

Efficacy Evaluation of Quercetin and Its Analogues on the Main Protease Enzyme of the COVID-19 Using Molecular Docking Studies

Tooba Abdizadeh^{1*} 

¹ Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 09 April 2022
Revised: 11 May 2022
Accepted: 16 May 2022
Published Online: 11 October 2022

*** Correspondence to:**
Tooba Abdizadeh
Clinical Biochemistry Research
Center, Basic Health Sciences
Institute, Shahrekord University of
Medical Sciences, Shahrekord,
Iran
Email:
abdizadeh.t@skums.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: COVID-19 is an acute respiratory infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus. There is an urgent need to discover antiviral drugs for better performance against new strains of coronaviruses (CoVs) due to the rapid spread of the disease despite scientific advances in vaccine development. This study aimed to evaluate the efficacy of quercetin and its analogues on the COVID-19 Mpro enzyme.

Material & Methods: In this descriptive-analytical study, the three-dimensional structures of quercetin analogues (20 compounds), standard drugs (ritonavir and lopinavir), and the COVID-19 Mpro enzyme were obtained from PubChem and PDB databases for bioinformatics study, respectively. Molecular docking studies of the compounds on the Mpro were performed using MOE-2014 software. Afterward, the physicochemical properties and biological activity of the compounds were predicted using Swiss ADME, PASS, and Swiss Target Prediction software.

(Ethic code: IR.SKUMS.REC.1399.117)

Findings: The findings of the present study showed that the most important bonds involved in drug-receptor binding are hydrogen, hydrophobic, and π - π interaction bonds. The best docking results were obtained for Baicalein, Genistein, Naringenin, and Quercetin compounds with strong binding energy (-12.83 to -13.54 kcal/mol), compared to ritonavir and lopinavir. These compounds have a greater tendency to bind to the catalytic amino acids His41 and Cys145 and other key amino acids of the active site of the COVID-19 Mpro enzyme.

Discussion & Conclusion: Based on the results of bioinformatics studies, quercetin analogues had more effective inhibition than standard chemical drugs due to their suitable placement in the active site of the main protease enzyme of COVID-19 and can be good candidates for *in vitro* and *in vivo* studies.

Keywords: Bioinformatics studies, Flavonoid, Physicochemical properties, SARS-CoV-2 virus

➤ How to cite this paper

Abdizadeh T. Efficacy Evaluation of Quercetin and Its Analogues on the Main Protease Enzyme of the COVID-19 Using Molecular Docking Studies. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2022;30(4): 66-85.



بررسی اثر بخشی کوئرستین و آنالوگ‌هایش بر آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹ با استفاده از مطالعات داکینگ مولکولی

طوبی عبدی زاده*^۱ ^۱ مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۰

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۶

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۷/۱۹

نویسنده مسئول:

طوبی عبدی زاده

مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

Email: abdzadeh.t@skums.ac.ir

مقدمه: کووید-۱۹ بیماری عفونی تنفسی حاد است که توسط ویروس SARS-CoV-2 ایجاد می شود و با توجه به شیوع سریع بیماری و علی رغم پیشرفت علمی انجام شده در توسعه واکسن، نیاز فوری به کشف داروهای ضد ویروسی برای عملکرد بهتر در برابر سویه های جدید کرونا ویروس ها وجود دارد. در این تحقیق اثر بخشی کوئرستین و آنالوگ هایش بر آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹ ارزیابی شد.

مواد و روش ها: در این پژوهش توصیفی-تحلیلی، برای بررسی بیوانفورماتیک، ساختار سه بعدی آنالوگ های کوئرستین (۲۰ ترکیب)، داروهای استاندارد (ریتوناویر و لوپیناویر) و آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹ به ترتیب از پایگاه داده های PubChem و PDB دریافت گردید. مطالعات داکینگ مولکولی ترکیبات روی پروتئاز اصلی با استفاده از نرم افزار MOE.2014 انجام شد؛ سپس خصوصیات فیزیکوشیمیایی و فعالیت بیولوژی ترکیبات با استفاده از نرم افزارهای Swiss ADME، PASS و Swiss Target Prediction پیش بینی گردید.

یافته ها: یافته های مطالعه حاضر نشان داد که مهم ترین پیوند های درگیر در اتصال دارو با گیرنده، پیوند هیدروژنی، برهمکنش های هیدروفوب و π - π هستند. بهترین نتایج داکینگ مربوط به ترکیبات Naringenin, Genistein, Baicalein و Quercetin با داشتن انرژی اتصال قوی (۱۲/۸۳- تا ۱۳/۵۴- کیلوکالری بر مول)، در مقایسه با داروهای ریتوناویر و لوپیناویر است. این ترکیبات برای اتصال با آمینواسیدهای کاتالیتیک His41 و Cys145 و دیگر آمینواسیدهای کلیدی جایگاه فعال آنزیم پروتئاز اصلی تمایل بیشتری دارند.

بحث و نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعات بیوانفورماتیک، آنالوگ های کوئرستین به سبب قرارگیری مناسب در جایگاه فعال آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹، مهار مؤثرتری را نسبت به داروهای شیمیایی استاندارد ایجاد می کنند و می توانند کاندید های مناسبی برای بررسی های *in vivo* و *in vitro* باشند.

واژه های کلیدی: فلاونوئید، مطالعات بیوانفورماتیک، ویروس SARS-CoV-2، خصوصیات فیزیکوشیمیایی

★ **استناد:** عبدی زاده، طوبی. بررسی اثر بخشی کوئرستین و آنالوگ هایش بر آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹ با استفاده از مطالعات داکینگ مولکولی. مجله

علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آبان ۱۴۰۱؛ ۳۰(۴): ۸۵-۶۶.

بیماری همه گیر کروناویروس ۲۰۱۹ (COVID-19/ Coronavirus disease 2019) ناشی از سندرم حاد تنفسی کروناویروس ۲ (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 / SARS-CoV-2)، به علت ظهور سویه‌های ویروسی جدید و مقاوم و ماهیت بسیار مسری آن، همچنان یک بحران جدی بهداشتی در سراسر جهان است (۱). علائم بیماری ناشی از کووید-۱۹ عبارت‌اند از: تب، تنگی نفس، سرفه خشک، خستگی مفرط و لنفوپنی، استفراغ و اسهال و در موارد شدیدتر بیماری، سندرم حاد تنفسی و حتی مرگ است (۲)؛ همچنین COVID-19 باعث علائم قلبی عروقی مانند آریتمی، نارسایی قلبی، سندرم حاد کرونری، میوکاردیت و شوک قلبی می شود (۳). کروناویروس‌ها عضو بزرگی از خانواده ویروس کروناویریدیای RNA (Coronaviridae) دار تک‌رشته‌ای و عضو دو زیرمجموعه لتوویرینا (Letovirinae) و اورتوکروناویرینا (Orthocoronavirinae) هستند که شامل گروه آلفا لتوویروس از زیرمجموعه لتوویرینا و چهار گروه آلفا، بتا، گاما و دلتا کروناویروس از زیرمجموعه اورتوکروناویرینا هستند (۴). آلفا و بتا کروناویروس‌ها قادر به آلوده کردن پستاندارانند و بیماری‌های انسانی و حیوانی ایجاد می کنند، درحالی که گاما و دلتا کروناویروس‌ها تمایل دارند پرندگان را آلوده نمایند (۵، ۶). از میان گونه های مختلف خانواده کروناویروس، تاکنون هفت نوع کروناویروس انسانی شناسایی شده است که دو سویه 229E (V) و NL-63 (۸) از نوع آلفا کروناویروس و پنج نوع دیگر آن متعلق به بتا کروناویروس هستند که مهم ترین آن‌ها کروناویروس سندرم حاد تنفسی (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus / SARS-CoV) و سندرم تنفسی خاورمیانه (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus / MERS-CoV) است و باعث بیماری شدید و درنهایت مرگ می شوند (۱۰)، (۹). SARS-CoV-2 یک ویروس RNA دار

تک‌رشته‌ای مانند سویه‌های گزارش شده پیشین از قبیل SARS-CoV و MERS-CoV از خانواده بتا کروناویروس است (۱۱).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که کروناویروس جدید (ویروس کووید-۱۹) که پس از SARS-CoV در سال ۲۰۰۲ (۱۲) و MERS-CoV در سال ۲۰۱۲ (۱۳)، سومین همه‌گیر بسیار بیماری‌زا در مقیاس بزرگ است، در سطح نوکلئوتیدی، حدود ۷۹ درصد با ویروس SARS-CoV و حدود ۷۲ درصد با ویروس MERS RNA دارد (۷). ویروس SARS-CoV-2 یک ویروس RNA دار حاوی چهار پروتئین ساختاری به نام‌های پروتئین سنبه (Spike)، پروتئین پاکت (Envelope)، پروتئین غشایی (Membrane) و پروتئین نوکلئوکپسید (Nucleocapsid) و شانزده پروتئین غیرساختاری است که مسئول تکثیر کروناویروس هستند (۱۴). پروتئین‌هایی که نقش اساسی در عملکرد ویروس دارند، شامل پروتئین Spike و پروتئاز اصلی (Main protease/ Mpro یا Chymotrypsine-like protease-3) و RNA dependent RNA polymerase (RdRp) پروتئاز شبه پاپایین (Papain-like protease / pLpro) هستند (۱۵). پروتئاز اصلی و پروتئاز شبه پاپایین از پروتئازهای ویروسی مهم در شکاف پلی پروتئین‌های ویروسی به‌شمار می روند و این پروتئین‌ها از خانواده پروتئازهای سیستمی هستند (۱۶). پروتئاز اصلی کووید-۱۹ از نظر ساختاری، یک همودیمر فعال است که حاوی دو مونومر A و B و از پروتئین‌های غیرساختاری است. مونومر این پروتئین سه دمین دارد: دمین I (آمینواسیدهای ۱۰۱-۸)، دمین II (آمینواسیدهای ۱۸۴-۱۰۲) و دمین III (آمینواسیدهای ۳۰۶-۲۰۱) و یک حلقه طولانی (آمینواسیدهای ۲۰۰-۱۸۵) که دمین‌های II و III را بهم متصل می کند و محل اتصال سوبسترا در این پروتئین در شکاف میان دمین‌های I و II قرار دارد. این پروتئین پروتئاز اصلی گروه کاتالیتیکی

پلی‌فنولی مانند فلاونوئیدها، خواص متعدد دارویی از قبیل ضداکسیدان، ضدباکتری، ضدسرطان، ضدالتهاب، ضدویروس و حفاظت‌کننده دستگاه ایمنی دارند و توجه فراوانی را به خود جلب کرده‌اند (۲۶، ۲۵، ۴). فلاونوئیدها معمولاً در بسیاری از گیاهان و سبزی‌ها یافت می‌شوند و قابلیت اختلال در اتصال ویروس SARS-CoV-2 به گیرنده سلول میزبان را دارند و از شدت علائم کووید-۱۹ می‌کاهند و پاسخ ایمنی را تعدیل می‌کنند (۲۷). نتایج تحقیقات نشان داد که ترکیبات فلاونوئیدی مانند کوئرستین و کامفرول و همچنین مشتقات گلوکورونید و سولفات‌های این فلاونوئیدها، به‌طور مؤثر پروتئین RdRp را مهار می‌نمایند. سینگ و همکارانش با استفاده از داکینگ مولکولی نشان دادند که ترکیبات پلی‌فنولی Theaflavin (TF1)، Epigallocatechin (EGCG)، Theaflavin-3-monogallate (TF2a)، Theaflavin-3-3'-(TF3)، a flavin-3'-momogallate digallate، هیسپریدین، کوئرستاجتین و میریستین با RdRp اتصال محکمی برقرار می‌کنند (۲۸). در مطالعه‌ای، ترکیبات فلاونوئیدی فیسیتین، کوئرستین، ایزوهمنتین و کامفرول تمایل اتصال بیشتری با پروتئین Spike نشان دادند (۲۹) و مطالعه دیگری نشان داد که میریستین می‌تواند با ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2) تأثیر متقابل داشته باشد و باعث ایجاد تغییرات ساختاری شود و از ورود ویروس جلوگیری کند (۳۰). فلاونوئیدهای آسترگالین، کامپرول و کوئرستین به‌طور مداوم با پروتئاز اصلی و pLpro تأثیر متقابل دارند. این مولکول‌ها نسبت به داروی رم‌دیسیور، اتصال قوی‌تری به این دو آنزیم نشان می‌دهند (۳۱، ۳۲).

بنابراین، در این مطالعه سعی شده است که میزان فعالیت مهارکنندگی ترکیب کوئرستین و آنالوگ‌هایش بر آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹، با استفاده از داکینگ مولکولی ارزیابی شود و اثربخشی هرکدام از این ترکیبات در محیط *in Silico* به‌منظور پیدا کردن یک

Cys145 و His41 دارد که در جایگاه فعال پروتئین نقش اساسی ایفا می‌کند و باعث آزاد شدن پلی‌پپتیدها از RNA ترجمه‌شده می‌شود (۱۷).

محققان سویه‌های مختلفی از SARS-CoV-2 را با جهش‌های مضاعف در برخی کشورها شناسایی کرده‌اند (۱۸). این سویه‌ها می‌توانند به‌سرعت منتقل شوند و باعث عفونت مجدد در جوامع انسانی شوند (۲۰). علی‌رغم توسعه برنامه‌های واکسن، نیاز جدی به شناسایی و طراحی واکسن‌ها و عوامل ضدویروسی جدید علیه SARS-CoV-2 وجود دارد (۱۹)؛ بنابراین، یافتن عوامل طبیعی امیدوارکننده برای پروتئاز اصلی می‌تواند تهاجم و/یا مانع تکثیر ویروس در سلول میزبان و کاهش عفونت‌پذیری آن شود و از آنجا که این ویروس بدون همولوگ انسانی است، مهارکننده‌های آن سمیت کمتری برای انسان دارند (۲۰).

کشف آثار درمانی یک ترکیب شیمیایی، تازه آغاز راهی است که ممکن است تحقیق، توسعه و اجرای آن سالیان بسیاری به طول بینجامد. در حقیقت زمان‌بر بودن، پرهزینه بودن و دسترسی آسان نداشتن به مواد اولیه دارویی سنتز و داشتن عوارض جانبی متعدد داروهای شیمیایی از معایب داروهای شیمیایی است. یکی از راهکارهای جدید درمانی، غیر از طراحی و سنتز شیمیایی داروها، جستجوی مواد مؤثر دارویی در میان ترکیبات طبیعی به‌منظور دستیابی به داروهایی با کمترین آثار جانبی و صرف هزینه و زمان کوتاه‌تر است. امروزه روش‌های *in Silico* به‌عنوان یکی از کم‌هزینه‌ترین و سریع‌ترین راهکارها برای رسیدن به ترکیب الگو و یا داروی مؤثر استفاده می‌شوند (۲۱، ۲۲).

گیاهان دارویی به دلیل منشأ طبیعی، عوارض جانبی کمتری نسبت به مواد شیمیایی دارند و دارای خواص گوناگونی از قبیل خواص ضدقارچی، ضدالتهابی، ضدویروسی، ضداکسیدانی، ضدتشنج و ضدتب هستند (۲۳، ۲۴). در میان ترکیبات متنوع گیاهی، ترکیبات

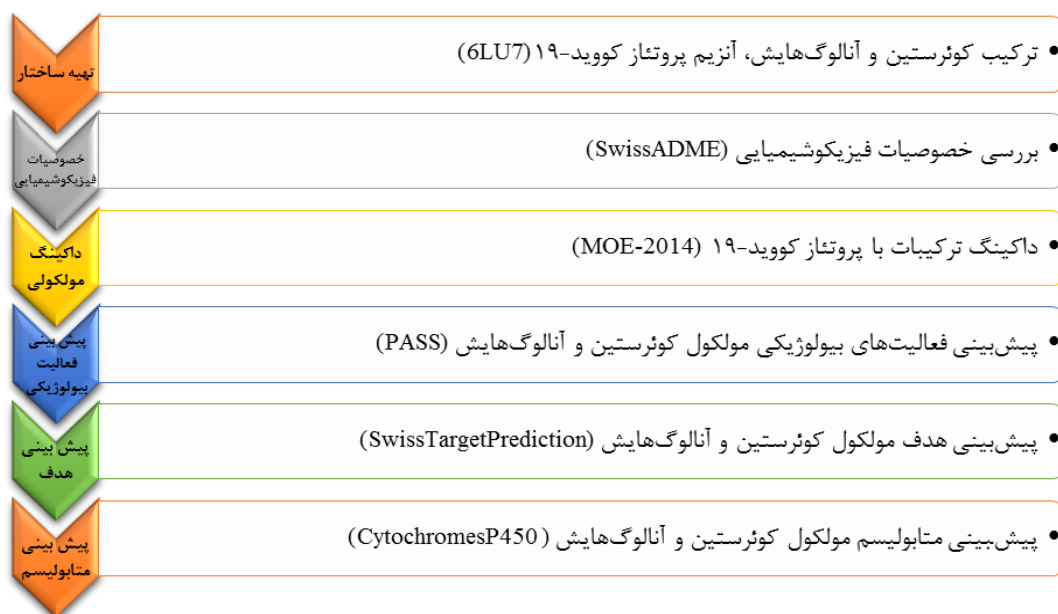
مهارى بهتر كه ميل اتصال قوى ترى براى پروتئاز
اصلى نشان دادند، براى تحقيقات بيشر توسط
SwissTargetprediction، PASS و متابوليسم انتخاب
شدند و ارزىابى گرديدند. اين مطالعه به صورت
in silico براى شناساىى تركيبات ضدويروسى بالقوه براى كوويد-
۱۹ انجام شد (شكل شماره ۱).

آماده‌سازى پروتئين و ليگاندها: اين پژوهش به شيوه
توصيفى-تحليلى انجام شد. ابتدا از ميان تركيبات مؤثر
گياهان داروئى، تركيب كوئرستين و آنالوگ‌هايش (۲۰
تركيب) انتخاب گرديدند كه خاصيت ضدويروسى
داشتند. براى مقايسه عملکرد تركيبات كوئرستينى يادشده
و دست يابى به نتايج قابل اطمينان برهمكنش مولكولى، دو
داروى ضدويروس ريتوناویر و لوپيناویر به عنوان استاندارد
و مهاركننده N3 در پروتئاز اصلى مطالعه شدند. ساختار
سه بعدى تركيبات و داروها از پاىگاه PubChem به
آدرس (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) دريافت
گرديدند و ساختارها توسط Hyperchem.7 در ميدان
نيروى مكانيك مولكولى (Molecular Mechanics) و الكوريم
(AM1) و روش نيمه تجربى AM1 و الكوريم
Polak-riberie از نظر انرژى بهينه شدند.

تركيب مؤثر در درمان كوويد-۱۹ بررسى گردد. با هدف
بررسى و شناساىى دقيق سازوكار اتصال آنالوگ‌هاى
كوئرستين با اسكلت ساختارى فلاونويدى به جاىگاه فعال
آنزيم، روش داكينگ مولكولى اجرا و نتايج به دست آمده
از آن تجزيه و تحليل و در نهايت، پيش بينى خطر سميت و
فعاليت بيولوژيك تركيبات توسط مرورگر
Swiss Target Prediction و PASS، SwissADME
ارزىابى گرديد. براى انجام روش داكينگ مولكولى از
نرم افزار (Molecular Operating Environment (MOE.2014)
Environment استفاده شده است.

مواد و روش ها

هدف اصلى اين مطالعه ارزىابى كوئرستين و
آنالوگ‌هايش، به عنوان مهاركننده هاى آنزيم پروتئاز
اصلى ويروس SARS-CoV-2، براى شناساىى داروئى
مؤثر در درمان كوويد-۱۹ بود. پروتئاز اصلى به علت
نقش مهم آن در تكثير ويروس انتخاب گرديد و خواص
فيزيكوشيمياىى كوئرستين و آنالوگ‌هايش تجزيه و تحليل
شد و داكينگ مولكولى همه تركيبات كوئرستينى با
آنزيم پروتئاز اصلى صورت گرفت و تركيبات با اثر



شكل شماره ۱. نماى شماتيكى از رويكرد محاسباتى استفاده شده براى شناساىى آنالوگ‌هاى كوئرستين به عنوان مهاركننده براى آنزيم پروتئاز
اصلى كوويد-۱۹

خوراکی یا تریق وریدی یا جذب پوستی نقش دارند، با استفاده از پایگاه های SwissADME بر اساس قانون لیبینسکی، Swiss Target Prediction، PASS-Way2Drug و RS-Web Predictor 1.0 پیش‌بینی شد. سرورهای یادشده نرم‌افزارهای آنلاین هستند که با دریافت اطلاعات مولکول شیمیایی در قالب فایل Structure Data File (SDF) یا Simplified molecular-input line-entry system (Smile) امکان پیش‌بینی خصوصیات فیزیکوشیمیایی را فراهم می‌آورند (۳۷-۳۵).

داکینگ مولکولی: به منظور ارزیابی ترکیب کوئرستین و آنالوگ‌هایش و داروهای استاندارد (ریتوناویر و لوپیناویر) و مهارکننده N3 در مهار آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹، از روش داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار MOE.2014 استفاده گردید. در MOE، تمایل اتصال گیرنده-لیگاند با همه هندسه های اتصال ممکن، بر اساس یک مقدار عددی به نام S-score اولویت‌بندی می‌شوند. MOE می‌تواند پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش های آب‌گریز، گوگرد-LP، کاتیون π - π و قرار گرفتن کمپلکس در معرض حلال را شناسایی کند؛ بنابراین در این کار، برهمکنش‌های میان ترکیبات و پروتئین گیرنده بر اساس این S-score پیش‌بینی می‌شوند. در طول فرایند شبیه‌سازی داکینگ مولکولی، پروتئین پروتئاز اصلی به‌عنوان یک ساختار صلب در نظر گرفته شد، درحالی‌که لیگاندها کاملاً انعطاف‌پذیر بودند. با استفاده از ماژول مکان‌یاب کاشته‌شده در MOE، محل فعال پروتئین پروتئاز اصلی تعیین گردید و محل فعال با دست‌کم یک اتم در فاصله ۴/۵ Å در لیگاند در ساختار کریستالی پروتئاز اصلی تعریف شد. داکینگ مولکولی با استفاده از الگوریتم مکان‌یابی تطبیق مثلث در ترکیب با تابع امتیازدهی London dG برای اختصاص انرژی‌های اتصال آزاد نظری مجتمع‌های پروتئین-لیگاند و میدان نیرو به‌عنوان روش پالایش صورت گرفت. بررسی های کمی از حیث انرژی پیوندی توسط بهترین کنفورماسیون ترکیبات با

ساختار سه‌بعدی آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹ با شماره دسترسی 6LU7 از پایگاه داده های پروتئین (PDB/ Protein Data Bank) دریافت گردید. در طول فرایند آماده‌سازی پروتئین، با استفاده از نرم‌افزار MOE.2014 (۳۳) مولکول‌های آب و لیگاند اصلی آن حذف شدند، درحالی‌که هیدروژن های قطبی و بارهای گسیتیگر (بارهای الکتریکی اتم که به‌صورت تجربی محاسبه می‌گردد) به پروتئین اضافه و هیدروژن های غیریونیزه در اتم کربن مجاور ادغام شدند. ساختار پروتئین توسط الگوریتم کمینه‌سازی انرژی MOE با استفاده از میدان نیرو MMFF94X، با روش گرادیان مزدوج به حداقل رسید؛ سپس ساختار پروتئین برای مطالعات داکینگ مولکولی ذخیره گردید.

بررسی ترکیبات با قانون لیبینسکی (Lipinski): برای ارزیابی اینکه یک ترکیب می‌تواند خواص دارویی داشته باشد و برای پیش‌بینی میزان جذب، برای همه ترکیبات، قانون لیبینسکی در نظر گرفته می‌شود. قانون لیبینسکی (Lipinski's "rule of five") پیش‌بینی می‌کند که جذب یا نفوذ مناسب در مواردی اتفاق می‌افتد که ترکیب مدنظر ویژگی‌هایی مانند وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون، فاکتور چربی‌دوستی (cLogP) کمتر از ۵، تعداد اتم‌های پذیرنده هیدروژن کمتر از ۱۰ و تعداد اتم‌های دهنده هیدروژن کمتر از ۵ داشته باشد؛ بنابراین، ترکیبی که این ویژگی‌های را دارد و از قانون لیبینسکی برخوردار باشد، جذب بیشتر و اثر بخشی بیشتری دارد (۳۴). بر اساس این، برای بررسی ترکیبات از لحاظ این قانون از پایگاه SwissADME استفاده شد.

پیش‌بینی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و بیولوژیک ترکیبات بررسی‌شده: به‌طور کلی، داشتن خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوب در کنار اثر بخشی دارویی از شاخص های مهم برای ارزیابی یک مولکول به‌عنوان یک کاندید دارویی مناسب است؛ بنابراین در این مطالعه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل حلالیت در آب، مساحت قسمت های قطبی مولکول (Topological Polar Surface Area (TPSA) و قابلیت مهار سیتوکرومی که در طراحی پیش‌دارو به‌صورت

انرژی های اتصال (S-score kcal/mol) ارزیابی گردیدند و بررسی های کیفی از حیث برهمکنش میان لیگاندها و پروتئین شامل برهمکنش های هیدروژنی، هیدروفوبی و π - π با آمینواسیدهای موجود در پاکت اتصال پروتئین، توسط ماژول LigX در نرم افزارهای MOE و UCSF Chimera آنالیز شد. خاطر نشان می شود که در کنار محیط های *in vivo* و *in vitro* محیط *in silico* به عنوان یک محیط کارآمد برای تجزیه و تحلیل جزئیات فرایندهای پیچیده زیستی محسوب می شود.

یافته ها

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و مؤلفه های فارماکوکیتیک: بر اساس قانون لیبینسکی و تعریف قانون ۵تایی، پیش بینی قابل جذب بودن ترکیبات از راه خوراکی

بر اساس وزن مولکولی، فاکتور چربی دوستی و تعداد اتم های دهنده و پذیرنده پیوند هیدروژنی ارائه می گردد. Logp میزان لیپوفیلیسیته ماده را نشان می دهد که می بایست بین ۱ الی ۵ باشد؛ پس هر اندازه میزان آن از ۵ بزرگ تر باشد، میزان چربی دوستی ماده بیشتر و جذب گوارشی آن کمتر خواهد بود.

توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی مؤلفه دیگری برای نفوذپذیری دارو است که برای جذب ایدئال تعداد دهندگان پیوند هیدروژنی و پذیرندگان پیوند هیدروژنی باید به ترتیب کمتر از ۵ و ۱۰ باشد. نتایج به دست آمده از قانون لیبینسکی با توجه به پایگاه SwissADME در جدول شماره ۱ آورده شده است. بر اساس این نتایج، همه آنالوگ های کوئرستین (به جز Cynaroside، Myricitrin و Rutin) از قانون لیبینسکی پیروی می کنند.

جدول شماره ۱. مؤلفه های لیبینسکی داروهای استاندارد و آنالوگ های کوئرستین

| نام ترکیب | وزن مولکولی | پذیرندگان پیوند هیدروژنی | دهندگان پیوند هیدروژنی | Logp | Lipinski |
|------------------|-------------|--------------------------|------------------------|-------|----------|
| Apigenin | ۲۷۰/۲۴ | ۵ | ۳ | ۳/۰۲ | بله |
| Baicalein | ۲۷۰/۲۴ | ۵ | ۳ | ۳/۱۶ | بله |
| Chrysin | ۲۵۴/۲۴ | ۴ | ۲ | ۳/۵۲ | بله |
| daidzein | ۲۵۴/۲۴ | ۴ | ۲ | ۲/۴۷ | بله |
| Dihydromyricetin | ۳۲۰/۲۵ | ۸ | ۶ | ۰/۵۹ | بله |
| Fisetin | ۲۸۶/۲۴ | ۶ | ۴ | ۱/۹۷ | بله |
| Formononetin | ۲۸۶/۲۴ | ۴ | ۱ | ۲/۸۰ | بله |
| Genistein | ۲۷۰/۲۴ | ۵ | ۳ | ۲/۶۷ | بله |
| Hesperetin | ۳۰۲/۲۸ | ۶ | ۳ | ۲/۶۰ | بله |
| Kaempferol | ۲۸۶/۲۴ | ۶ | ۴ | ۱/۹۰ | بله |
| Liquiritigenin | ۲۵۶/۲۵ | ۴ | ۲ | ۲/۳۰ | بله |
| Luteolin | ۲۸۶/۲۴ | ۶ | ۴ | ۲/۵۳ | بله |
| Cynaroside | ۴۴۸/۳۸ | ۱۱ | ۷ | ۱/۴۶ | خیر |
| Myricetin | ۳۱۸/۲۴ | ۸ | ۶ | ۱/۱۸ | بله |
| Myricitrin | ۴۶۴/۳۸ | ۱۲ | ۸ | ۰/۵۱ | خیر |
| Naringenin | ۲۷۲/۲۵ | ۵ | ۳ | ۲/۵۲ | بله |
| Puerarin | ۴۱۶/۳۸ | ۹ | ۶ | ۰/۰۱ | بله |
| Quercetin | ۳۰۲/۲۴ | ۷ | ۵ | ۱/۵۴ | بله |
| Rutin | ۶۱۰/۵۲ | ۱۶ | ۱۰ | -۰/۳۳ | خیر |
| Tangeretin | ۳۷۲/۳۷ | ۷ | ۰ | ۳/۰۴ | بله |
| Ritonavir | ۷۲۰/۹۴ | ۷ | ۴ | ۶/۰۵ | خیر |
| Lopinavir | ۶۲۸/۸۰ | ۵ | ۴ | ۵/۹۲ | خیر |

می‌شود. ترکیباتی که PSA بزرگ‌تر از 140 \AA دارند، نفوذپذیری مناسب ندارند. سیتوکروم‌ها از آنزیم‌های مهم در بدن هستند که به‌طور عمده در کبد و روده یافت می‌شوند و مولکول‌های آلی خارجی مانند سموم یا داروها را اکسید می‌کنند تا بتوانند از بدن خارج شوند؛ بنابراین، بررسی این سیتوکروم‌ها در جذب و اثربخشی دارو بسیار مؤثر است و چنانچه ترکیب کاندید شده، مهارکننده این سیتوکروم‌ها نباشد، می‌توان عنوان کرد که دارو قابلیت جذب گوارشی مناسبی دارد و به‌صورت خوراکی قابل مصرف است.

همچنین آنالوگ‌های کوئرستین از لحاظ خصوصیات فیزیکوشیمیایی دیگر و مؤلفه‌های فارماکوکینتیک ارزیابی شدند (جدول شماره ۲). Logs میزان حلالیت ماده را نشان می‌دهد که میزان بالای صفر آن نشان‌دهنده حلالیت بالا و میزان کمتر از ۱۰- نشان‌دهنده نامحلول بودن ماده مدنظر است. عامل مهم دیگری که نقش مستقیمی در نفوذپذیری ترکیبات زیست فعال دارد، مساحت‌های قطبی مولکول (TPSA) است. بر اساس مطالعات انجام‌شده، نفوذپذیری ترکیبات با افزایش جرم ماده و کاهش Polar Surface Area (PSA) بیشتر

جدول شماره ۲. بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی داروهای استاندارد و آنالوگ‌های کوئرستین مطالعه شده

| نام ترکیب | LogS | TPSA | جذب گوارشی | BBB permeant | مهارکننده سیتوکروم CYP1A2 | مهارکننده سیتوکروم CYP2C9 | مهارکننده سیتوکروم CYP2D6 | مهارکننده سیتوکروم CYP3A4 | Leadlikeness |
|------------------|-------|--------|------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|
| Apigenin | -۳/۹۴ | ۹۰/۹۰ | بالا | خیر | بله | خیر | بله | بله | بله |
| Baicalein | -۴/۰۳ | ۹۰/۹۰ | بالا | خیر | بله | خیر | بله | بله | بله |
| Chrysin | -۴/۱۹ | ۷۰/۶۷ | بالا | بله | بله | خیر | بله | بله | خیر |
| daidzein | -۳/۵۳ | ۷۰/۶۷ | بالا | بله | بله | خیر | بله | بله | بله |
| Dihydromyricetin | -۲/۵۲ | ۱۴۷/۶۸ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر | بله |
| Fisetin | -۳/۳۵ | ۱۱۱/۱۳ | بالا | خیر | بله | خیر | بله | بله | بله |
| Formononetin | -۳/۷۳ | ۵۹/۶۷ | بالا | بله | بله | خیر | بله | بله | بله |
| Genistein | -۳/۷۲ | ۹۰/۹۰ | بالا | خیر | بله | خیر | بله | بله | بله |
| Hesperetin | -۳/۶۲ | ۹۶/۲۲ | بالا | خیر | بله | خیر | خیر | بله | بله |
| Kaempferol | -۳/۳۱ | ۱۱۱/۱۳ | بالا | خیر | بله | خیر | بله | بله | بله |
| Liquiritigenin | -۳/۲۸ | ۶۶/۷۶ | بالا | بله | بله | خیر | خیر | خیر | بله |
| Luteolin | -۳/۷۱ | ۱۱۱/۱۳ | بالا | خیر | بله | خیر | بله | بله | بله |
| Cynaroside | -۳/۶۵ | ۱۹۰/۲۸ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| Myricetin | -۳/۰۱ | ۱۵۱/۵۹ | کم | خیر | بله | خیر | خیر | بله | بله |
| Myricitrin | -۳/۲۰ | ۲۱۰/۵۱ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| Naringenin | -۳/۴۹ | ۸۶/۹۹ | بالا | خیر | بله | خیر | خیر | بله | بله |
| Puerarin | -۳/۶۲ | ۱۶۰/۸۲ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| Quercetin | -۳/۱۶ | ۱۳۱/۳۶ | بالا | خیر | بله | خیر | بله | بله | بله |
| Rutin | -۳/۳۰ | ۲۶۹/۴۳ | کم | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر | خیر |
| Tangeretin | -۴/۱۱ | ۷۶/۳۶ | بالا | بله | خیر | خیر | بله | بله | خیر |
| Ritonavir | -۶/۹۹ | ۲۰۲/۲۶ | کم | خیر | خیر | خیر | بله | خیر | خیر |
| Lopinavir | -۴/۶۴ | ۱۲۰ | بالا | خیر | خیر | بله | خیر | بله | خیر |

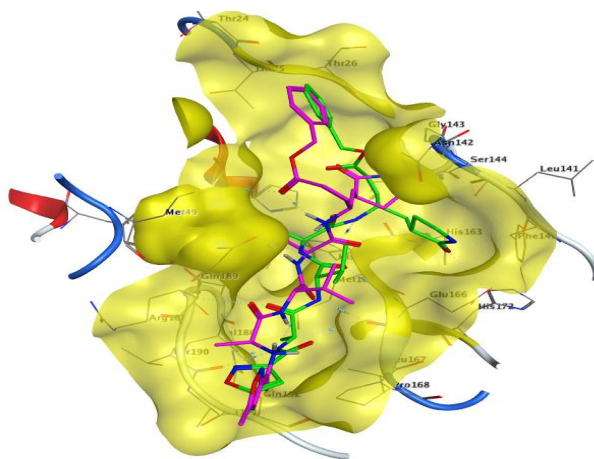
در نهایت، برای اثربخشی یک دارو به صورت خوراکی، تزریق وریدی یا جذب پوستی باید برآیندی از عامل‌های یادشده را در نظر گرفت. بر اساس جدول شماره ۲، داروی ریتوناویر محلولیت نسبی، نفوذپذیری نامناسب و جذب گوارشی پایین دارد و باید به صورت تزریق وریدی استفاده شود؛ اما داروی لوپیناویر نفوذپذیری مناسب و جذب گوارشی بالا و قابلیت مصرف خوراکی دارد؛ همچنین مشاهده شد که از میان کوئرستین و آنالوگ‌هایش، Dihydromyricetin، Myricitrin، Myricetin، Cynaroside و Puerarin مصرف خوراکی و Rutin با داشتن حلالیت نسبی، نفوذپذیری نامناسب و جذب گوارشی اندک، قابلیت مصرف خوراکی ندارند و می‌بایست مانند داروی ریتوناویر، به صورت تزریق وریدی استفاده شوند؛ اما دیگر ترکیبات بررسی شده در جدول با داشتن نفوذپذیری مناسب و جذب گوارشی بالا، قابلیت مصرف خوراکی دارند.

داکینگ مولکولی: در ابتدا به منظور اعتبارسنجی عملیات داکینگ، لیگاند N3 از جایگاه فعال آنزیم پروتئاز اصلی (6LU7) برداشته شد و پس از انجام داکینگ مقایسه گردید. دستورالعمل داکینگ با داکینگ مجدد لیگاند N3 در ساختار پروتئاز اصلی تأیید شد. در شکل شماره ۲ می‌توان مشاهده کرد که مولکول N3 به موقعیت‌های مشابه پروتئاز اصلی، در مقایسه با شکل کریستالوگرافی اصلی خود، متصل شده است و ساختار

داک شده پس از قرار دادن آن روی کمپلکس اصلی متبلور شده (Root-Mean-Square-Deviation (RMSD)، $1/67\text{\AA}$ داشت که نشان دهنده اعتبار روش است. در اینجا، آمینواسیدهایی که در مجاورت $6/5\text{\AA}$ از مهارکننده N3 نشان داده شده اند، به عنوان باقی مانده های اتصال اصلی در نظر گرفته می‌شوند؛ همچنین آمینواسیدهایی مانند Met49، His41، Leu27، Phe140، Leu141، Asn142، Gly143، Ser144، Cys145، His163، His164، Met165، Glu166 و Gln189 در پاکت کاتالستی پروتئاز اصلی قرار دارند (شکل شماره ۲).

پس از اعتبارسنجی داکینگ، ساختار سه بعدی آنالوگ‌های کوئرستین و داروهای استاندارد در جایگاه فعال آنزیم پروتئاز اصلی داک شدند. نتایج به دست آمده از داکینگ مولکولی میان آنزیم پروتئاز اصلی با هر کدام از آنالوگ‌های کوئرستین و داروهای استاندارد در جدول شماره ۳ آمده است.

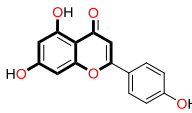
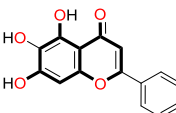
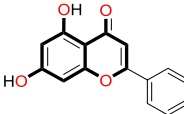
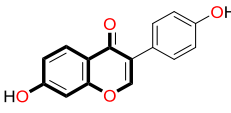
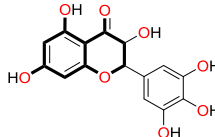
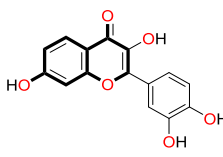
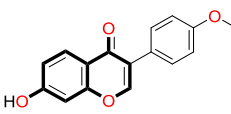
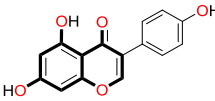
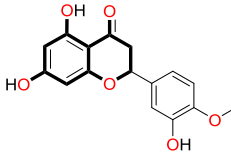
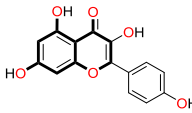
همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیشتر آنالوگ‌های کوئرستین، با توجه به انرژی حاصل از برهمکنش لیگاند-گیرنده، اتصال مناسبی با آنزیم یادشده دارند و در جدول مهم‌ترین آمینواسیدهای درگیر در جایگاه فعال آنزیم و همه برهمکنش‌های لیگاندها شامل پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش هیدروفوبی و $\pi-\pi$ ذکر شده است.



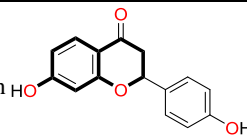
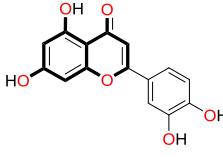
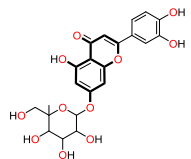
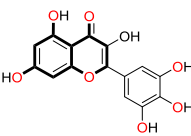
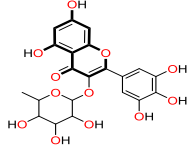
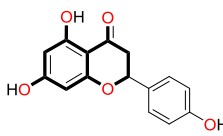
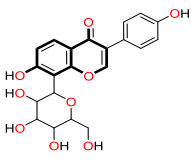
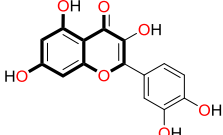
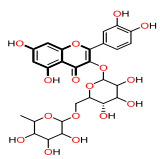
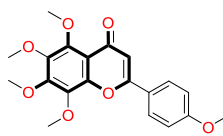
شکل شماره ۲. اعتبارسنجی مجدد برای N3. مهارکننده کریستالوگرافی (سبز) و مهارکننده مجدد داک شده N3 (ارغوانی) در جایگاه اتصال 6LU7

جدول شماره ۳. انرژی اتصال و برهمکنش های موجود میان ترکیبات مطالعه شده و آمینواسیدهای جایگاه فعال آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹

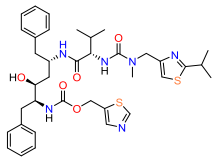
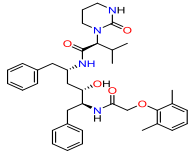
آنزیمی کوئرتسین و آنالوگ هایش بر آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹

| برهمکنش $\pi-\pi$ | برهمکنش های هیدروفوب | پیوند هیدروژنی | انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول) | نام ترکیب | ساختار |
|-------------------|---|---|--------------------------------|------------------|---|
| His41 | Met165, His163, Arg188, Glu166, Phe140, Met49, Asp187, Asn142, Thr25, gly143 | Cys145, Ser144, His164, Leu141 | -۱۲/۶۶ | Apigenin |  |
| His41 | Met49, Asn142, Gln189, Met165, His164, his163, his172 | Leu141, Ser144, Phe140, Glu166, Cys145, | -۱۳/۲۴ | Baicalein |  |
| His41 | Leu141, Met49, Asn142, Phe140, Met165, His164, His163, Glu166 | Ser144, His163, Cys145 | -۱۱/۶۳ | Chrysin |  |
| His41 | Met49, Asn142, Gln189, Met165, His164, His163, His172, Leu141, Phe140, Glu166, Arg188, Ser144, Thr190 | Gly143, Cys145 | -۱۲/۴۳ | Daidzein |  |
| His41 | Cys145, Met49, Asn142, Gln189, Met165, His164, His163, His172, Leu141, Phe140, Glu166, Arg188, Ser144, Thr190 | Glu166, Gln189, His163, Leu141 | -۱۰/۷۲ | Dihydromyricetin |  |
| His41 | Met49, Asn142, Gln189, Met165, His164, His163, His172, Leu141, Phe140, Glu166, Arg188, Thr190 | Cys145, Ser144 | -۱۲/۵۱ | Fisetin |  |
| - | Ser144, Met49, Asn142, Gln189, Met165, His164, His163, His172, Leu141, Phe140, Glu166, Arg188, Thr190, Gln192 | Cys145, Leu141, Gly143 | -۱۲/۵۴ | Formononetin |  |
| His41 | Leu141, Phe140, Asn142, His164, Arg188, Leu27, Tyr54, Met49 | Gly143, Ser144, Cys145, His163 | -۱۲/۹۲ | Genistein |  |
| His41 | Asn142, Met165, His164, Glu166, Gly143, Gln189, Met49, Leu27, Thr26 | Cys145, Leu141, Ser144, His163, Phe140 | -۱۲/۷۰ | Hesperetin |  |
| - | Asn142, Phe140, Met165, His164, Glu166, Gly143, Gln189, Met49, Thr26 | Cys145, Leu141, Ser144, His163 | -۱۱/۹۷ | Kaempferol |  |

ادامه جدول شماره ۳.

| | | | | | |
|-------|---|--|--------|----------------|---|
| His41 | Asn142, Phe140, Met165, His164, His163, Leu141, Glu166, Gly143, Gln189, Met49 | Cys145, Ser144 | -۱۰/۳۵ | Liquiritigenin |  |
| - | Asn142, Cys145, Met165, His164, His163, Leu141, Glu166, Gly143, Gln189, Met49, Leu27, Thr25, His172 | Phe140, His163, Ser144, is41 | -۱۲/۴۱ | Luteolin |  |
| His41 | Asn142, Met165, His164, Leu141, Gly143, Gln189, Met49, His164, His163 | Cys145, Phe140, Ser144, Glu166 | -۱۱/۷۹ | Cynaroside |  |
| His41 | Asn142, Phe140, Cys145, Met165, His164, Leu141, Gly143, Glu166, Gln189, Met49, His164, His163 | Gly143, His163 | -۱۱/۰۶ | Myricetin |  |
| His41 | Phe140, Cys145, Met165, His164, Glu166, Gln189, Met49, Arg188, Asp187 | Asn142, Ser144, Leu141, Gly143 | -۱۰/۴۲ | Myricitrin |  |
| His41 | Phe140, Thr26, Thr25, Leu141, Asn142, His172, His163, Met49, Met165, Gln189 | Gly143, Ser144, Cys145, Arg188 | -۱۲/۸۳ | Naringenin |  |
| His41 | , ۱۶۵, Met۱۴۳Gly, His163, ۱۶۴His, ۱۴۲, Asn۱۶۶Glu, ۱۸۹, Gln۴۹Met Thr54, Phe140 | Cys145, Leu141, Ser144, Asp187 | -۱۰/۷۱ | Puerarin |  |
| - | Met49, His164, Met165, Asn142 | His41, Leu141, Gly143, Ser144, Cys145, Gln189 | -۱۳/۵۴ | Quercetin |  |
| - | , ۱۴۳, Gly۴۱His, ۱۶۴, His۱۶۵Met, ۴۹, Met۱۴۲Asn, Leu141, Met165, Leu141, Gln192, Phe140 | , Thr190, ۱۶۶Glu, Ser144, Cys145, His163, Gln189 | -۱۰/۳۶ | Rutin |  |
| His41 | , ۱۶۵Cys145, Met, ۱۴۲, Asn۱۶۴His, Met165, ۴۹Met, Leu141, Asp187, Gln192, Phe140, Arg188, Gln189, | , Gly143۱۶۶Glu | -۱۱/۶۰ | Tangeretin |  |

ادامه جدول شماره ۳.

| | | | | | |
|-------|---|---------------|--------|-----------|---|
| - | , ۱۴۵, Cys۴۱His , ۱۶۵, Met۱۴۳Gly , ۱۶۶, Glu۱۶۴His , ۴۹, Met۱۴۲Asn , ۲۶, Thr۱۸۹Gln , ۴۵, Thr۲۵, Thr۲۴Thr ۴۶Ser | ۲۵, Thr۱۶۶Glu | -۶/۸۴ | Ritonavir |  |
| His41 | His 41, Cys145, Gly143, Met165, His164, Glu166, Asn142, Leu141, Phe140, Met49, Gln189, Asp187 | Gln189 | -۱۰/۸۹ | Lopinavir |  |

Quercetin را شناسایی کردند که در پایگاه داده PASS ذخیره شده‌اند. جدول شماره ۴ نتایج پیش‌بینی چهارده فعالیت بیولوژیکی را برای آنالوگ‌های کوئرستینی انتخاب‌شده نشان می‌دهد. گفتنی است نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده کاربرد عمده طرح PASS برای پیش‌بینی فعالیت‌های بیولوژیکی Naringenin، Genistein، Baicalein و Quercetin بر اساس ساختار فلاونوئیدی ترکیبات مربوطه است که با ضریب پیش‌بینی متوسط برابر با ۰/۸۰ (Pa در محدوده ۰/۴۵۸ تا ۰/۹۷۳ است، هنگامی که Pa>Pi) برای این ترکیبات نشان داده شده است.

بررسی خصوصیات بیولوژی ترکیب کوئرستین و آنالوگ‌هایش: مطالعات طراحی دارو PASS را به‌عنوان یک ابزار محبوب استفاده‌شده در تقریباً هر صنعت دارویی، با توجه به تجزیه و تحلیل رابطه ساختار-فعالیت در نظر گرفته‌اند و امتیاز پیش‌بینی فعالیت‌های بیولوژیکی را بر اساس نسبت احتمال فعال بودن (Pa/Pi) Prediction of activity و احتمال غیرفعال بودن (Pi/Probable activity) می‌دهد. Pa بالاتر به این معنی است که فعالیت بیولوژیکی احتمال بیشتری برای یک ترکیب دارد. علاوه بر این، محققان طیف‌های فعالیت بیولوژیکی ترکیبات Naringenin، Genistein، Baicalein و

جدول شماره ۴. نتایج پیش‌بینی PASS از فعالیت‌های بیولوژیکی ترکیبات Quercetin و Naringenin، Genistein، Baicalein

| Quercetin | | Hesperetin | | Genistein | | Baicalein | | فعالیت بیولوژیک | ردیف |
|-----------|-------|------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------------------------|------|
| Pa | Pi | Pa | Pi | Pa | Pi | Pa | Pi | | |
| ۰/۹۷۳ | ۰/۰۰۲ | ۰/۹۶۴ | ۰/۰۰۳ | ۰/۹۱۳ | ۰/۰۰۸ | ۰/۹۴۵ | ۰/۰۰۴ | Membrane integrity agonist | ۱ |
| ۰/۹۵۷ | ۰/۰۰۲ | ۰/۹۵۶ | ۰/۰۰۲ | ۰/۷۶۳ | ۰/۰۰۴ | ۰/۸۳۲ | ۰/۰۰۳ | HMOX1 expression enhancer | ۲ |
| ۰/۹۶۹ | ۰/۰۰۲ | ۰/۹۱۱ | ۰/۰۰۵ | ۰/۹۳۹ | ۰/۰۰۴ | ۰/۹۴۲ | ۰/۰۰۴ | HIF1A expression inhibitor | ۳ |
| ۰/۸۹۵ | ۰/۰۰۲ | ۰/۸۹۲ | ۰/۰۰۲ | ۰/۷۴۴ | ۰/۰۰۶ | ۰/۸۳۲ | ۰/۰۰۳ | Histidine kinase inhibitor | ۴ |
| ۰/۸۹۴ | ۰/۰۰۴ | ۰/۸۶۶ | ۰/۰۰۵ | ۰/۴۶۹ | ۰/۰۵۵ | ۰/۸۷۱ | ۰/۰۰۵ | Aldehyde oxidase inhibitor | ۵ |
| ۰/۹۴۰ | ۰/۰۰۱ | ۰/۸۵۷ | ۰/۰۰۳ | ۰/۸۷۴ | ۰/۰۰۳ | ۰/۸۸۸ | ۰/۰۰۲ | Antimutagenic | ۶ |
| ۰/۷۵۱ | ۰/۰۳۴ | ۰/۸۴۴ | ۰/۰۱۰ | ۰/۶۵۸ | ۰/۰۷۶ | ۰/۷۲۶ | ۰/۰۴۵ | Mucomembranous protector | ۷ |
| ۰/۸۴۴ | ۰/۰۰۸ | ۰/۸۲۲ | ۰/۰۰۹ | ۰/۸۲۴ | ۰/۰۰۹ | ۰/۸۹۵ | ۰/۰۰۵ | TP53 expression enhancer | ۸ |
| ۰/۷۱۷ | ۰/۰۰۶ | ۰/۷۲۴ | ۰/۰۰۶ | ۰/۶۰۹ | ۰/۰۱۰ | ۰/۵۸۲ | ۰/۰۱۱ | Chemopreventive | ۹ |
| ۰/۵۶۶ | ۰/۰۶۴ | ۰/۵۸۶ | ۰/۰۵۸ | ۰/۵۶۶ | ۰/۰۱۱ | ۰/۷۰۶ | ۰/۰۳۲ | Sugar-phosphatase inhibitor | ۱۰ |
| ۰/۹۷۳ | ۰/۰۰۲ | ۰/۹۶۴ | ۰/۰۰۳ | ۰/۹۱۳ | ۰/۰۰۸ | ۰/۹۴۵ | ۰/۰۰۴ | Membrane integrity agonist | ۱۱ |
| ۰/۶۸۹ | ۰/۰۱۷ | ۰/۶۶۰ | ۰/۰۲۱ | ۰/۶۲۶ | ۰/۰۲۷ | ۰/۶۷۴ | ۰/۰۱۹ | Antiinflammatory | ۱۲ |
| ۰/۸۱۱ | ۰/۰۰۳ | ۰/۷۹ | ۰/۰۰۳ | ۰/۴۵۸ | ۰/۰۱۳ | ۰/۶۹۶ | ۰/۰۰۴ | Free radical scavenger | ۱۳ |
| ۰/۷۰۶ | ۰/۰۰۷ | ۰/۷۲۱ | ۰/۰۰۶ | ۰/۶۸۰ | ۰/۰۰۸ | ۰/۶۱۱ | ۰/۰۱۱ | Hepatoprotectant | ۱۴ |

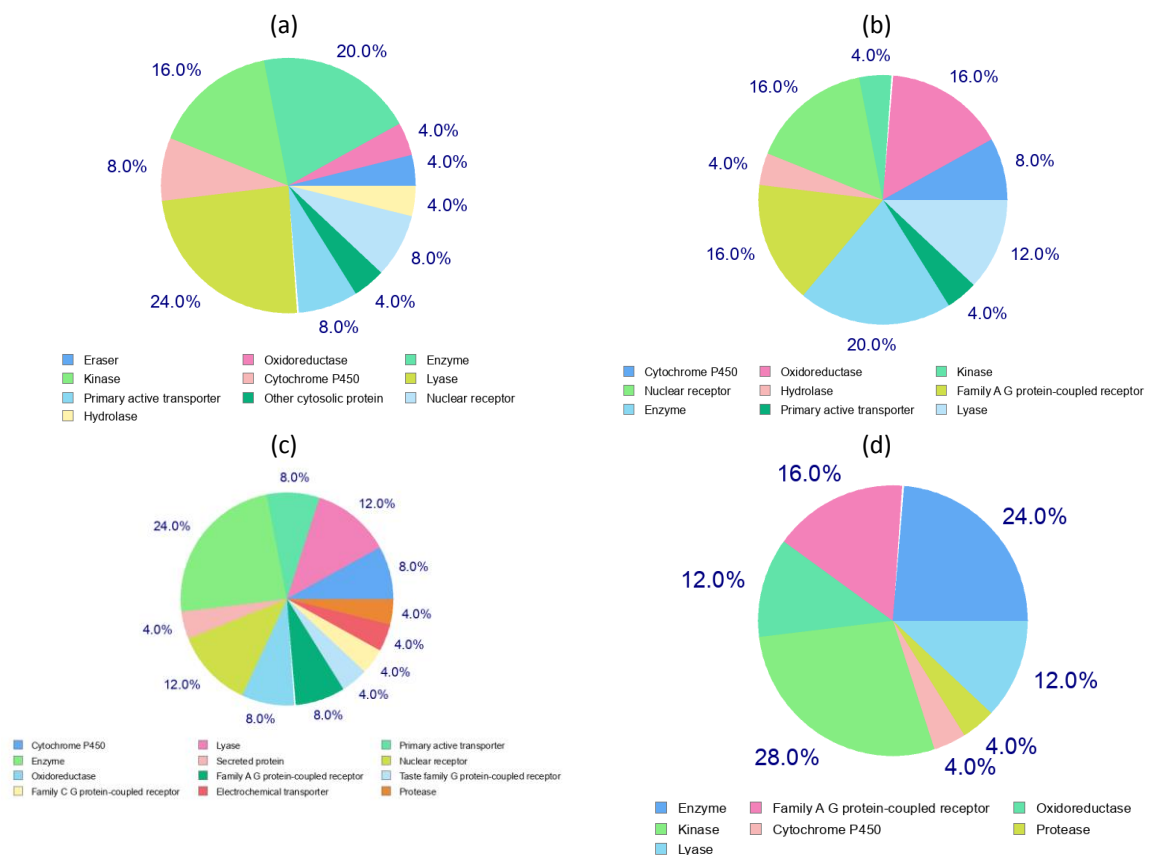
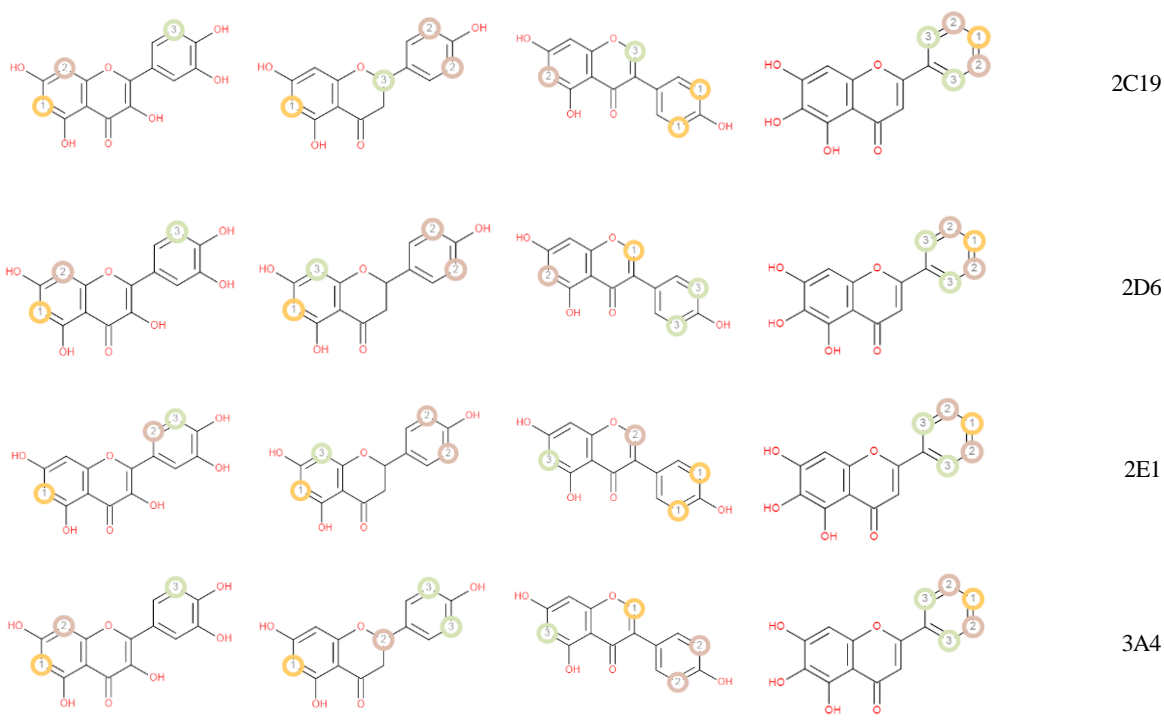
سیتوکروم P450 عامل کلیدی برای متابولیسم مواد خارجی مانند داروها است. شناسایی مکان‌های متابولیک در مولکول‌های داروماند، توانایی دفع آن‌ها از بدن را مشخص می‌کند. مکان‌های احتمالی متابولیسم طریق سیتوکروم‌های 1A2، 2E1، 2C9، 2A6، 2C8، 2D6، 2C9 و 3A4 توسط ابزار RS-Web Predictor ارزیابی شد. مکان‌های احتمالی روی ترکیبات شیمیایی که در آن متابولیسم توسط ایزوفرم‌های آنزیم‌های CYP450 اتفاق می‌افتد، با دایره‌هایی روی

ساختار شیمیایی چهار لیگاند مشخص می‌شوند. طبق پیش‌بینی مکان‌های احتمالی متابولیسم (جدول شماره ۵)، Baicalein ۵ مکان برای همه سیتوکروم‌های P450 دارد. ترکیبات Genistein و Naringenin ۵ مکان برای سیتوکروم P450 2C9 و ۴ مکان متابولیسم برای سیتوکروم‌های 2E1، 2A6، 2C8، 1A2، 2D6، 2C9، 3A4، 2C19 دارند. پیش‌بینی‌های متابولیسم برای Quercetin، ۳ مکان سیتوکروم P450 را برای 1A2، 2A6، 2C8، 2D6، 2C9، 3A4 و 2E1 و ۴ مکان را برای 2C9 نشان داد.

جدول شماره ۵. فهرست مکان‌های P450 مطالعه پیش‌بینی متابولیسم مولکول‌های Baicalein، Genistein، Naringenin و Quercetin

| Quercetin | Naringenin | Genistein | Baicalein | خواص شباهت به دارو |
|-----------|------------|-----------|-----------|--------------------|
| | | | | 1A2 |
| | | | | 2A6 |
| | | | | 2B6 |
| | | | | 2C8 |
| | | | | 2C9 |

ادامه جدول شماره ۵.



شکل شماره ۳. ۲۵ هدف پیش‌بینی شده برای ترکیبات (a) Baicalein، (b) Genistein، (c) Naringenin و (d) Quercetin

پیش بینی هدف: مطالعات هدف مولکولی برای یافتن عوارض جانبی فنوتیپی یا واکنش متقابل بالقوه ناشی از عمل Quercetin و Naringenin، Genistein، Baicalein روی پروتئین ها، به عنوان بهترین آنالوگ های کوئرستینی مهم هستند. شکل شماره ۳، درصد زیست فعالی آنالوگ های با اثر مهارى بهتر را با توجه به اهداف پروتئینی انتخاب شده نشان می دهد. تجزیه و تحلیل نمودارهای دایره ای نشان داد که کینازها، آنزیم ها، پروتئین ها، اکسیدوردوکتازها، گیرنده های جفت شده با پروتئین خانواده A، سیتوکروم P450، هیدرولاز و لیازاها اهداف اصلی پیش بینی شده برای همه ترکیبات پیشنهادی بودند؛ همچنین نمودار دایره ای Baicalein، ۴ درصد پروتئین سیتوزولی و ۸ درصد گیرنده هسته ای و ناقل فعال اولیه را پیش بینی کرد. برای Genistein، نمودار دایره ای ۱۶ درصد گیرنده هسته ای و ۴ درصد ناقل فعال اولیه را نشان داد و برای Naringenin، نمودار دایره ای ۱۲ درصد گیرنده هسته ای و ۸ درصد ناقل فعال اولیه و ۴ درصد پروتئین ترشحی و ناقل الکتروشیمی را پیش بینی کرد. مکان های احتمالی هدف که ممکن است آنالوگ های کوئرستین انتخاب شده به آنها متصل شوند، کیناز، اکسیدوردوکتاز، آنزیم ها و لیازاها هستند که واکنش دارویی را بر این اساس تحریک می کنند؛ همچنین این تجزیه و تحلیل توضیحی برای استفاده از Quercetin و Naringenin، Genistein، Baicalein به عنوان مهارکننده های اصلی پروتئاز SARS-CoV-2 ارائه می کند.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به همه گیری کروناویروس در جهان و تلاش برای کشف دارو و واکسن مؤثری علیه بیماری کووید-۱۹، همچنان لازم است که درمان های جدیدی برای مقابله با عفونت ناشی از کروناویروس شناسایی گردد. در این مطالعه، سازوکار مهارى آنالوگ های کوئرستین روی آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹ بررسی شد و نتایج داکینگ نشان داد که پروتئاز اصلی نقش اساسی در تکثیر

و رونویسی کروناویروس دارد و به عنوان یک هدف درمانی بالقوه در نظر گرفته می شود؛ زیرا مهار آن می تواند از پیشروی ویروس جلوگیری کند.

پس از اعتبارسنجی دستورالعمل داکینگ، بررسی نتایج داکینگ آنالوگ های کوئرستین نشان داد که همه آنالوگ ها فضای مشابه با لیگاند N3 درون جایگاه فعال پروتئاز اصلی را اشغال می کنند. بر اساس نتایج جدول شماره ۳ و شکل شماره ۲، دو معیار مهم در تعیین بهترین حالت داک شده، بیشترین (منفی ترین) انرژی اتصال آزاد تخمین زده شده و همچنین بیشترین برهمکنش های مناسب با آمینواسیدهای اصلی جایگاه فعال پروتئاز اصلی هستند. نتایج حاصل از بررسی داروهای استاندارد به کاررفته به عنوان کنترل مثبت در جدول شماره ۳، بیانگر برهمکنش ریتوناویر و لوپیناویر به ترتیب با انرژی مهارى ۹/۲۰- و ۱۰/۶۸- کیلوکالری بر مول، با جایگاه فعال آنزیم پروتئاز اصلی بود. داروی ریتوناویر با آمینواسیدهای Thr25 و Glu166 پیوند هیدروژنی و با آمینواسیدهای Met49، His41، Met165 و Cys145 برهمکنش هیدروفوبی برقرار کرده است (شکل شماره 4a). داروی لوپیناویر که در جایگاه فعال پروتئاز اصلی قرار گرفته است، با آمینواسید Gln189 پیوند هیدروژنی و با آمینواسید His41 برهمکنش π - π دارد و با آمینواسیدهای Phe140، Leu141، Met49، His164 و Gly143 برهمکنش هیدروفوبی برقرار کرده است (شکل شماره 4b).

بر اساس جدول شماره ۲، از میان ۲۰ آنالوگ کوئرستین، اثر مهارى ترکیبات Baicalein، Genistein، Naringenin و Quercetin به ترتیب با انرژی های مهارى ۱۳/۲۴-، ۱۲/۹۲-، ۱۲/۸۳- و ۱۳/۵۴- کیلوکالری بر مول، نسبت به داروهای استاندارد به کاررفته روی پروتئاز اصلی قوی تر است؛ همچنین دیگر آنالوگ های کوئرستین با انرژی های مهارى ۱۰/۳۵- تا ۱۲/۷۰- کیلوکالری بر مول، اثر مهارى بهتری نسبت به داروهای استاندارد دارند؛ بنابراین می توان گفت، اثر مهارى آنالوگ های کوئرستین روی پروتئاز اصلی، نسبت به

فلاونوئید با آمینواسیدهای Gly143، Ser144، Cys145 و His163 است. ترکیب Genistein نیز مشابه Baicalein، برهمکنش $\pi-\pi$ از طریق اتصال میان حلقه فنول ترکیب و حلقه ایمیدازول آمینواسید His41 دارد (شکل شماره 4d). یکی از تفاوت های مهم این دو ترکیب در استخلاف های حلقه فلاونوئید است. در Genistein، حلقه فنول در موقعیت ۳ و در Baicalein، حلقه فنیل در موقعیت ۲ حلقه فلاونوئید قرار گرفته است؛ بنابراین، حلقه فنول در موقعیت ۳ در Genistein روی جهت گیری فضایی ترکیب در جایگاه اتصال آنزیم مؤثر است و احتمالاً به ضرر دستگاه است و این امر می تواند یکی از علل کاهش انرژی اتصال و کاهش اثر ضدویروس این ترکیب نسبت به Baicalein شود.

برای ترکیب Naringenin، نتایج داکینگ نشان داد که برهمکنش های عمده این ترکیب مشابه Baicalein و Genistein، از نوع برهمکنش های هیدروفوب و پیوند هیدروژنی هستند. Naringenin توانایی تشکیل ۴ پیوند هیدروژنی توسط استخلاف های هیدروکسیل کربن های ۵ و ۷ و گروه کربونیل کربن ۴ حلقه فلاونوئید با آمینواسیدهای Gly143، Ser144، Cys145 و Arg188 را دارد (شکل شماره 4e)؛ همچنین Naringenin از طریق اتصال میان حلقه فنول کربن ۳ حلقه فلاونوئید با حلقه ایمیدازول آمینواسید His41، برهمکنش $\pi-\pi$ برقرار کرده است. این ترکیب به علت وجود حلقه فنول و حلقه آلیفاتیک در ساختار خود، در مقایسه با Baicalein، اثر ضدویروس ضعیف تری را نشان می دهد و ساختار غیرقابل انعطاف پذیر دارد؛ بنابراین، با وجود برهمکنش های مشابه با آمینواسیدهای جایگاه فعال، اما انرژی اتصال ضعیف تری نشان می دهد که احتمالاً کانفورمر نامناسب در فضای سه بعدی جایگاه فعال، باعث تضعیف برهمکنش ها شده است. مقدار لیوفیلیسیته Naringenin (Logp برابر ۲/۵۲) تقریباً برابر با لیوفیلیسیته Genistein است؛ اما به سبب وجود حلقه آلیفاتیک و ایجاد کانفورمر نامناسب در جایگاه فعال انرژی، اتصال ضعیف تری را نشان می دهد. نتایج داکینگ

داروهای استاندارد بیشتر است.

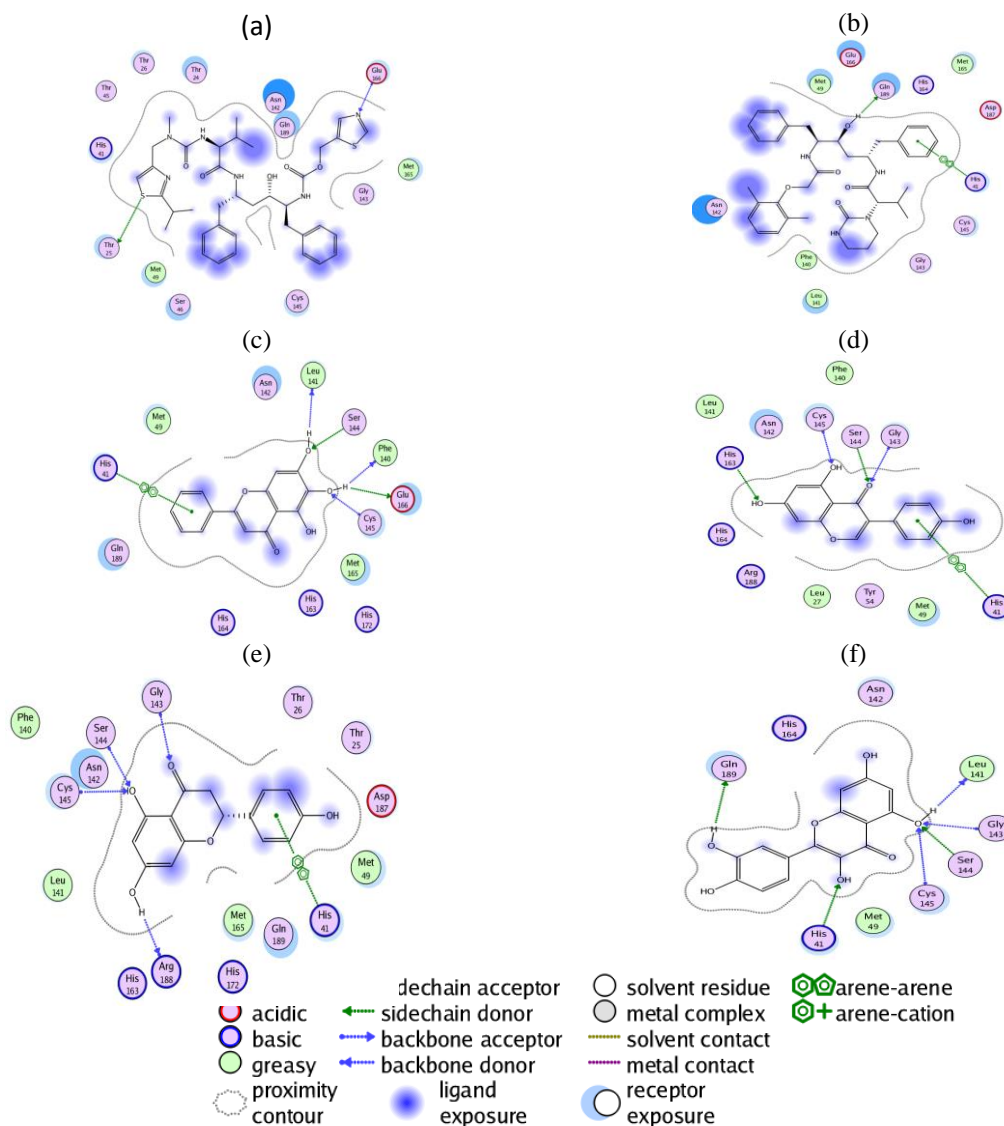
مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد که در میان آنالوگ های کوئرستین، ترکیب Baicalein به آنزیم پروتئاز اصلی با پیوند هیدروژنی و برهمکنش های هیدروفوبی متصل می گردد. استخلاف های هیدروکسیل در کربن های موقعیت ۶ و ۷ حلقه فلاونوئید با آمینواسیدهای Phe140، Leu141، Ser144، Cys145 و Glu166 پیوند هیدروژنی تشکیل می دهند و این گروه های هیدروکسیل باعث افزایش میزان حلالیت این ترکیب می شوند و در صورت مصرف خوراکی برای انسان، جذب گوارشی مناسبی نشان می دهند. علاوه بر این، ترکیب Baicalein قادر به ایجاد برهمکنش $\pi-\pi$ است که این اتصال میان حلقه فنیل متصل به موقعیت ۲ حلقه فلاونوئید و حلقه ایمیدازول آمینواسید His41 ایجاد می گردد (شکل شماره 4c). گفتنی است که این حلقه فنیل باعث افزایش لیوفیلیسیته ترکیب می شود و لیوفیلیسیته ترکیب Baicalein (Logp برابر ۳/۱۶) می تواند روی برهمکنش های هیدروفوبی با پروتئاز اصلی تأثیر داشته باشد؛ همچنین حلقه فلاونوئیدی و فنیل ترکیب Baicalein با آمینواسیدهای Met49، Met165، His163، His164، His172 و Gln189 برهمکنش های هیدروفوبی تشکیل می دهد.

ترکیب Genistein به سبب داشتن بخش های هیدروفیل (استخلاف هیدروکسیل) و هیدروفوب (حلقه آروماتیک)، توانایی تشکیل پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش های هیدروفوبی با آمینواسیدهای جایگاه فعال آنزیم را دارد و یک ترکیب تقریباً هیدروفیل با Logp برابر ۲/۶۷ است. مقدار لیوفیلیسیته این ترکیب کمتر از لیوفیلیسیته Baicalein است؛ بنابراین، میزان حلالیت این ترکیب بیشتر است و جذب گوارشی بهتری را نشان می دهد. این ترکیب قادر به تشکیل پیوند هیدروژنی توسط استخلاف های هیدروکسیل کربن های ۵ و ۷ و گروه کربونیل کربن ۴ حلقه فلاونوئید و استخلاف هیدروکسیل گروه فنول در موقعیت کربن ۳ حلقه

فعال آنزیم می شود؛ همچنین این ترکیب کاندید شده با آمینو اسیدهای Met49، Met165، His172، His164 و Asp187 برهمکنش های هیدروفوبی برقرار می کند (شکل شماره 4f).

در بررسی نتایج به دست آمده مشخص شد، در مجموع، این ترکیبات کاندید شده فعالیت بیولوژیک، خواص فیزیکوشیمیایی و فعالیت مهاری خوب تا قوی را روی آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹ نشان می دهند که نتایج داکینگ هم این فعالیت ها را تأیید می کند. علاوه بر این، بررسی برهمکنش های داکینگ بیانگر آن است که

مولکولی و اثر ضدویروس کووید-۱۹ ترکیب Quercetin همستگی خوبی با یکدیگر دارند و هر دو مقادیر مناسبی را نشان می دهند. این ترکیب در مقایسه با سایر آنالوگ های کوئرستینی و داروهای استاندارد، اثر ضدویروس و انرژی اتصال قوی تری را نشان می دهد. احتمالاً علت آن مربوط به هیدروفیلیته بالا (Logp برابر ۱/۵۴) و افزایش پیوندهای هیدروژنی این ترکیب از طریق استخلاف های هیدروکسیل با آمینو اسیدهای His41، Leu141، Gly143، Ser144، Cys145 و Gln189 است که باعث جهت گیری فضایی مناسب تر این ترکیب در جایگاه



شکل شماره ۴. نمایش برهمکنش های مجموعه لیگاند-پروتئین به صورت دوبعدی. a. ریتوناویر؛ b. لوپیناویر؛ c. Baicalein؛ d. Genistein؛ e. Quercetin f و Naringenin

برای کروناویروس بررسی شدند که نتایج بیانگر اتصال های قوی آمینواسیدهای His41 و Cys145 پروتئاز اصلی از طریق پیوند هیدروژنی و برهمکنش های هیدروفوب با ترکیبات بود (۳۱). در تحقیقی مشابه، عمرانی و همکاران (۲۰۲۱) اتصال مستحکم ترکیبات طبیعی با پروتئاز اصلی ویروس و مهار آن را نشان دادند (۴۲).

نتایج این مطالعه مشخص کرد که از میان آنالوگ‌های کوئرستین، ترکیبات Baicalein، Genistein، Naringenin و Quercetin به علت ویژگی‌های فارماکوکینتیکی مناسب و سمی نبودن، خواص بیولوژیک مطلوب و امتیاز داکینگ منفی و اتصالات قوی با آنزیم می‌توانند باعث مهار پروتئاز اصلی کووید-۱۹ شوند. هرچند انتظار می‌رود که با بررسی بیشتر و مطالعه دقیق‌تر این ترکیبات در شرایط *in vitro* و *in vivo* بتوان از این ترکیبات طبیعی به‌عنوان مهارکننده های بالقوه در مهار آنزیم پروتئاز اصلی و درمان کووید-۱۹ استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با کد مصوب ۳۳۶۴ و کد اخلاق IR.SKUMS.REC.1399.117 از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد است. بدین‌وسیله از آن معاونت محترم و مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد نهایت قدردانی به‌عمل می‌آید.

تعارض منافع

طبق نظر نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.SKUMS.REC.1399.117

References

1. Halim SA, Waqas M, Khan A, Al-Harrasi A. In silico prediction of novel inhibitors of SARS-

آمینواسیدهای Gly143، Ser144، Phe140، Met49، Met165، Leu141، Gln189 و به‌ویژه آمینواسیدهای کاتالیتیکی His41 و Cys145، نقش مهمی در برهمکنش آنالوگ‌های کوئرستین با آنزیم پروتئاز اصلی دارند.

در سال ۲۰۲۰، آرورا و همکاران اثر ۲۱ ترکیب فلاونوئید با استفاده از داکینگ مولکولی و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی در مهار آنزیم پروتئاز اصلی را نشان دادند. نتایج نشان داد که ترکیب Rutin با بالاترین انرژی اتصال (-۸/۷۰ کیلوکالری بر مول) با آمینواسیدهای سایت کاتالیزوری از قبیل Cys145، His41، Glu166، Met49، His163 و Leu141 برهمکنش‌های مؤثری دارد (۳۸). در تحقیق اوویس و همکاران (۲۰۲۰)، خاصیت ضدویروسی فلاونوئیدهای گیاه *Salvadora persica* روی آنزیم پروتئاز اصلی کووید-۱۹ با استفاده از داکینگ مولکولی بررسی شده است. نتایج مطالعه نشان داد که آمینواسیدهای Met165، Cys145، His41، Asn142، Gly143 و Leu141 نقش مهمی را در اتصال فلاونوئیدها به این پروتئین دارند (۳۹)؛ همچنین در سال ۲۰۲۰، چراک و همکاران به بررسی ترکیبات فلاونوئیدی گلیکوزیده شده به‌عنوان مهارکننده‌های پروتئاز اصلی پرداختند و اظهار داشتند که ترکیب Quercetin-3-O-rhamnoside با بالاترین انرژی اتصال (-۹/۷۰ کیلوکالری بر مول) را دارد و با آمینواسیدهای کلیدی Leu141، Phe140، Thr26 و Gly143 پیوند هیدروژنی برقرار کرده است (۴۰). در سال ۲۰۲۱، داس و همکاران به بررسی مهارکننده‌های پروتئاز اصلی پرداختند و نتایج مطالعه آنان نشان داد که پروتئاز اصلی با آمینواسیدهای کاتالیتیکی His41 و Cys145 می‌تواند نقش امیدوارکننده‌ای برای طراحی، توسعه و پیشرفت داروهای کروناویروس داشته باشد (۴۱). علاوه بر این، در سال ۲۰۲۱، رهمان و همکاران به بررسی ترکیبات طبیعی روی پروتئاز اصلی با استفاده از روش های محاسباتی پرداختند. در این مطالعه، تعداد فراوانی از ترکیبات طبیعی

CoV-2 main protease through structure-based virtual screening and molecular dynamic

- simulation. *Pharmaceuticals* 2021;14:896. doi.org/10.3390/ph14090896
2. Kase Y, Okano H. Neurological pathogenesis of SARS-CoV-2 (COVID-19): from virological features to clinical symptoms. *Inflamm Regen* 2021;41:1-7. doi.org/10.1186/s41232-021-00165-8
 3. Rahbar-Karbasdehi E, Rahbar-Karbasdehi F. Clinical challenges of stress cardiomyopathy during coronavirus 2019 epidemic. *Cell Mol Biomed Rep* 2021;1: 88-90. doi.org/10.55705/cnbr.2021.145790.1018
 4. Fazelinasab B. Biological Evaluation Of Coronaviruses And The Study Of Molecular Docking, Linalool, And Thymol As Orf1ab Protein Inhibitors And The Role Of Sars-Cov-2 Virus In Bioterrorism. *J Ilam Uni Med Sci* 2021; 28:77-96. doi.org/10.29252/sjimu.28.6.77
 5. Guo Y-R, Cao Q-D, Hong Z-S, Tan Y-Y, Chen S-D, Jin H-J, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. *Mil Med Res* 2020;7:1-10. doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0
 6. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579:270-73. doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7
 7. Arbour N, Day R, Newcombe J, Talbot PJ. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J Virol* 2000;74:8913-21. doi.org/10.1128/JVI.74.19.8913-8921.2000
 8. Van Der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10:368-73. doi.org/10.1038/nm1024
 9. Yang D, Leibowitz JL. The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Res* 2015;206:120-33. doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.025
 10. Drosten C, Günther S, Preiser W, Van Der Werf S, Brodt H-R, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348:1967-76. doi.org/10.1056/NEJMoa030747
 11. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:181-92. doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9
 12. Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012;367:1814-20. doi.org/10.1056/NEJMoa1211721
 13. Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamija P, et al. Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells* 2021;10:821. doi.org/10.3390/cells10040821
 14. Chen W, Wang Z, Wang Y, Li Y. Natural bioactive molecules as potential agents against SARS-CoV-2. *Front Pharmacol* 2021;12. doi.org/10.3389/fphar.2021.702472
 15. Kumar A, Choudhir G, Shukla SK, Sharma M, Tyagi P, Bhushan A, et al. Identification of phytochemical inhibitors against main protease of COVID-19 using molecular modeling approaches. *J Biomol Struct Dyn* 2021;39:3760-70. doi.org/10.1080/07391102.2020.1772112
 16. Hussein R, Elkhair H. Molecular docking identification for the efficacy of some zinc complexes with chloroquine and hydroxy-chloroquine against main protease of COVID-19. *J Mol Struct* 2021;1231:129979. doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129979
 17. Gyebe GA, Elfiky AA, Ogunyemi OM, Ibrahim IM, Adegunloye AP, Adebayo JO, et al. Structure-based virtual screening suggests inhibitors of 3-chymotrypsin-like protease of SARS-CoV-2 from *Vernonia amygdalina* and *Occinum gratissimum*. *Comput Biol Med* 2021;136:104671. doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104671
 18. Fontanet A, Autran B, Lina B, Kieny MP, Karim SSA, Sridhar D. SARS-CoV-2 variants and ending the COVID-19 pandemic. *The Lancet* 2021;397:952-54. doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00370-6
 19. Volkan E. COVID-19: Structural considerations for virus pathogenesis, therapeutic strategies and vaccine design in the Novel SARS-CoV-2 Variants Era. *Mol Biotechnol* 2021;63:885-97. doi.org/10.1007/s12033-021-00353-4
 20. Dai W, Zhang B, Jiang X-M, Su H, Li J, Zhao Y, et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science* 2020;368:1331-5. doi.org/10.1126/science.abb4489
 21. Zandi H, Harismah K. Computer-based tools for structural characterizations and activity specifications of natural products: a quick review. *Lab-in-Silico* 2021;2:50-54. doi.org/10.22034/labinsilico21021050
 22. Romano JD, Tatonetti NP. Informatics and computational methods in natural product drug discovery: a review and perspectives. *Front Genet* 2019;10:368. doi.org/10.3389/fgene.2019.00368
 23. Orhan IE, Senol Deniz FS. Natural products as potential leads against coronaviruses: could they be encouraging structural models against SARS-CoV-2? *Nat prod bioprospect* 2020;10:171-86. doi.org/10.1007/s13659-020-00250-4
 24. Pohl F, Kong Thoo Lin P. The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: in vitro, in vivo and clinical trials. *Molecules* 2018;23:3283. doi.org/10.3390/molecules23123283
 25. Jo S, Kim S, Shin DH, Kim M-S. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2020;35:145-51. doi.org/10.1080/14756366.2019.1690480
 26. Rupasinghe H. Special Issue “flavonoids and their disease prevention and treatment potential”: Recent advances and future perspectives. *Molecules* 2020;25:4746. doi.org/10.3390/molecules25204746
 27. Alzaabi MM, Hamdy R, Ashmawy NS, Hamoda AM, Alkhayat F, Khademi NN, et al. Flavonoids are promising safe therapy against COVID-19. *Phytochem Rev* 2021;1-22. doi.org/10.1007/s11101-021-09759-z
 28. Singh S, Sk MF, Sonawane A, Kar P, Sadhukhan S. Plant-derived natural polyphenols as potential

- antiviral drugs against SARS-CoV-2 via RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibition: an in-silico analysis. *J Biomol Struct Dyn* 2021;39:6249-64. doi.org/10.1080/07391102.2020.1796810
29. Tallei TE, Tumilaar SG, Niode NJ, Kepel BJ, Idroes R, Effendi Y, et al. Potential of plant bioactive compounds as SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and spike (S) glycoprotein inhibitors: a molecular docking study. *Scientifica* 2020;2020. doi.org/10.1155/2020/6307457. eCollection 2020
 30. Priyandoko D, Widowati W, Subangkit M, Jasaputra D, Wargasetia T, Sholihah I, et al. Molecular docking study of the potential relevance of the natural compounds isoflavone and myricetin to COVID-19. *Int J Bioautomation* 2021;25:271. doi.org/10.7546/ijba.2021.25.3.000796
 31. Rehman MT, AlAjmi MF, Hussain A. Natural compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (3CLpro): A molecular docking and simulation approach to combat COVID-19. *Curr Pharm Des* 2021;27:3577-89. doi.org/10.2174/138161282699201116195851
 32. Mouffouk C, Mouffouk S, Mouffouk S, Hambaba L, Haba H. Flavonols as potential antiviral drugs targeting SARS-CoV-2 proteases (3CLpro and PLpro), spike protein, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and angiotensin-converting enzyme II receptor (ACE2). *Eur J Pharmacol* 2021;891:173759. doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173759
 33. Alrasheid AA, Babiker MY, Awad TA. Evaluation of certain medicinal plants compounds as new potential inhibitors of novel corona virus (COVID-19) using molecular docking analysis. *In Silico Pharmacol* 2021;9:1-7. doi.org/10.1007/s40203-020-00073-8
 34. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; 44: 235-49. doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00107-6
 35. Egan WJ, Merz KM, Baldwin JJ. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J Med Chem* 2000;43:3867-77. doi.org/10.1021/jm000292e
 36. Goel RK, Singh D, Lagunin A, Poroikov V. PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. *Med Chem Res* 2011;20:1509-14. doi.org/10.1007/s00044-010-9398-y
 37. Muegge I, Heald SL, Brittelli D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J Med Chem* 2001;44:1841-46. doi.org/10.1021/jm015507e
 38. Arora S, Lohiya G, Moharir K, Shah S, Yende S. Identification of potential flavonoid inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease 6YNQ: a molecular docking study. *Digital Chin Med* 2020;3:239-48. doi.org/10.1016/j.dcm.2020.12.003
 39. Owis AI, El-Hawary MS, El Amir D, Aly OM, Abdelmohsen UR, Kamel MS. Molecular docking reveals the potential of *Salvadora persica* flavonoids to inhibit COVID-19 virus main protease. *RSC Adv* 2020;10:19570-75. doi.org/10.1039/D0RA03582C
 40. Cherrak SA, Merzouk H, Mokhtari-Soulimane N. Potential bioactive glycosylated flavonoids as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: A molecular docking and simulation studies. *PLoS One* 2020;15:e0240653. doi.org/10.1371/journal.pone.0240653
 41. Das S, Sarmah S, Lyndem S, Singha Roy A. An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *J Biomol Struct Dyn* 2021;39:3347-57. doi.org/10.1080/07391102.2020.1763201
 42. Omrani M, Bayati M, Mehrbod P, Bardazard KA, Nejad-Ebrahimi S. Natural products as inhibitors of COVID-19 main protease—A virtual screening by molecular docking. *Pharm Sci* 2021;27(Covid-19):S135-48. doi.org/10.34172/PS.2021.1