

## Investigating the Interaction of Herbal Medicinal Compounds Against Mpro Protease in SARS-CoV-2 Virus Strains

Roya Fallah pour<sup>1</sup>, Seyed Hamid Jamaldini<sup>2</sup>, Najaf Allahyari Fard<sup>3\*</sup>

1. MSc of Science, Islamic Azad University, Medical Branch, Tehran, Iran

2. Assistant professor, Islamic Azad University, Medical Branch, Tehran, Iran

3. Assistant professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

### ARTICLE INFO:

#### Article History:

Received: 11 Jul 2024

Accepted: 19 Nov 2024

Published: 20 Dec 2024

#### \*Corresponding Author:

Najaf Allahyari Fard

#### Email:

allahyar@nigeb.ac.ir

**Citation:** Fallah pour R, Jamaldini SH, Allahyari Fard N. Investigating the Interaction of Herbal Medicinal Compounds Against Mpro Protease in SARS-CoV-2 Virus Strains. Journal of Health and Biomedical Informatics 2024; 11(3): 214-28. [In Persian]

**Introduction:** COVID-19 is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus. The identification of beneficial plant compounds and their use for targeting important proteins involved in the infection and replication of the coronavirus is considered an effective option in the fight against this disease. The aim of this research was to investigate the interaction of native medicinal plant compounds against the Mpro protease of different SARS-CoV-2 strains and to determine and evaluate the final compound using the HPLC method.

**Methods:** The three-dimensional structure of the Mpro protease was obtained from the PDB database. Various antiviral plant compounds were collected from databases and articles. Molecular docking was performed using AutoDock Vina. The features and properties of the selected compounds were examined using different servers. Mutagenesis for the methionine amino acid 49 was performed, and a new three-dimensional structure of the Mpro protein was modeled for different virus strains. Docking analysis for four selected compounds was conducted based on binding energy. Molecular dynamics simulation (MD) was carried out to examine the stability of the final structure, and HPLC was used to evaluate the presence of the effective compound in the desired plant.

**Results:** Docking results showed that the compound Cyanidin-3, 5-di-o-glucoside is effective in inhibiting Mpro, as indicated by its favorable total binding energy. The pharmacokinetic properties of this compound were also determined. MD results indicated that the Mpro-Cyanidin-3, 5-di-o-glucoside complex is stable. HPLC confirmed the presence of Cyanidin-3, 5-di-o-glucoside in Iranian pomegranate extract.

**Conclusion:** The compound Cyanidin-3, 5-di-o-glucoside found in Iranian pomegranate extract can bind to Mpro with high affinity and inhibit its activity, potentially serving as a drug that directly targets the coronavirus.

**Keywords:** Mpro Protein, Coronavirus, Native plants, Molecular docking, Molecular dynamics



CrossMark

مقاله پژوهشی

## بررسی برهمکنش ترکیبات گیاهی دارویی علیه پروتئاز M<sup>Pro</sup> در گونه‌های ویروس SARS-CoV-2

رویا فلاح پور<sup>۱</sup>، سید حمید جمال الدینی<sup>۲</sup>، نجف الهیاری فرد<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی، تهران، ایران

۲. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی، تهران، ایران

۳. استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

### اطلاعات مقاله

#### سابقه مقاله

دریافت: ۱۴۰۳/۴/۲۱

پذیرش: ۱۴۰۳/۸/۲۹

انتشار برخط: ۱۴۰۳/۹/۳۰

#### \*تولیسنده مسئول:

نجف الهیاری فرد

#### ایمیل:

allahyar@nigeb.ac.ir

#### ارجاع:

الهدینی حمید، الهیاری فرد نجف. بررسی برهمکنش ترکیبات گیاهی دارویی علیه پروتئاز M<sup>Pro</sup> در گونه‌های ویروس SARS-CoV-2. مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۴۰۳؛ ۱۱(۳): ۴۸-۳۳۴.

**مقدمه:** بیماری کرونا (COVID-19) یک بیماری عفونی است که توسط ویروس SARS-CoV-2 ایجاد می‌شود. شناسایی ترکیبات گیاهی مفید و به‌کارگیری آن‌ها جهت هدف‌گیری پروتئین‌های مهم دخیل در آلوده‌سازی و تکثیر ویروس کرونا، گزینه‌ای کارآمد در مبارزه علیه این بیماری محسوب می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی برهمکنش ترکیبات گیاهی دارویی بومی علیه پروتئاز M<sup>Pro</sup> گونه‌های مختلف ویروس SARS-CoV2- و تعیین و ارزیابی ترکیب نهایی با روش HPLC بود.

**روش کار:** ساختار سه‌بعدی پروتئاز M<sup>Pro</sup> از بانک داده PDB به دست آمد. ترکیبات مختلف ضدویروسی گیاهی از پایگاه‌های داده و مقالات مختلف گردآوری شد. داکینگ مولکولی با استفاده از AutoDock Vina انجام شد. با استفاده از سرورهای مختلف ویژگی‌ها و خصوصیات ترکیبات منتخب بررسی شد. جهش‌زایی برای آمینواسید متیونین ۴۹ انجام و ساختار جدید سه‌بعدی پروتئین M<sup>Pro</sup> در گونه‌های مختلف ویروس مدل‌سازی شد. آنالیز داکینگ برای چهار ترکیب منتخب به لحاظ انرژی اتصال انجام شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) برای بررسی پایداری ساختار نهایی و HPLC برای ارزیابی حضور ترکیب موثره در گیاه موردنظر انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج داکینگ نشان داد ترکیب Cyanidin-3 5-di-o-glucoside به لحاظ مجموع انرژی اتصال برای مهار M<sup>Pro</sup> مطلوب است. خصوصیات فارماکوکینتیک این ترکیب تعیین شد. نتایج MD نشان داد کمپلکس Cyanidin-3 5-di-o-glucoside دارای ثبات است. با روش HPLC تأیید شد که Cyanidin-3 5-di-o-glucoside در عصاره انار ایرانی موجود است.

**نتیجه‌گیری:** ترکیب Cyanidin-3 5-di-o-glucoside که در عصاره انار بومی ایران یافت می‌شود می‌تواند با میل اتصال بالایی به M<sup>Pro</sup> متصل شده و آن را مهار کند و به‌عنوان دارویی که مستقیماً بر ویروس کرونا تأثیر بگذارد مورد ارزیابی قرار گیرد.

**کلیدواژه‌ها:** M<sup>Pro</sup>، کرونا، گیاهان بومی، داکینگ مولکولی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

## مقدمه

بیماری کرونا یا COVID-19 ناشی از ویروس SARS-CoV-2 است که در سال ۲۰۱۹ ابتدا در شهر Wuhan چین شایع شد. در تاریخ ۳۰ ژانویه ۲۰۲۰ سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization) این بیماری را یک تهدید جهانی اعلام کرد. پس از آن، گزارش‌هایی از افراد آلوده به این ویروس در دیگر نقاط چین و سایر کشورهای جهان مخابره شد. همان‌طور که اخیراً مشخص شده است، به احتمال زیاد منشأ اصلی انتقال COVID-19 به انسان از خفاش‌ها سرچشمه می‌گیرد [۱]. همچنین مطالعه‌ای که توسط Xiao و همکاران انجام شد [۲] نشان داده است که برای انتقال SARS-CoV-2 به انسان، یک میزبان واسطه باید همیشه وجود داشته باشد، زیرا ویروس‌های مشتق شده از خفاش به‌ندرت انسان را آلوده می‌کند. این مطالعه همچنین گزارش داد که پانگولین‌های وحشی چینی و مالایا برای کروناویروس‌های مشابه SARS-CoV-2 مورد آزمایش قرار گرفتند که اکثر آن‌ها مثبت بودند. در ادامه ویروس کرونا از فرد آلوده توسط حضور در اجتماع، آلودگی بیمارستانی و تماس مستقیم از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شود. در نبود درمان ضدویروسی اختصاصی بر علیه COVID-19، درمان‌های موجود بر پایه علامت درمانی و حمایت تنفسی استوار بودند. از ابتدای همه‌گیری، مداخلات دارویی زیادی برای بیماران انجام شده است. این مداخلات دارویی به‌طور اختصاصی برای COVID-19 طراحی نشده بودند بلکه بر اساس تجربه درمان بیماری‌های مشابه به دست آمده‌اند. با به دست آمدن جزئیات بیشتر در مورد بیماری‌زایی COVID-19، ایده کاربرد داروهای هدفمند بر علیه پروتئین‌ها و آنزیم‌های اختصاصی COVID-19 مانند پروتئاز اصلی M<sup>pro</sup> مطرح گردید. پروتئاز اصلی کروناویروس M<sup>pro</sup> مانند پروتئازهای گیاهی پاپاین (Papain-like proteinase)، برای پردازش پلی پروتئین‌هایی که از COVID-19 ویروسی ترجمه می‌شوند ضروری است؛ بنابراین کشف یا طراحی ترکیبات دارویی منحصر به فرد می‌تواند سبب مهار فعالیت این آنزیم و در نهایت مانع از تکثیر ویروس شود.

کشف دارو به معنای شناسایی ترکیبات شیمیایی بالقوه جهت تبدیل آن‌ها به عوامل درمانی مؤثر علیه بیماری‌ها است. به‌طور کلی در این رویکرد عوامل درمانی یا از طریق طراحی و سنتز مستقیم آن به دست می‌آیند یا با استفاده از غربالگری ترکیبات مختلف جهت شناسایی بهترین کاندید انتخاب می‌شوند [۳]. همچنین در روشی نوآورانه محققین تلاش می‌کنند تا برای ترکیبات دارویی مرسوم اهداف جدید سلولی در بیماری‌ها مشخص کنند و به‌گونه‌ای کارکرد آن‌ها را بازتعریف نمایند [۴]. رشته‌های علمی مختلفی از جمله زیست‌شناسی، شیمی و داروسازی در تحقق این هدف مهم عمل می‌کنند [۵]؛ اما باید توجه کرد داروهای عرضه‌شده در بازار در این مقطع زمانی تعداد نسبتاً کمی از انواع اهداف دارویی را در بر می‌گیرند [۶]. برای مثال داروهایی که علیه گیرنده‌های جفت شده با پروتئین G، گیرنده‌های هسته‌ای (هورمونی) و کانال‌های یونی عرضه شده‌اند، اندکی کمتر از ۵۰ درصد را تشکیل می‌دهند. شاید بتوان علت اصلی این امر را در دلایلی در ادامه ذکر می‌شود جستجو کرد. فرآیند کشف دارو پرهزینه است و به‌طور متوسط بیش از یک دهه از کشف تا تأیید آن طول می‌کشد [۷]. همچنین به سرمایه‌گذاری قابل توجه، منابع انسانی ماهر، مهارت‌های تحقیقاتی و فن‌آوری‌های پیشرفته نیاز دارد [۷].

امروزه به‌منظور کاهش هزینه و زمان در تولید داروی اختصاصی علیه COVID-19، توجه زیادی به پیش مطالعات در طراحی دارو با روش‌های بیوانفورماتیکی معطوف شده است. در این روش، به‌کارگیری ابزارهای بیوانفورماتیکی و روش‌های محاسباتی که با ضریب اطمینان بالا اثربخشی ترکیبات دارویی و نیز سمیت احتمالی آن‌ها را پیش‌بینی می‌کنند طی سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند [۸]. داکینگ مولکولی، شبیه‌سازی، تعیین نقطه هدف و بررسی‌های پایداری شیمیایی، از مهم‌ترین روش‌های بیوانفورماتیکی استفاده‌شده در طراحی دارو هستند. در این میان، داکینگ مولکولی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است [۹]. در این تکنیک می‌توان با در نظر گرفتن حالت‌های مختلف مولکول‌های موردنظر در فضای سه‌بعدی و پیش‌بینی چگونگی تعامل پروتئین گیرنده با ترکیبات فعال زیستی (لیگاند)، نحوه میان‌کنش آن‌ها را بررسی کرد و عوامل مؤثر در برهم‌کنش پایدارتر و مهم از لحاظ شناخت دارو را تعیین نمود [۱۰]. بدین ترتیب پژوهش حاضر با هدف بررسی برهم‌کنش ترکیبات گیاهی دارویی بومی علیه پروتئاز M<sup>pro</sup> ویروس SARS-CoV-2 و تعیین آن با روش HPLC انجام گرفت.

## روش کار

بررسی و تعیین ساختار سه‌بعدی پروتئین M<sup>PRO</sup> و لیگاندها

در پژوهش حاضر ابتدا ساختار دقیق و علمی پروتئین M<sup>PRO</sup> که توسط محققین در مقالات معتبر انتشار یافته یا استفاده شده به دست آمدند. کد PDB مربوط به ساختار پروتئینی M<sup>PRO</sup> در این مقالات برای مرحله بعدی جستجو گردید که عبارت‌اند از: 6LU7 [۲۴-۱۱]، 6Y2F [۲۸،۲۹]، 5R83 [۳۰]، 5R82 [۳۱]، 6Y7M [۳۲]، 6W63 [۲۷]، 6LZE [۲۶]، 6Y2F [۲۸،۲۹]، 6W63 [۲۷]، 6Y2F [۲۸،۲۹]، 5R83 [۳۰]، 5R82 [۳۱]، 6Y7M [۳۲]، سپس کدهای PDB به‌دست‌آمده از پایگاه داده Protein Data Bank (PDB) وارد شد و آن‌ها از نظر یکسان بودن توالی مورد ارزیابی قرار گرفتند. آمینواسیدهای مهم در جایگاه اتصالی این آنزیم نیز از مقالات استخراج گردید. سپس به‌منظور ارزیابی لیگاندهای مؤثر برای مهار پروتئین M<sup>PRO</sup> از ترکیبات متنوع ضدویروسی، به‌ویژه ترکیبات گیاهی بومی ایران استفاده شد. بدین منظور با بررسی جامع و گسترده مقالات معتبر انواع ترکیبات ضدویروسی، به‌ویژه ترکیبات گیاهی بومی به همراه کد دسترسی PubChem استخراج گردید. سپس برای جستجوی ساختار سه‌بعدی ترکیبات یادشده از PubChem استفاده گردید. ترکیبات با فرمت Structured Data File (SDF) ذخیره شد. همچنین به‌منظور بررسی سایر گونه‌های این ویروس جهش‌زایی برای آمینواسید متیونین ۴۹ انجام و سپس با استفاده از SWISS-MODEL جهش‌های موردنظر ساختار جدید سه‌بعدی پروتئین M<sup>PRO</sup> در گونه‌های مختلف ویروس مدل‌سازی شد.

بانک اطلاعات پروتئین (PDB) اولین منبع دیجیتال با دسترسی آزاد در زیست‌شناسی برای به اشتراک‌گذاری ساختارهای پروتئینی سه‌بعدی است. PDB در سال ۱۹۷۱ با ۷ ساختار تأسیس شد و به‌طور تصاعدی رشد کرده است تا دسترسی به بیش از ۱۱۳۰۰۰ ماکرومولکول طبیعی و طراحی‌شده (پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و کربوهیدرات‌ها) را فراهم کند که بیش از ۸۴۰۰۰ مورد از آن‌ها با اجزای شیمیایی کوچک ترکیب شده‌اند. (مولکول‌های حلال، یون‌ها، کوفاکتورها، بازدارنده‌ها و داروها).

PubChem یک پایگاه داده از مولکول‌های شیمیایی و فعالیت‌های آن‌ها در برابر سنجش‌های بیولوژیکی است. این سیستم توسط مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)، بخشی از کتابخانه ملی پزشکی، که بخشی از مؤسسه ملی بهداشت ایالات متحده (NIH) است، نگهداری می‌شود. PubChem به‌صورت رایگان و اینترنتی در اختیار علاقه‌مندان و محققان قرار گرفته است. داده‌های توصیفی را می‌توان آزادانه از طریق File Transfer Protocol (FTP) بارگیری کرد. PubChem حاوی توضیحات چند ماده و مولکول‌های کوچک با کمتر از ۱۰۰ اتم و ۱۰۰۰ پیوند است. بیش از ۸۰ پایگاه داده دیگر به پایگاه داده در حال رشد PubChem برای به‌روزرسانی‌ها کمک می‌کنند.

## داکینگ و برهمکنش پروتئین و لیگاند

داکینگ برای به کمک ابزار Auto Dock Vina مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا فایل‌های PDB و SDF مربوط به پروتئین‌ها (پروتئین اصلی و جهش‌یافته‌ها) و لیگاند مربوطه که از مراحل قبلی به دست آورده شد آماده‌سازی گردید. ساختاری که در این مطالعه استفاده شد یک ساختار کریستالی است که با لیگاند(ها) کمپلکس شده است. بنابراین، برای اتصال لیگاند موردنظر با پروتئین در آن موقعیت خاص، باید لیگاند متصل شده قبلی حذف شود. اگر لیگاند خود، بدون حذف لیگاند قبلی متصل شود، نتیجه درستی نخواهیم گرفت. بدین ترتیب بهینه‌سازی پروتئین گیرنده و لیگاندها انجام خواهد گرفت. با استفاده از UCSF Chimera، ساختار گیرنده 6LU7 برای اتصال آماده می‌شود. این مورد شامل حذف مولکول‌های لیگاند قبلی، حذف حلال، حذف مکان‌های جایگزین باقیمانده‌ها، حذف تغییرات شیمیایی مانند تبدیل سلنومتیونین‌ها به متیونین‌ها، افزودن اتم‌های هیدروژن و اختصاص بار به اتم‌های پروتئین است. با استفاده از AutoDock Vina عمل داکینگ را برای پروتئین 6LU7 پروب و آماده‌سازی شده به همراه ۳۵۰۰ لیگاند ترکیبات گیاهی مشخص شده انجام شد. ابتدا رسپتور پروب شده و لیگاند به محیط کاری نرم‌افزار فراخوانی شد. در ادامه محل Active site آنزیم M<sup>PRO</sup> بر روی ساختار پروتئینی مشخص شد. برای این کار باقی‌مانده‌های آمینواسیدی موجود در جایگاه فعال آنزیم که از قبل پیدا شده بود بر روی توالی رشته پلی‌پپتیدی مشخص گردید. پس از انجام داکینگ لیگاندها با رسپتور، امتیازات مربوطه ثبت گردید. کمترین عدد امتیازی بر حسب Kcal/mol به معنای بهترین حالت انتخاب شده و ثبت شد. برای مابقی لیگاندها نیز دقیقاً به همین نحو عمل گردید. در ادامه ترکیباتی که در داکینگ با پروتئین M<sup>PRO</sup> امتیازات منفی ۸ و منفی ۹ را کسب کرده بودند به‌صورت جداگانه بررسی شد.

### بررسی خصوصیات فارماکوکینتیک لیگاندهای برگزیده

با استفاده از سرورهای way2drug، lazarus toxicity predictions، SwissADME و ADMETlab ویژگی‌ها و خصوصیات این ترکیبات منتخب شامل جذب، خروج، متابولیسم و سمیت بررسی شد. شناسایی و تعیین کمیت ترکیب منتخب نهایی -5-cyanidin-3 di-o-glucoside از عصاره انار با استفاده از روش High-performance liquid chromatography (HPLC) تعیین شد. قبل از تجزیه و تحلیل HPLC تمام آبمیوه انار سانتریفیوژ و با فیلترهای پلی آمید ۲۰ میکرومتر در ویال‌ها فیلتر شدند. ستون HPLC (-C) 18، طول ۲۵۰ × ۴.۶ میلی‌متر (ID) با اندازه منافذ ۵ میکرومتر برای بررسی در طول موج ۲۶۰ نانومتر UV توسط آشکارساز UV-PDA استفاده شد. سرعت ستون برای کشش و خروج کمی به ترتیب ۲۰۰ و ۴۰۰ μL/min با سرعت جریان ثابت (۰/۸) تنظیم شد. محتوای مؤلفه‌ها و پیک‌های مربوطه از نواحی اوج ارزیابی و با استفاده از استاندارد خارجی cyanidin-3 5-di-o-glucoside مربوطه اندازه‌گیری شد. همچنین به منظور پیشبرد پژوهش حاضر ابزارهای زیر مورد استفاده قرار گرفتند:

#### UCSF Chimera

طراحی، پیاده‌سازی و قابلیت‌های یک سیستم تجسم توسعه‌پذیر برای ماکرومولکول‌های زیستی در UCSF Chimera فراهم شده است. در واقع UCSF Chimera یک برنامه قابل توسعه برای تجسم و تجزیه و تحلیل تعاملی ساختارهای مولکولی و داده‌های مرتبط، از جمله نقشه‌های چگالی، مجموعه‌های فوق مولکولی، ترازهای توالی، نتایج اتصال، مسیرها، و مجموعه‌های ساختاری است. در این پژوهش بررسی ساختارهای پروتئین و لیگاندها و آماده‌سازی برای داکینگ به وسیله این نرم‌افزار انجام شد.

#### AutoDock Vina

AutoDock Vina یک ابزار متن باز داکینگ مولکولی است و در مجموعه AutoDock، همراه با AutoDock4 (AD4)، AutoDockGPU، AutoDockFR و AutoDock-CrankPep قرار می‌گیرد [۳۳]. این ابزار یکی از پرکاربردترین و موفق‌ترین برنامه‌های ارائه شده برای داکینگ است. دلایل این موفقیت بیشتر به دلیل سهولت استفاده و سرعت آن (تا ۱۰۰ برابر سریع‌تر از نوع AD4) در مقایسه با سایر ابزارهای داکینگ و همچنین منبع باز بودن آن است. کد دسترس‌پذیر در منبع در آدرس <https://github.com/ccsb-scripps/AutoDock-Vina> موجود است. گروه‌های تحقیقاتی در سرتاسر جهان کد نویسی Vina را تغییر داده و بر اساس آن، الگوریتم جستجو (QuickVina2) را بهبود بخشیده‌اند، رابط کاربری را کاربر پسندتر کرده و اجازه می‌دهند تا اصطلاحات امتیازدهی را از طریق رابط کاربری (Smina) اصلاح کنند، و عملکرد امتیازدهی کربوهیدرات (Vina-Carb)، اتصال پیوندهای هالوژن (VinaXB) و عملکرد امتیازدهی بهبود یافته (Vinardo) را اصلاح کنند. این ابزار به دلیل سرعت بالا و سهولت استفاده، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران برای انجام محاسبات داکینگ، پیش‌بینی تمایل اتصال و مطالعه برهم‌کنش پروتئین - لیگاند قرار گرفته است. در این پژوهش، AutoDock Vina برای تعیین بهترین اتصال، موقعیت و وضعیت پروتئین M<sup>pro</sup> در برهم‌کنش با لیگاندها به کار رفته است. پیش‌فرض‌های نرم‌افزار شامل پارامترهای جستجو و امتیازدهی است که می‌تواند بسته به نوع داکینگ (مثلاً برای پروتئین‌ها یا کربوهیدرات‌ها) تنظیم شوند. در این پژوهش از تنظیمات پیش‌فرض برای الگوریتم‌های مختلف چون QuickVina2 و Smina برای بهبود دقت نتایج استفاده شد.

#### GROMACS

GROMACS مخفف Groningen Machine for Chemical Simulation است. این برنامه در واقع یک بسته نرم‌افزاری قدرتمند می‌باشد که توسط همکاری مشترک گروه شیمی و گروه کامپیوتر در دانشگاه گرونینگن، هلند در اوایل دهه ۱۹۹۰ ایجاد گردید [۳۴]. هدف آن نیز طراحی یک سیستم کامپیوتری اختصاصی برای شبیه‌سازی مولکولی ساختارهای زیستی بود. GROMACS یک بسته دینامیک مولکولی است که عمدتاً برای شبیه‌سازی پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک طراحی شده است. GROMACS یکی از سریع‌ترین و محبوب‌ترین بسته‌های نرم‌افزاری موجود است و می‌تواند روی واحدهای پردازش مرکزی (Central Processing Unit) و واحدهای پردازش گرافیکی (Graphics Processing Unit) اجرا شود. این نرم‌افزار رایگان و منبع باز است که تحت مجوز عمومی GPL منتشر شده است.

در این پژوهش ارزیابی پایداری ساختار به وسیله نرم‌افزار GROMACS 2021 برای مدت ۵۰ نانوثانیه (ns) انجام شد و در این مدت، سیستم به وضعیت پایداری رسید. در این فرآیند، انحراف مربع میانگین ریشه (RMSD (Root Mean Square Deviation) و نوسان

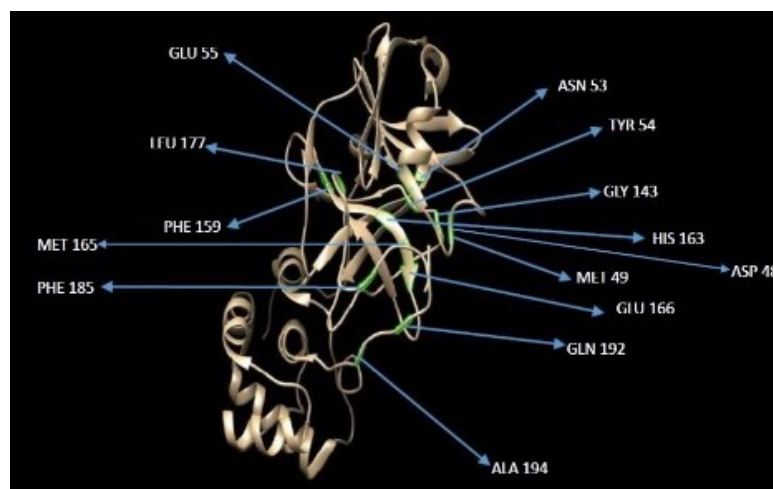
ریشه میانگین مربع یا RMSF (Root Mean Square Fluctuation) محاسبه گردیدند. RMSD به عنوان یک معیار استاندارد برای سنجش فاصله ساختاری بین مختصات استفاده می شود. RMSD اندازه‌های از تغییرات ساختاری سیستم در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) ارائه می‌کند و RMSF نشان‌دهنده نوسان باقیمانده‌های آمینواسیدی پروتئین در طول زمان از یک موقعیت مرجع در طول شبیه‌سازی است. این دو پارامتر نمای کلی از پایداری و تطابق ساختاری پروتئین در طول زمان را ترسیم می‌کند.

### Discovery studio

Discovery Studio یک رابط گرافیکی یکپارچه و با استفاده آسان برای طراحی قدرتمند ماکرومولکولی دارو و تحقیقات مدل‌سازی پروتئین است. Discovery Studio شامل ابزارهای استاندارد (مانند Catalyst، MODELER، CHARMM، و غیره) با سال‌ها نتایج اثبات‌شده منتشر شده، و همچنین علمی پیشرفته برای رسیدگی به چالش‌های کشف دارو است. Discovery Studio یک مجموعه نرم‌افزاری جامع برای تحلیل و مدل‌سازی ساختارهای مولکولی، توالی‌ها و سایر داده‌های مرتبط با محققان علوم زیستی است. این محصول دارای عملکردی برای مشاهده و ویرایش داده‌ها به همراه ابزارهایی برای انجام تجزیه و تحلیل اولیه داده‌ها است. Discovery Studio Visualizer یک ابزار نمایشگر رایگان است که می‌تواند برای باز کردن داده‌های تولیدشده توسط نرم‌افزارهای دیگر در خط تولید Discovery Studio استفاده شود. برای ارائه یک محیط تعاملی برای مشاهده و ویرایش ساختارهای مولکولی، توالی‌ها، داده‌های بازتاب اشعه ایکس، اسکرپت‌ها و سایر داده‌ها طراحی شده است. همچنین مجموعه‌ای غنی از ابزارها را برای نمایش نمودارها و دیگر نمایش‌های گرافیکی داده‌ها فراهم می‌کند. در این پژوهش از این نرم‌افزار برای نمایش ساختار سه‌بعدی و برهمکنش‌های بین پروتئین و لیگاندها استفاده شد.

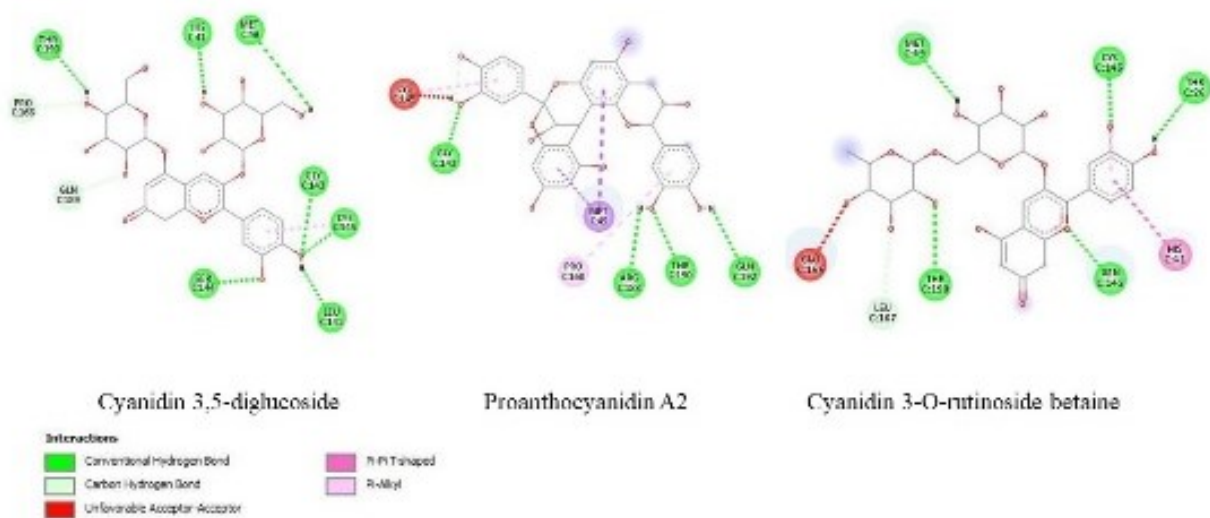
### نتایج

با بررسی‌های به عمل آمده برای به دست آوردن بهترین ساختار کریستالوگرافی شده برای پروتئین  $M^{Pro}$  مشخص شد که از بین ساختارهای موجود در پایگاه داده PDB، 6LU7 با داشتن رزولوشن ۲.۱۶ آنگستروم بهترین ساختار است. همچنین این ساختار دارای توالی کامل با همه زیر واحدها بود که انتخاب را بهتر می‌کرد. همچنین 6LU7 به لحاظ شاخص‌ها و امتیازدهی‌های کریستالوگرافی نیز بسیار مطلوب و حائز اهمیت بود. به منظور تعیین باقی‌مانده‌های اسیدآمینهای مهم در جایگاه فعال آنزیم از مقالات معتبر استفاده شد. این باقی‌مانده‌های مهم اسیدآمین در شکل ۱ به طور کاملاً مشخص در فرم 3D آنزیم  $M^{Pro}$  نشان داده شده‌اند.



شکل ۱: باقی‌مانده‌های اسیدآمینهای مهم در جایگاه فعال آنزیم  $M^{Pro}$

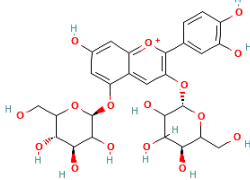
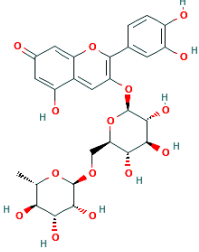
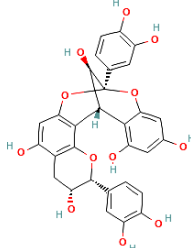
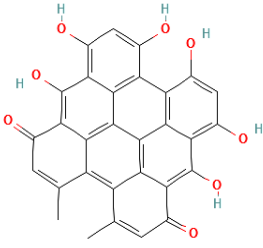
این پژوهش به بررسی اثر مهار ۳۵۰۰ ترکیب گیاهی بومی ایران مختلف بر مهار عملکرد پروتئازی M<sup>PRO</sup> با استفاده از مطالعه داکینگ پرداخت. بعد از انجام داکینگ مولکولی برای لیگاند-رسپتور، نتایج بر اساس میزان انرژی اتصال بهینه غربالگری شد و ترکیبات دارای انرژی اتصال -۹ و -۸ (Kcal/mol) به عنوان کاندیدهای مهم مهار M<sup>PRO</sup> مشخص شده‌اند. هرچقدر انرژی اتصال یک لیگاند منفی‌تر باشد، آن لیگاند توانایی بالایی برای اتصال به باقی‌مانده‌های آمینواسیدی جایگاه فعال آنزیم را دارد. ترکیب‌های به‌دست‌آمده برای بررسی بیشتر نحوه برهمکنش‌های آن‌ها با جایگاه فعال آنزیم M<sup>PRO</sup> انتخاب شدند. مطابق نتایج، این ترکیبات توانایی اتصال و پیوند هیدروژنی با باقی‌مانده‌های آمینواسیدی جایگاه کاتالیزی را دارند. مهار باقی‌مانده‌های آمینواسیدی His 41 و Cyc145، به‌عنوان جایگاه کاتالیزی آنزیم، نقش بسیار مهمی در عملکرد ترکیبات مهار می‌کند (شکل ۲).



شکل ۲: بررسی نحوه ارتباط و تعاملات ترکیبات ذکر شده که به ترتیب از راست به چپ مرتبط شده‌اند با جایگاه فعال آنزیم M<sup>PRO</sup>

در این پژوهش بررسی پایداری متابولیسی ترکیبات بررسی شده موجود، توسط سایت PredMS انجام گرفت و نتایج حاکی از آن بود که از میان ترکیبات ارزیابی شده به‌جز Spiro و GROSSAMIDE بقیه از پایداری متابولیسی مطلوبی برخوردار هستند (حد آستانه برای پایداری یک ترکیب ۰/۵ است). بررسی ترکیبات منتخب به لحاظ خصوصیات فیزیکوشیمیایی، حلالیت، فارماکوکینتیک، داروهمانندی و بیوشیمی توسط پایگاه داده SwissADME انجام پذیرفت و نتایج مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج داکینگ اولیه نشان داد ترکیب cyanidin-3 5-di-o-glucoside منشأ گیاه انار و بومی ایران بیشترین امتیاز را دارا است (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج داکینگ پروتئین  $M^{Pro}$  و چهار ترکیب برگزیده نهایی

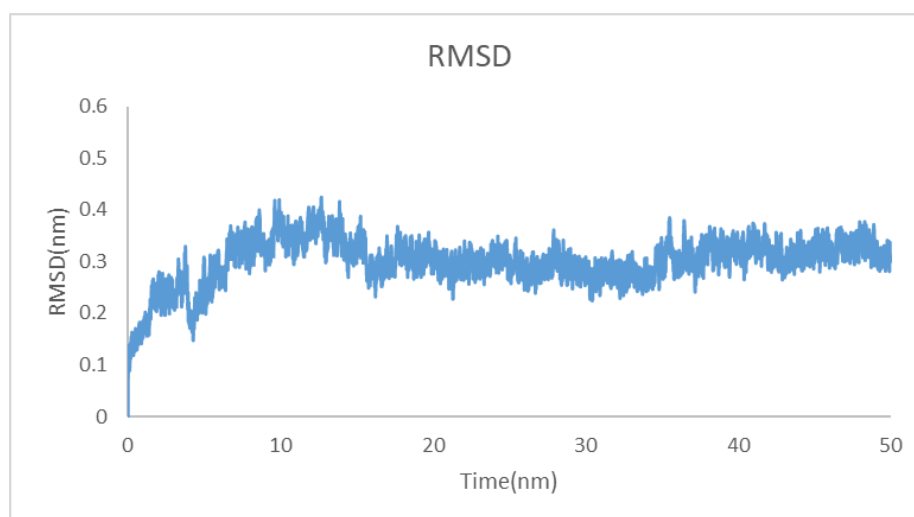
Compound name	Medicinal herb	Score (Kcal/mol)	2d pic
44256718 Cyanidin 3,5- diglucoside	<i>Punica granatum</i>	-۹/۴	
۲۹۲۳۲ cyanidin 3-O- rutinoside betaine	<i>Mahonia aquifolium</i>	-۹/۴	
۱۲۴۰۲۵ Proanthocyanidin A2	<i>Tilia cordata</i>	-۹/۳	
۲۶۶۳ hypericin	<i>Hypericum perforatum</i>	-۹/۳	

بررسی‌های انجام گرفته بین اطلاعات منتشرشده در مقالات و منابع نشان داد که حدوداً ۴۰ جهش جایگزینی در قسمت‌های مختلف آنزیم  $M^{Pro}$  رخ می‌دهد که لزوماً همه آن‌ها به لحاظ اهمیت یکسان نیستند. متناسب با دیدگاه ما در این پژوهش، جهش در جایگاه ۴۹ آنزیم که کدکننده متیونین است در بین اسیدآمینوهای مهم جایگاه فعال و کاتالیتیکی آن قرار دارد. این جهش به لحاظ فراوانی و جایگاهش برای ما اهمیت دارد. متیونین در این جایگاه به لوسین (L)، والین (V) و لیزین (K) جهش پیدا می‌کند. همان‌طور که توضیح داده شد جهش‌زایی به‌صورت *In silico* انجام پذیرفت و بعد از مدل‌سازی ساختار جدید  $M^{Pro}$ ، عمل داکینگ برای ۴ لیگاندی که حائز بهترین امتیاز انرژی اتصال بودند، انجام شد. نتایج داکینگ برای این حالت در جدول ۲ آورده شده است. همچنین ترکیب Hypericin بهترین امتیاز را برای انرژی اتصال در هر سه حالت جهش مربوط به گونه‌های مختلف ویروس SARS-CoV-2 از خود نشان داد.

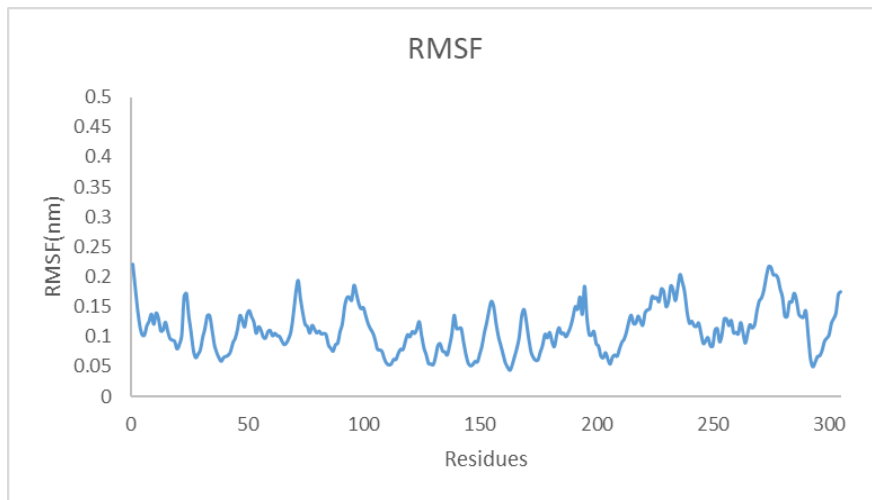
جدول ۲: نتایج مربوط به داکینگ پروتئین (Kcal/mol) جهش یافته M<sup>pro</sup> با چهار ترکیب منتخب

Compound CID	NORMAL	MUTANT DOCK		MUTANT DOCK	
		M49L	M49V	M49K	M49K
۱	۴۴۲۵۶۷۱۸	-۹	-۸/۶	-۸/۶	-۸/۶
۲	۲۹۲۳۲	-۹/۴	-۸/۹	-۸/۹	-۸/۳
۳	۱۲۴۰۲۵	-۹/۳	-۸/۳	-۸/۳	-۸/۳
۴	۳۶۶۳	-۹/۳	-۹/۳	-۹/۴	-۹/۴

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) جهت بررسی ساختار حاصل از داکینگ cyanidin-3 5-di-o-glucoside و M<sup>pro</sup> استفاده شد. ارزیابی ساختار با استفاده از نرم‌افزار GROMACS 2021 برای مدت ۵۰ns انجام شد، سپس سیستم به پایداری رسید. انحراف مربع میانگین ریشه (RMSD) که یک معیار استاندارد برای فاصله ساختاری بین مختصات است، محاسبه گردید. در واقع RMSD تفاوت میان مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل یا برآوردگر آماری و مقدار واقعی را نشان می‌دهد. نمودار موجود در شکل ۳ نشان می‌دهد که ترکیب پروتئین در طول شبیه‌سازی MD چقدر تغییر کرده است.

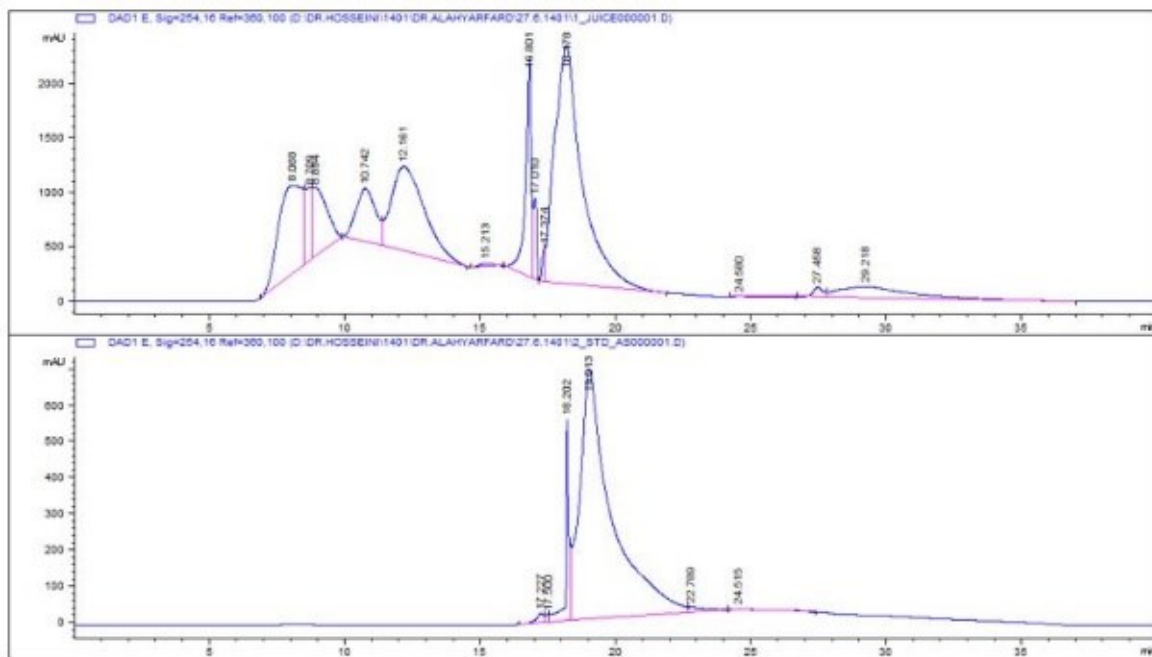

 شکل ۳: نمودار RMSD برای کمپلکس M<sup>pro</sup> و cyanidin-3 5-di-o-glucoside

شاخص دیگر برای ارزیابی ساختار کمپلکس cyanidin-3 5-di-o-glucoside و M<sup>pro</sup>، RMSF بود. نوسان ریشه میانگین مربع یا RMSF نشان‌دهنده نوسان باقیمانده‌های آمینواسیدی پروتئین در طول زمان از یک موقعیت مرجع در طول شبیه‌سازی است. همان‌طور که در نمودار RMSF در شکل ۴ نشان داده شده است، در شبیه‌سازی‌های فعلی هیچ نوسان غیرعادی در سیستم مشاهده نشد.



شکل ۴: نمودار RMSF برای کمپلکس  $M^{pro}$  و cyanidin-3 5-di-o-glucoside

نتایج بررسی عصاره انار با HPLC نشان داد که ترکیب cyanidin-3 5-di-o-glucoside در آب انار یافت می‌شود. این نتیجه به دنبال بررسی و مقایسه نمودار HPLC آب انار با نمونه استاندارد cyanidin-3 5-di-o-glucoside به دست آمد (شکل ۵).



شکل ۵: نمودار HPLC مقایسه‌ای بین عصاره آب انار و Cyanidin-3 5-di-o-glucoside

### بحث و نتیجه گیری

ژنوم SARS-CoV-2 شامل حدود ۳۰۰۰۰ نوکلئوتید است: ژن replicase ویروس SARS-CoV-2 دو پلی پروتئین همپوشانی (pp1a و pp1ab) را رمزگذاری می کند که برای تکثیر ویروس و رونویسی لازم هستند [۳۵]. پلی پپتیدهای کاربردی با پردازش پروتئولیتیک گسترده، عمدتاً توسط پروتئازی به نام M<sup>PRO</sup> (همچنین به عنوان پروتئاز شبه C<sup>3</sup> شناخته می شود) از پلی پروتئین ها آزاد می شوند. M<sup>PRO</sup> پلی پروتئین را در حداقل ۱۱ مکان حفاظت شده هضم می کند، که با برش اتولیتیک خود این آنزیم از pp1a و pp1ab شروع می شود [۳۶]. اهمیت عملکردی M<sup>PRO</sup> در چرخه زندگی ویروسی، همراه با عدم وجود همولوگ های نزدیک مرتبط در انسان، M<sup>PRO</sup> را به عنوان یک هدف جذاب برای طراحی داروهای ضدویروسی شناسایی می کند. تا به امروز مهارکننده های مختلفی بر علیه M<sup>PRO</sup> معرفی شده اند [۳۷، ۳۸]؛ ولی اکثراً به دقت تعاملات مهارکننده با پروتئین M<sup>PRO</sup> مورد بررسی قرار نگرفته است.

در این پژوهش از روش غربالگری مجازی ترکیبات مختلف استفاده شد. ۳۵۰۰ ترکیب مختلف گیاهی که خواص ضدویروسی آنها مشخص شده است از مقالات معتبر به دست آمد و سپس امتیازدهی آنها بر اساس ارزیابی داکینگ مولکولی و انرژی اتصال انجام شد و نتایج گزارش گردید. بررسی ها حاکی از آن بود که این ترکیب شیمیایی با آمینواسیدهای مهم در جایگاه اتصال M<sup>PRO</sup> برهمکنش داشته و پیوندهای هیدروژنی برقرار می کند. برقراری پیوند هیدروژنی با باقی مانده های مهم آمینواسیدی در کنار اشغال فضایی که ترکیب موردنظر ایجاد می کند، سبب می شود که جایگاه فعال آنزیم کارکرد مناسب نداشته باشد. پیوند هیدروژنی بین مولکولی از یک اتم دهنده (D) و یک اتم هیدروژن (H) در یک مولکول و یک اتم پذیرنده (A) در مولکول دیگر تشکیل شده است. اتم دهنده باید به یک اتم هیدروژن پیوند داشته باشد، درحالی که اتم گیرنده لزوماً به اتم هیدروژن پیوند ندارد. فرض می شود که فقط اتم های دهنده و گیرنده تعریف شده روی لیگاند و آن هایی که متعلق به اتم های قابل دسترسی با حلال پروتئین هستند، قادر به برهم کنش بین مولکولی هستند. به صورت کلی در فرآیند یافتن کمپلکس های بهینه لیگاند- پروتئین، کمپلکس هایی انتخاب شد که پیوندهای هیدروژنی بیشتر و قوی تری دارند. این مورد به دو دلیل است که در ادامه ذکر می شود. اولاً، اگر پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی بیشتری وجود داشته باشد، تأثیر آنها بر تشکیل کمپلکس قوی تر خواهد بود و نتیجه اتصال دقیق تر خواهد بود. دوم، محدودیت های هندسی دقیق تحمیل شده توسط تعداد زیادی پیوند هیدروژنی، حضور لیگاند را مؤثرتر می سازد [۳۹].

باقی مانده های کاتالیزوری Cys145 و His41 در M<sup>PRO</sup> که نقش مهمی در عملکرد این آنزیم کموتریپسینی دارد توسط ایجاد پیوند هیدروژنی با ترکیب cyanidin-3 5-di-o-glucoside غیر عملکردی می شوند. البته سایر باقیمانده هایی که به طور بالقوه با جایگاه فعال آنزیم M<sup>PRO</sup> در تعامل هستند (یعنی Thr24، Thr25، Cys44، Met49، Tyr54، Phe140، Asn142، Gly143، Cys145، His163، His164، Arg188، Gln189 و Thr190) در SARS-CoV-2 حفاظت شده هستند و مهم می باشند. مشخص شد ترکیبات دیگری مانند cyanidin 3-O-rutinoside betaine توانایی ایجاد پیوند هیدروژنی را با Cys145 دارد؛ اما با His41 پیوند هیدروژنی تشکیل نمی دهد و به سبب داشتن گروه عاملی بزرگ در نزدیکی این جایگاه، اشغال فضایی اطراف آن ایجاد می کند. در ترکیب Procyanidyn A2 اشغال فضایی جایگاه فعال آنزیم M<sup>PRO</sup> نیز رخ می دهد، اما برقراری پیوند هیدروژنی با His41 وجود ندارد. با این توصیفات بهترین ترکیب که هم انرژی اتصال مطلوب دارد و هم با باقی مانده های کاتالیزیکی مهم آنزیمی پیوند هیدروژنی تشکیل می دهد، cyanidin-3 5-di-o-glucoside است.

پایداری متابولیکی به حساسیت ترکیبات به تبدیلات زیستی در طراحی داروهای با خواص فارماکوکینتیک مطلوب اشاره دارد. نتایج پایداری متابولیکی معمولاً به عنوان معیارهای پاک سازی ذاتی گزارش می شوند، که از آن پارامترهای فارماکوکینتیک ثانویه مانند فراهمی زیستی و نیمه عمر را می توان زمانی که سایر داده ها در مورد حجم توزیع و کسر جذب شده در دسترس باشد، محاسبه کرد [۴۰]. همچنین سمیت حد مجاز یا پایین تر از آن نیز در حیوانات و انسان داشته باشد و سبب واکنش های ناخواسته در بدن و حساسیت نشود. نتایج بررسی های این مطالعه در مورد خصوصیات مانند پایداری و سمیت گزارش شد. تقریباً تمامی ترکیبات پایداری متابولیکی مطلوب و سمیت پایینی داشتند. همچنین از دیگر سو، نقش چربی دوستی در کشف و طراحی دارو بسیار حیاتی است. چربی دوستی یک ویژگی کلیدی فیزیوشیمیایی است که نقش مهمی در تعیین خواصی مانند جذب، توزیع، متابولیسم، دفع و سمیت داروها دارد. شواهد فزاینده ای وجود دارد که نشان می دهد کنترل خواص فیزیوشیمیایی مانند چربی دوستی، در محدوده بهینه تعریف شده، می تواند کیفیت ترکیب و احتمال موفقیت درمانی را بهبود



بخشد [۴۱]. جذب در داروهای چربی دوست سریع تر است، درحالی که سهولت دفع کلیوی در داروهای آب دوست بیشتر است [۴۲]. ترکیبات بررسی شده از این امر بسیار متنوع هستند و از ترکیب cyanidin-3 5-di-o-glucoside که در آب بسیار حلال پذیر است تا Hypericin که خاصیت چربی دوستی بالایی دارد گسترده شده است.

مقوله فارماکوکینتیک ترکیبات نیز در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. شایان ذکر است که فارماکوکینتیک به مطالعه نحوه تعامل بدن با مواد تجویز شده یا دارویی در کل مدت در معرض بودن، دلالت دارد. همچنین مسیرهای جذب دارو یا ترکیب دارویی مورد مطالعه را مورد توجه قرار می دهد. ترکیبات یادشده به جزء N-(2-aminopropyl)piperazine-1-sulfonamide دارای جذب گوارشی پایینی است. همچنین هیچ کدام از ترکیبات به جزء Neeriocitrin توانایی عبور از سد خونی مغزی را ندارند. سایر خصوصیات فارماکوکینتیکی ترکیبات مانند اثرگذاری بر سیتوکروم P450 مورد بررسی قرار گرفتند. فاکتور مهم دیگری که در ارزیابی ترکیبات لحاظ شد، دارو همانندی بود. شباهت دارویی از بازرسی های ساختاری یا فیزیکی شیمیایی ترکیبات به دست می آید. بنابراین، فراهمی زیستی در یک محدوده پیوسته از ۰ تا ۱ اندازه گیری می شود، اما می توان آن را به صورت درصد نشان داد. فراهمی زیستی ترکیبات N-(2-aminopropyl)piperazine-1-sulfonamide و Hyoscyamide نزدیک به هم به اندازه ۰/۵۵ بیشتر از دیگر ترکیبات گزارش گردید.

با توجه به نتایج بررسی ها، cyanidin-3 5-di-o-glucoside که دارای امتیاز مطلوب به لحاظ انرژی اتصال و ایجاد پیوند هیدروژنی با باقی مانده های کاتالیک آنزیم است، همچنین سایر خصوصیات ساختاری و متابولیکی خوب برای بررسی و شبیه سازی دینامیک مولکولی انتخاب گردید. شاخص RMSD که نشان دهنده میانگین انحراف بین اتم های متناظر در مدل پیش بینی شده و مدل واقعی است، هر چه قدر کوچک تر باشد بیانگر نزدیکی مدل پیش بینی شده و واقعی است. شاخص دیگر RMSF بود که برای اندازه گیری جابه جایی یک اتم خاص، یا گروهی از اتم ها، نسبت به ساختار مرجع مورد استناد قرار می گیرد. در این تحقیق نتیجه RMSF مربوطه نشان داد که هیچ نوسان غیرعادی مولکولی در ساختار لیگاند شده مشاهده نشده است. اثرات مطلوب شیمیایی و زیستی یک کاندید دارویی در کنار فراهمی آن در طبیعت و دسترسی آسان به آن از اولویت های مهم انتخاب آن است. از این رو در این پژوهش با انجام تکنیک HPLC مشخص شد که ترکیب مناسب cyanidin-3 5-di-o-glucoside در عصاره انار یافت می شود و جزء ماده مؤثره اصلی آن است. تعیین ترکیب دارویی که به صورت مستقیم ویروس کرونا را هدف قرار می دهد می تواند نقش بسیار مهمی در مبارزه علیه این همه گیری گسترده ایفا کند. پروتئاز M<sup>pro</sup> به دلیل نقش مهم آن در تکثیر و بقای ویروسی همواره مورد توجه برای هدف گیری مولکولی قرار دارد. در این تحقیق با استفاده از غربالگری ترکیبات ضد ویروسی متنوع و انجام داکینگ مولکولی، بهترین ترکیبات با انرژی اتصال مطلوب مشخص شدند و خصوصیات زیستی و شیمیایی آنها تعیین گردید. ترکیب cyanidin-3 5-di-o-glucoside با توجه به بررسی های به عمل آمده مشخص گردید که کاندید مناسبی برای هدف گیری پروتئاز M<sup>pro</sup> است و نتایج دینامیک مولکولی نیز بر این امر تأکید داشت؛ اما شایان ذکر است اقدامات صورت گرفته در این پژوهش، مراحل اولیه در مسیر پرپیچ خم کشف داروی مؤثر برای یک بیماری خاص را دربر می گیرد. ارزیابی های بیشتر سلولی و حیوانی می تواند اطلاعات ارزشمندی از اثرکرد ترکیب cyanidin-3 5-di-o-glucoside بر ویروس کرونا را فراهم کند که در صورت نتایج مطلوب آن را تا کارآزمایی های بالینی پیگیری نمود.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و دانشگاه آزاد اسلامی بابت در اختیار قرار دادن امکانات تشکر و قدردانی می نمایند.

## کد اخلاق

کد اخلاق این مطالعه با شماره IR.IAU.PS.REC.1401.153 از دانشکده داروسازی و علوم دارویی - دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران گرفته شده است.

## سهام مشارکت نویسندگان

مشارکت نویسندگان به صورت مساوی است.

## تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان تصریح می نمایند که در مورد پژوهش حاضر هیچ گونه تضاد منافی وجود ندارد.

## References

- [1]. Chan JF, Yuan S, Kok KH, To KK, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 2020;395(10223):514-23 doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9
- [2]. Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, et al. Isolation and characterization of 2019-nCoV-like coronavirus from Malayan pangolins. *Nature* 2020;583(7815):286-9. doi: 10.1038/s41586-020-2313-x
- [3]. Chan HC, Shan H, Dahoun T, Vogel H, Yuan S. Advancing Drug Discovery via Artificial Intelligence. *Trends Pharmacol Sci* 2019;40(8):592-604. doi: 10.1016/j.tips.2019.06.004
- [4]. Parvathaneni V, Kulkarni NS, Muth A, Gupta V. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug Discovery Today* 2019;24(10):2076-85. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.06.014>
- [5]. Berdigaliyev N, Aljofan M. An overview of drug discovery and development. *Future Med Chem* 2020;12(10):939-47. doi: 10.4155/fmc-2019-0307
- [6]. Eder J, Herrling PL. Trends in Modern Drug Discovery. *Handb Exp Pharmacol* 2016;232:3-22. doi: 10.1007/164\_2015\_20
- [7]. Batool M, Ahmad B, Choi S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci* 2019;20(11):2783. doi: 10.3390/ijms20112783
- [8]. Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular docking. *Methods Mol Biol* 2008;443:365-82. doi: 10.1007/978-1-59745-177-2\_19
- [9]. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* 2015;20(7):13384-421. doi: 10.3390/molecules200713384
- [10]. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci* 2019;20(18):4331. doi: 10.3390/ijms20184331
- [11]. Chaudhary A, Tomar R, Asdaq SMB, Imran M, Alaqel SI, Alamri AS, et al. In silico Screening of Phytochemicals as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Mpro and Human ACE-2. *International Journal of Pharmacology* 2022;18(1):104-15. doi: 10.3923/ijp.2022.104.115
- [12]. Das SK, Mahanta S, Tanti B, Tag H, Hui PK. Identification of phytochemicals from *Houttuynia cordata* Thunb. as potential inhibitors for SARS-CoV-2 replication proteins through GC-MS/LC-MS characterization, molecular docking and molecular dynamics simulation. *Mol Divers* 2022;26(1):365-88. doi: 10.1007/s11030-021-10226-2
- [13]. Teli DM, Shah MB, Chhabria MT. In silico Screening of Natural Compounds as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease and Spike RBD: Targets for COVID-19. *Front Mol Biosci* 2021;7:599079. doi: 10.3389/fmolb.2020.599079
- [14]. Houchi S, Messasma Z. Exploring the inhibitory potential of *Saussurea costus* and *Saussurea involucreta* phytoconstituents against the Spike glycoprotein receptor binding domain of SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) variant and the main protease (Mpro) as therapeutic candidates, using Molecular docking, DFT, and ADME/Tox studies. *Journal of Molecular Structure* 2022;1263. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133032>
- [15]. Hatada R, Okuwaki K, Mochizuki Y, Handa Y, Fukuzawa K, Komeiji Y, et al. Fragment Molecular Orbital Based Interaction Analyses on COVID-19 Main Protease - Inhibitor N3 Complex (PDB ID: 6LU7). *J Chem Inf Model* 2020;60(7):3593-602. doi: 10.1021/acs.jcim.0c00283
- [16]. Abdalla M, Mohapatra RK, Sarangi AK, Mohapatra PK, Eltayb WA, Alam M, et al. In silico studies on phytochemicals to combat the emerging COVID-19 infection. *Journal of Saudi Chemical Society* 2021;25(12): 101367. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101367>
- [17]. Alves DR, da Rocha MN, de Sousa DS, Oliveira ICM, Marinho MM, de Morais SM, et al. Virtual Screening of Natural Curcumins and Related Compounds Against SARS-CoV-2. *Journal of Computational Biophysics and Chemistry* 2021;20(1):53-70. doi:10.1142/S2737416521500046



- [18]. Baby K, Maity S, Mehta CH, Suresh A, Nayak UY, Nayak Y. Targeting SARS-CoV-2 Main Protease: A Computational Drug Repurposing Study. *Arch Med Res* 2021;52(1):38-47. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.09.013
- [19]. Sinha SK, Prasad SK, Islam MA, Chaudhary SK, Singh S, Shakya A. Potential Leads from Liquorice Against SARS-CoV-2 Main Protease using Molecular Docking Simulation Studies. *Comb Chem High Throughput Screen* 2021;24(4):591-7. doi: 10.2174/1386207323999200817103148
- [20]. Tang BW, He FM, Liu DP, He F, Wu T, Fang MJ, et al. AI-Aided Design of Novel Targeted Covalent Inhibitors against SARS-CoV-2. *Biomolecules* 2022;12(6):746. doi: 10.3390/biom12060746
- [21]. El-Demerdash A, Metwaly AM, Hassan A, Abd El-Aziz TM, Elkaeed EB, Eissa IH, et al. Comprehensive Virtual Screening of the Antiviral Potentialities of Marine Polycyclic Guanidine Alkaloids against SARS-CoV-2 (COVID-19). *Biomolecules* 2021;11(3):460. doi: 10.3390/biom11030460
- [22]. Pandey M, Radaeva M, Mslati H, Garland O, Fernandez M, Ester M, et al. Ligand Binding Prediction Using Protein Structure Graphs and Residual Graph Attention Networks. *Molecules* 2022;27(16):5114. doi: 10.3390/molecules27165114.
- [23]. Gul F, Khan I, Iqbal J, Abbasi BA, Shahbaz A, Capasso R, et al. Phytochemistry, biological activities and in silico molecular docking studies of Oxalis pes-caprae L. compounds against SARS-CoV-2. *J King Saud Univ Sci* 2022;34(6):102136. doi: 10.1016/j.jksus.2022.102136
- [24]. Rajamanickam R, Mannangatty R, Sampathkumar J, Senthamaraiannan K, Diravidamani B. Synthesis, crystal structure, DFT and molecular docking studies of N-acetyl-2,4-diaryl-3-azabicyclo 3.3.1 nonan-9-yl -9-spiro-4'-acetyl-2'-(acetylamino)-4',9-dihydro-1',3',4'-thiadiazoles: A potential SARS-nCoV-2 Mpro (COVID-19) inhibitor. *Journal of Molecular Structure* 2022;1259. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132747>
- [25]. Kumar B, Zaidi S, Haque S, Dasgupta N, Hussain A, Pramodh S, et al. In Silico Studies Reveal Antiviral Effects of Traditional Indian Spices on COVID-19. *Curr Pharm Des* 2021;27(32):3462-75. doi: 10.2174/1381612826666201223095548
- [26]. Prajapati J, Patel R, Goswami D, Saraf M, Rawal RM. Sterenin M as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease identified from MeFSAT database using molecular docking, molecular dynamics simulation and binding free energy calculation. *Comput Biol Med* 2021;135:104568. doi: 10.1016/j.compbimed.2021.104568
- [27]. Mukherjee S, Sharma D, Sharma AK, Jaiswal S, Sharma N, Borah S, et al. Flavan-based phytoconstituents inhibit Mpro, a SARS-COV-2 molecular target, in silico. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. 2022; 40(22): 11545-59. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1960196>
- [28]. Dallochio RN, Dessi A, De Vito A, Delogu G, Serra PA, Madeddu G. Early combination treatment with existing HIV antivirals: an effective treatment for COVID-19? European review for medical and pharmacological sciences. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2021;25(5):2435-48. doi: 10.26355/eurrev\_202103\_25285
- [29]. Choudhary MI, Shaikh M, Atia tul W, Atta ur R. In silico identification of potential inhibitors of key SARS-CoV-2 3CL hydrolase (Mpro) via molecular docking, MMGBSA predictive binding energy calculations, and molecular dynamics simulation. *PLoS One* 2020;15(7):e0235030. doi: 10.1371/journal.pone.0235030
- [30]. Boufissiou A, Abdalla M, Sharaf M, Al-Resayes SI, Imededdine K, Alam M, et al. In-silico investigation of phenolic compounds from leaves of Phillyrea angustifolia L. as a potential inhibitor against the SARS-CoV-2 main protease (Mpro PDB ID:5R83) using a virtual screening method. *Journal of Saudi Chemical Society* 2022;26(3):101473. doi: 10.1016/j.jscs.2022.101473
- [31]. Thirumalaisamy R, Aroulmoji V, Iqbal MN, Deepa M, Sivasankar C, Khan R, et al. Molecular insights of hyaluronic acid-hydroxychloroquine conjugate as a promising drug in targeting SARS-CoV-2 viral proteins. *J Mol Struct* 2021;1238:130457. doi: 10.1016/j.molstruc.2021.130457
- [32]. Muhammad I, Rahman N, Gul EN, Niaz S, Basharat Z, Rastrelli L, et al. Screening of potent phytochemical inhibitors against SARS-CoV-2 protease and its two Asian mutants. *Comput Biol Med* 2021;133:104362. doi: 10.1016/j.compbimed.2021.104362.
- [33]. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. AutoDock Vina 1.2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. *J Chem Inf Model* 2021;61(8):3891-8.
- [34]. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*. *J Comput Chem* 2005;26(16):1701-18. doi: 10.1002/jcc.20291
- [35]. Rollie C, Chevallereau A, Watson BN, Chyou TY, Fradet O, McLeod I, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020;579(7798):265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- [36]. Hegyi A, Ziebuhr J. Conservation of substrate specificities among coronavirus main proteases. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 3):595-9. doi: 10.1099/0022-1317-83-3-595
- [37]. Bacha U, Barrila J, Velazquez-Campoy A, Leavitt SA, Freire E. Identification of novel inhibitors of the SARS coronavirus main protease 3CLpro. *Biochemistry* 2004;43(17):4906-12. doi: 10.1021/bi0361766
- [38]. Wu CY, Jan JT, Ma SH, Kuo CJ, Juan HF, Cheng YS, et al. Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(27):10012-7. doi: 10.1073/pnas.0403596101
- [39]. Wu MY, Dai DQ, Yan H. PRL-dock: Protein-ligand docking based on hydrogen bond matching and probabilistic relaxation labeling. *Proteins* 2012;80(9):2137-53. doi: 10.1002/prot.24104

- [40]. Masimirembwa CM, Bredberg U, Andersson TB. Metabolic stability for drug discovery and development: pharmacokinetic and biochemical challenges. *Clin Pharmacokinet* 2003;42(6):515-28. doi: 10.2165/00003088-200342060-00002
- [41]. Arnott JA, Planey SL. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opin Drug Discov* 2012;7(10):863-75. doi: 10.1517/17460441.2012.714363
- [42]. Tsopelas F, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2017;12(9):885-96. doi: 10.1080/17460441.2017.1344210