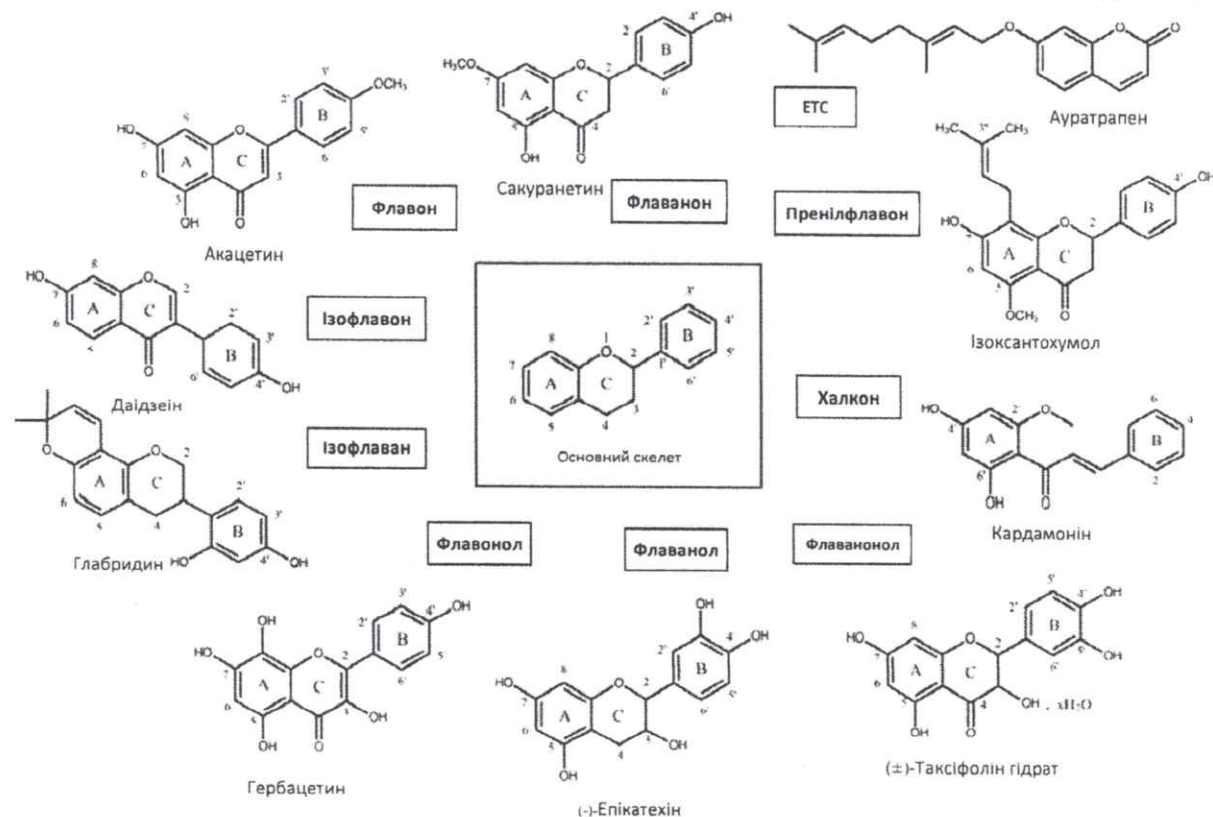


Рисунок 1. Будова основних скелетів флавоноїдів і їхніх каркасів. Основні репрезентативні структури найбільш поширених флавоноїдів, класифікованих в цьому дослідженні, були зображені з кільцями та пронумерованими позиціями.

каталізатора до 0,1% Triton X-100. Тому аналіз проводився при концентрації 0,01% Triton X-100 без будь-яких значних інтерференцій.

Для незалежного підтвердження інгібуючої активності флавоноїдів використовували загальноприйнятий метод аналізу на основі триптофану. Добре відомо, що триптофан здатен випромінювати флуоресценцію. Отже, якщо триптофан правильно розташований в білках, зміна інтенсивності флуоресценції може відображати стан зв'язування хімічних речовин і використовуватися для оцінки взаємодії між білками та хімічними речовинами. Протеаза 3CLpro коронавірусу SARS-CoV містить один залишок триптофану (Trp31) в каталітичному домені. Його остов вибудується біля входу в активний сайт. Отже, зміна його флуоресцен-

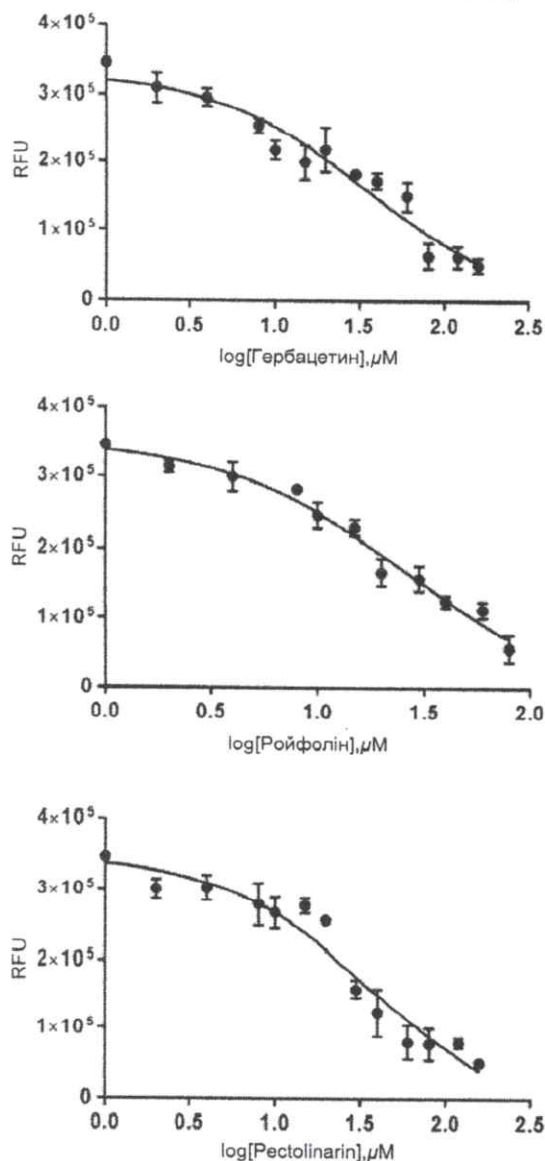


Рисунок 2. Результати методу FRET. Кожна точка даних на графіку відображає ефект однієї інгібуючої сполуки відносно 3CLpro коронавірусу SARS-CoV порівняно з контролем. Відносні одиниці флуоресценції (RFU) нанесені на графік логарифмічної залежності концентрації інгібуючих сполук. Кожна точка виражається у вигляді середнього значення  $\pm$  стандартна помилка середнього ( $n=3$ ). RFU: Відносні одиниці флуоресценції.

ції може відображати зміну активного сайту під впливом навколишнього середовища. Каталітичний домен 3CLpro коронавірусу SARS-CoV, використаний в цьому дослідженні, демонструє лій флуоресценції при 340 нм після довжини хвилі збудження триптофану 290 нм. Зміну інтенсивності флуоресценції контролювали в залежності від наявності або відсутності всіх флавоноїдів. Оскільки кожна сполука в бібліотеці флавоноїдів в умовах експерименту майже не флуоресцирувала, зміна інтенсивності флуоресценції відображає взаємодію між каталітичним доменом і хімічними речовинами. Цікавим є той факт, що три інгібуючі сполуки явно знижували інтенсивність флуоресценції каталітичного домену порівняно з іншими (Рисунок 3). Зниження інтенсивності випромінювання підтверджує комплексоутворення між каталітичним доменом та інгібуючими сполуками.

З метою визначення способів зв'язування інгібуючих флавоноїдів на молекулярному рівні було проведено ретельне теоретичне дослідження використання докінгу з індукованою відповідністю. Проаналізовані взаємодії між 3CLpro коронавірусу SARS-CoV та трьома інгібуючими флавоноїдами з метою прогнозування їхньої спорідненості зв'язування. Відібрані структури з найкращими оцінками (за показниками ковзання) згідно з результатами докінгу з індукованою відповідністю для гербацетину (-9,263), ройфоліну (-9,565) і пектолінарину (-8,054) були запропоновані як біологічні комплекси. Щоб знайти відповідні структурні чинники, що забезпечують гарну спорідненість гербацетину, також розраховували та порівнювали позиції кемпферолу (-8,526) і морину (-8,930) як двох найближчих гомологів. Прогнозовані складні структури та їхні двомірні схематичні зображення представлені на Рисунок 4.

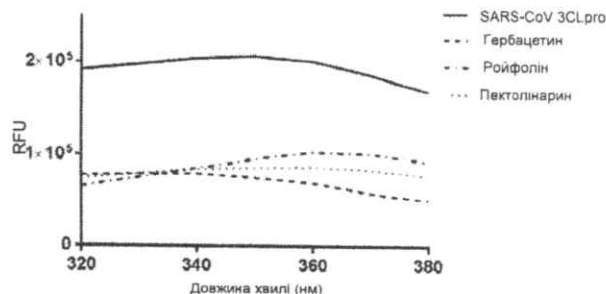


Рисунок 3. Спектри гасіння флуоресценції 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Розчин, що містить 1 мкМ 3CLpro коронавірусу SARS-CoV, продемонстрував сильну флуоресценцію (суцільна лінія) з піком при 340 нм при довжині хвилі збудження 290 нм. Після додавання 40 мкМ кожної інгібуючої сполуки, зокрема гербацетину (пунктирна лінія), ройфоліну (лінія крапка-тире) та пектолінарину (крапкова лінія), були отримані спектри гасіння флуоресценції.

## Обговорення

Флавоноїди – важливий вид природних речовин. Зокрема, вони відносяться до типу рослинних вторинних метаболітів з поліфенольною структурою, які широко поширені у фруктах та овочах. Вони мають різноманітні взаємодіючі біохімічні та антиоксидантні впливи, пов'язані з різними захворюваннями, такими як рак, хвороба Альцгеймера та атеросклероз<sup>25-27</sup>. Це пов'язано з антиоксидантними, протизапальними, антимутагенними та антиканцерогенними властивостями в поєднанні зі здатністю контролювати основні функції клітинного фермента<sup>15</sup>. Цікавим є той факт, що деякі флавоноїди також мають протівірусну активність<sup>17</sup>. Зокрема, повідомлялося, що апігенін, лютеолін, кверцетин, аментофлавін<sup>28</sup>, кверцетин, даїдзєїн, пуерарин, епігаллокатехін, галлат епігаллокатехін, галлокатехін галлат<sup>29</sup> і кемпферол<sup>30</sup> здатні

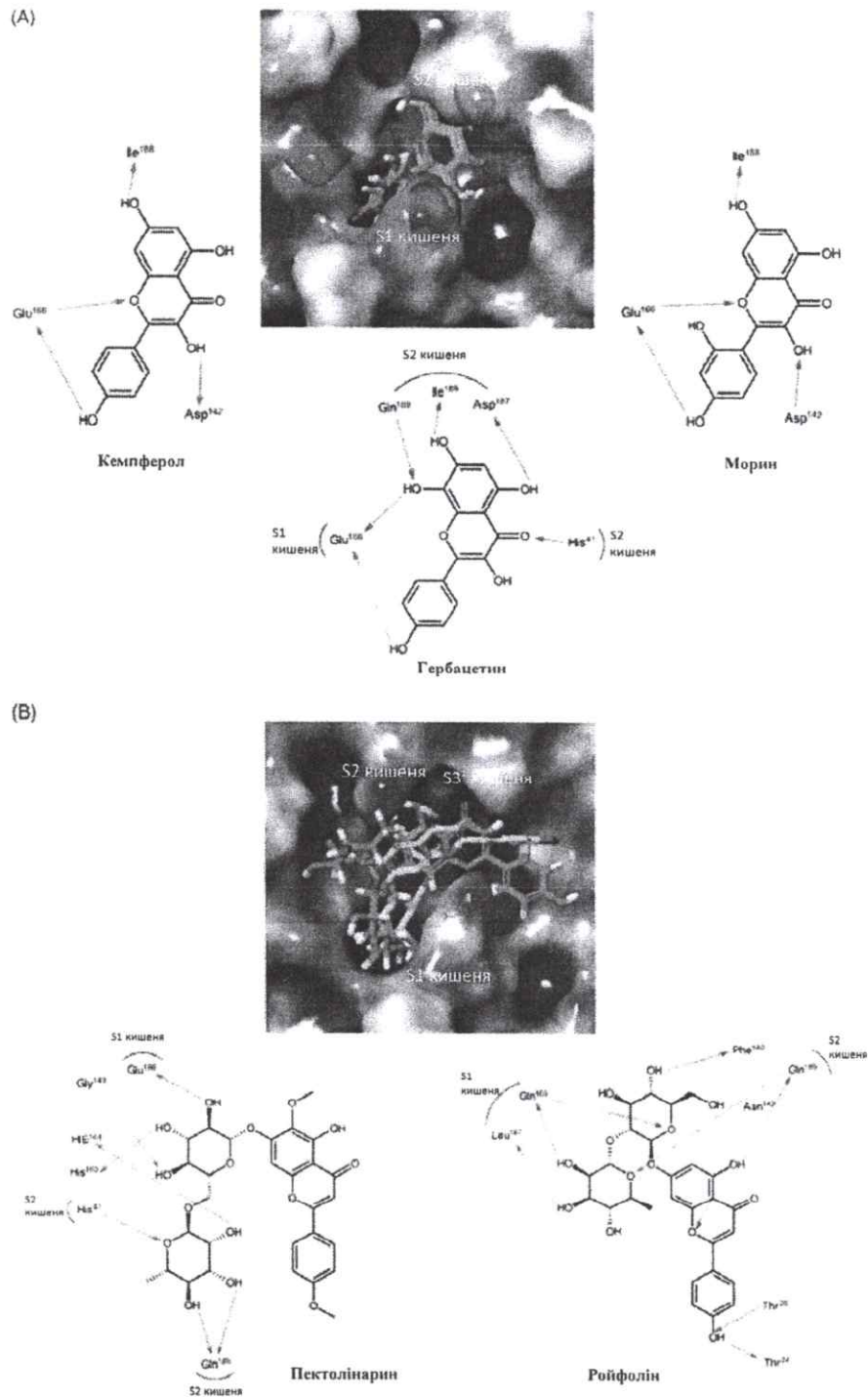


Рисунок 4. Прогнозовані комплекси флавоноїдів у каталітичному центрі 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Стикувальні позиції (A) гербацетину, кемпферолу та морину, (B) ройфоліну та пектолінарину зображені на електростатичному поверхневому потенціалі 3CLpro коронавірусу SARS-CoV (червоний, негативний; синій, позитивний; білий, незаряджений). Предбачено, що флавоноїди займатимуть активний сайт 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Також представлені 2D моделі взаємодії п'яти флавоноїдів. Малюнки були створені за допомогою пакету програмного забезпечення Maestro v11.5.011. S1 – полярний S1-сайт 3CLpro коронавірусу SARS-CoV, S2 – гідрофобний S2-сайт і S30-сайт без сильної тенденції. Рожеві стрілки показують взаємодію водневих зв'язків.

пригнічувати протеолітичну активність 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Отже, передбачається, що противірусний ефект безпосередньо пов'язаний з пригніченням активності 3CLpro SARS-CoV у деяких випадках. Проте повідомлень щодо проведення систематичного аналізу з використанням різних каркасів флавоноїдів не було. Щоб знайти кращий каркас для пригнічення функції 3CLpro коронавірусу SARS-CoV розроблено та проведено аналіз з різними похідними флавоноїдів, класифікованими в 10 каркасах. Серед них найкращими сполуками визнані один флавонол гербацетин і два флавононі – ройфолін і пектолінарин. У цьому аналізі, за використання 0,01% Triton X-100, три флавоноїди показали кращу інгібуючу активність, ніж флавоноїди, про які повідомлялося раніше, про що зазначено вище<sup>28-30</sup>. Тенденція до агрегації флавоноїдів часто призводить до отримання помилкових результатів біологічного аналізу, чого можна уникнути, шляхом додавання 0,01% Triton X-100<sup>24</sup>. Варто відзначити, що функціонування амен-тофлавонолу, найбільш ефективного флавоноїду, який пригнічує 3CLpro28 коронавірусу SARS-CoV<sup>28</sup>, не ефективно за додавання 0,01% Triton X-100 (Рисунок 5).

Щоб з'ясувати взаємозв'язок між способом зв'язування та спорідненістю зв'язування, також було проведено дослідження докінгу гомологів гербацетину, кемпферолу та морину. Показники ковзання трьох сполук становили -9,263; -8,526 і -8,930 відповідно. Тенденція показників ковзання відповідає спорідненості зв'язування сполук. Порівняння прогнозованих способів зв'язування трьох складних структур показало критичні фактори, що визначають їхню спорідненість зв'язування. Загалом, вони поділяють мотив кемпферолу. Як показано на Рисунок 4, фенільний компонент кемпферолу займає S1-сайт коронавірусу SARS-CoV за допомогою водневого зв'язку з Glu166. На відміну від хром-4-он каркасу кемпферолу, який локалізується в S2-сайті. Гербациетин має всього чотири водневі зв'язки, які утворюються на відстані 2,33 Å в ділянці S2-сайту. Зокрема, основна сила зв'язування обумовлена наявністю додаткової 8-гідроксильної групи, яка відіграє важливу роль у зв'язуванні з Glu166 і Gln189. Передбачається, що ці зв'язки забезпечують хороший показник ковзання гербацетину. Навпаки, способи зв'язування морину та кемпферолу урізноманітнюються через відсутність вищевказаних двох водневих зв'язків через відсутність 8-гідроксильної групи (Рисунок 4). Відсутність її також спричинює зміну, що розриває водневий зв'язок, утворений 5-гідроксильною групою каркасу

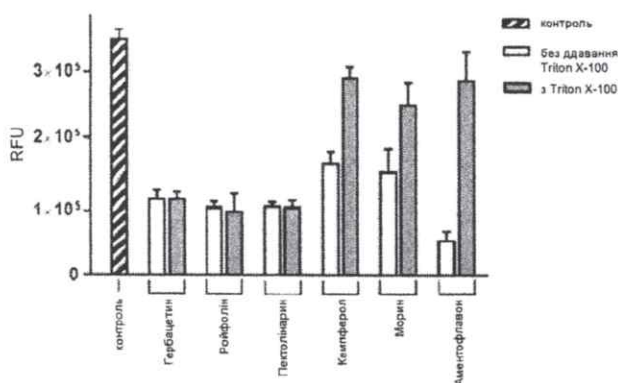


Рисунок 5. Вплив Triton X-100 на флавоноїди. Кожен з двох представлених стовпчиків зображує інгібуючу активність сполук з/без 0,01% Triton X-100. Перший стовпчик (заштрихований) – контроль. Інгібуючі сполуки використовували в концентрації 40 мкМ. Кожен стовпець виражається як середнє значення ± стандартна помилка середнього (n=3). RFU: Відносні одиниці флуоресценції.

хромен-4-он з Asp187, що спостерігається у гербацетину. Хоча завдяки 3-гідроксильній групі утворюється новий водневий зв'язок, цього може бути недостатньо для подолання втрати здатності до зв'язування, спричиненої 8-гідроксильною групою. Це дослідження показує важливість 8-гідроксильної групи для сильної спорідненості зв'язування гербацетину.

Показники ковзання ройфоліну та пектолінаріну становили -9,565 і -8,054 відповідно. Вони належать до родини флавононів. Цікаво, що їх способи зв'язування відрізняються від таких у трьох вищевказаних флавонолів. Ройфолін і пектолінарин містять  $\alpha$ -L-рамнопіранозил  $\beta$ -D-глюкопіранозид і L-маннопіранозил  $\beta$ -D-глюкопіранозид відповідно. Додаткові об'ємні вуглеводні групи приєднані в позиції 7 каркасу хромен-4-он. В результаті водневий зв'язок між 7-гідроксильною групою та основним ланцюгом Ile188 був зруйнований. Крім того, об'ємним групам потрібен великий простір для розміщення. Отже, ці вуглеводні групи займають сайти S1 і S2, а фрагменти хромен-4-он розташовуються в сайтах S2 і S30, на відміну від трьох вищевказаних флавонолів. Краща спорідненість ройфоліну може бути обумовлена скоординованим зв'язуванням через S1-, S2- і S3'-сайти.

За результатами аналізу та докінгу можна зробити важливі висновки. По-перше, флавоноїди мають широкий спектр спорідненості зв'язування з 3CLpro коронавірусу SARS-CoV завдяки своїм гідрофобним ароматичним кільцям і гідрофільним гідроксильним групам. По-друге, присутність вуглеводних груп впливає на спорідненість та спосіб зв'язування фрагмента хромен-4-он. По-третє, Triton X-100 має вирішальне значення для зменшення хибнопозитивних і завищених оцінок. На підставі отриманого результату можна розробити нову стратегію боротьби з SARS, націлену на 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Подальше дослідження щодо розробки похідних сполук, які мають кращі інгібуючі властивості, засновані на цьому дослідженні, продовжується.

## Висновок

Нами була створена бібліотека флавоноїдів для систематичного дослідження інгібуючої сполуки 3CLpro коронавірусу SARS-CoV з використанням методу FRET. Під час використання бібліотеки був виявлений ряд флавоноїдів з широким спектром інгібуючої активності. Неприхований інтерес викликає той факт, що інгібуюча активність деяких флавоноїдів виявилася штучною після обробки Triton X-100. Гербациетин, ройфолін і пектолінарин були кращими інгібуючими сполуками протеази 3CLpro коронавірусу SARS-CoV з бібліотеки флавоноїдів. Зв'язування флавоноїдів було незалежно продемонстровано методом триптофано-вої флуоресценції. Щоб прогнозувати флавоноїдні каркаси, необхідні для взаємодії з каталітичним сайтом 3CLpro коронавірусу SARS-CoV, проведено та проаналізоване дослідження докінгу з індукованою відповідністю. Очікувалося, що присутність додаткової 8-гідроксильної групи гербацетину матиме вирішальне значення для набуття ним високої спорідненості зв'язування з S1- і S2-сайтами. Очікувалося, що заповнення сайтів S1 і S2 вуглеводними групами ройфоліну та пектолінаріну стане ще одним способом отримання високої спорідненості глікозилізованих флавоноїдів до 3CLpro коронавірусу SARS-CoV. Це дослідження передбачає, що біохімічний аналіз у поєднанні з прогнозованим докінгом може бути корисним для розробки кращих інгібуючих похідних флавоноїдів з різних каркасів флавоноїдів.

## Заява про розкриття інформації

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

## Фінансування

Дослідження отримало підтримку за Програмою фундаментальних наукових досліджень, 2018R1D1A1B07050781 для DHS і 2018R1D1A1B07050942 для МК, що фінансується грантом Національного дослідницького фонду Кореї, наданим Міністерством освіти, науки і технології Республіки Корея (MEST). S. Jo отримав фінансову підтримку від проекту Brain Korea 21 (BK21).

## ORCID

Dong Hae Shin <http://orcid.org/0000-0002-2205-1453>  
Mi-Sun Kim <http://orcid.org/0000-0002-4092-4203>

## Література

- Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 1997;48:1–100.
- Mesel-Lemoine M, Millet J, Vidalain P-O, et al. A human coronavirus responsible for the common cold massively kills dendritic cells but not monocytes. *J Virol* 2012;86:7577–87.
- de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:523–34.
- Drosten C, G€unther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1967–76.
- Donnelly CA, Ghani AC, Leung GM, et al. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* 2003;361:1761–6.
- Li W, Shi Z, Yu M, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 2005;310:676–9.
- Lau JT, Yang X, Pang E, et al. SARS-related perceptions in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2005;11:417–24.
- Ren Z, Yan L, Zhang N, et al. The newly emerged SARS-like coronavirus HCoV-EMC also has an “Achilles’ heel”: current effective inhibitor targeting a 3C-like protease. *Protein Cell* 2013;4:248–50.
- Kilianski A, Mielech AM, Deng X, Baker SC. Assessing activity and inhibition of Middle East respiratory syndrome coronavirus papain-like and 3C-like proteases using luciferase-based biosensors. *J Virol* 2013;87:11955–62.
- Nedde D, Lountos GT, Waugh DS. Structures of the Middle East respiratory syndrome coronavirus 3C-like protease reveal insights into substrate specificity. *Acta Crystallogr* 2015;D71:1102–11.
- Chuck CP, Chow HF, Wan DC, Wong KB. Profiling of substrate specificities of 3C-like proteases from group 1, 2a, 2b, and 3 coronaviruses. *PLoS One* 2011;6:e27228.
- Liu Y-C, Huang V, Chao T-C, et al. Screening of drugs by FRET analysis identifies inhibitors of SARS-CoV 3CL protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:194–9.
- Yang L, Lin J, Zhou B, et al. Activity of compounds from *Taxillus sutchuenensis* as inhibitors of HCV NS3 serine protease. *Nat Prod Res* 2017;31:487–91.
- Juca MM, Cysne Filho FMS, de Almeida JC, et al. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Nat Prod Res* 2018;16:1–14.
- Frabasile S, Koishi AC, Kuczera D, et al. The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. *Sci Rep* 2017;7:41864.
- Kiat TS, Phippen R, Yusof R, et al. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:3337–40.
- Zakaryan H, Arabyan E, Oo A, Zandi K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Arch Virol* 2017;162:2539–51.
- Kuo C-J, Chi Y-H, Hsu JT, Liang P-H. Characterization of SARS main protease and inhibitor assay using a fluorogenic substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:862–7.
- Wu A, Wang Y, Zeng C, et al. Prediction and biochemical analysis of putative cleavage sites of the 3C-like protease of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Virus Res* 2015;208:56–65.
- Lin H, Lan J, Guan M, et al. Spectroscopic investigation of interaction between mangiferin and bovine serum albumin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2009;73:936–41.
- Sherman W, Day T, Jacobson MP, et al. Novel procedure for modelling ligand/receptor induced fit effects. *J Med Chem* 2006;49:534–53.
- Jacobson MP, Pincus DL, Rapp CS, et al. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins* 2004; 55:351–67.
- Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, et al. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem* 2006;49:6177–96.
- Pohjala L, Tammela P. Aggregating behavior of phenolic compounds—a source of false bioassay results? *Molecules (Basel, Switzerland)* 2012;17:10774–90.
- Burak M, Imen Y. Flavonoids and their antioxidant properties. *Turkiye Klin Tip Bil Derg* 1999;19:296–304.
- Ovando C, Hernandez D, Hernandez E, et al. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem* 2009;113:859–71.
- Lee Y, Yuk D, Lee J, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of b-amyloid generation and memory deficiency. *Brain Res* 2009;1250:164–74.
- Ryu YB, Jeong HJ, Kim JH, et al. Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CL(pro) inhibition. *Bioorg Med Chem* 2010;18:7940–11947.
- Nguyen TT, Woo HJ, Kang HK, et al. Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3C-like protease expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 2012;34:831–8.
- Schwarz S, Sauter D, Wang K, et al. Kaempferol derivatives as antiviral drugs against the 3a channel protein of coronavirus. *Planta Med* 2014;80:177–82.