



The Structure of Spike Protein in SARS-Cov-2 and its Receptors on Host cell: Strategies for Drug Discovery Based on the Natural Products

ARTICLE INFO

Article Type Original Research

Authors

S. Zahra Bathaie¹
Nassim Faridi¹
Abbasali Salarifar¹

¹Department of Clinical
Biochemistry, Faculty of Medical
Sciences, Tarbiat Modares
University, Tehran, Iran.
(bathai_z@modares.ac.ir)

*Correspondence

Address: Department of Clinical
Biochemistry, Faculty of Medical
Sciences, Tarbiat Modares University,
Tehran, Iran.

P.O. Box: 14115-331
Tel: (21) 82884567
Mob: (0912) 3273694
E-mail:
bathai_z@modares.ac.ir

Article History

Received: August 24, 2020
Accepted: February 21, 2021
ePublished: March 18, 2021

ABSTRACT

The new Coronavirus, which was named SARS-CoV-2 is one of the members of the Coronavirus family, which induces Covid-19 or acute respiratory infection. This virus was firstly known in 2019 in Wuhan, China; and then, rapidly propagated around the world. In this review, we will present the structure and function of the Spike (S) protein in this virus and its receptors on the host cells. In addition to ACE2, which was initially identified as the cell surface receptor of this virus, it was observed that CD147 and GRP 78 also act as the receptors on host cells. Also, based on the mechanism of action, a brief introduction will present the drugs used to treat this Coronavirus. The drugs that target S protein, Proteinases; RNA-dependent RNA polymerases, helicases, or structural lipids of the virus membrane. In addition, the proposed natural products which are currently recommended as supplements are discussed. For example, flavonoids, polyphenols, and polar compounds are substances whose antiviral effects against Coronavirus have been studied and demonstrated. In conclusion, since the effective drug to eradicate this virus is not yet known, it seems that according to the structural characteristics and mechanism of action, using natural compounds as a complementary or preventive medicine will be useful to inhibit or delay the entrance, proliferation, and/ or infectivity of the virus.

Keywords: Covid-19; ACE2; CD147; GRP78; Proteinases; RNA-dependent RNA Polymerase; Helicase; Flavonoids; Polyphenols; Polar compounds.

ساختار پروتئین S در ویروس SARS-CoV-2 و گیرنده‌های آن در سطح سلول میزبان:

راهکارهایی برای یافتن داروهایی از میان مواد طبیعی

سیده زهرا بطحائی

گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

نسیم فریدی

گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

عباسعلی سالاری‌فر

گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

که اثرات ضد ویروسی آنها علیه کروناویروس بررسی و نشان داده شده است. در نهایت، به نظر می‌رسد تا زمانی که داروی مؤثر برای از بین بردن این ویروس شناخته نشده است، با توجه به مکانیزم عمل این ویروس و ویژگی‌های ساختاری آن، با استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان طب مکمل یا پیشگیری می‌تواند روند ورود، تکثیر و عفونت‌زایی این ویروس را محدود کرد یا به تعویق انداخت.

کلیدواژه‌ها: کوید-۱۹؛ ACE2؛ CD147؛ GRP78؛ پروتئین‌ها؛ RNA پلیمراز وابسته به RNA؛ هلیکاز، فلاونوئیدها؛ پلی فنل‌ها؛ ترکیبات قطبی.

تاریخ دریافت ۹۹/۰۶/۰۳

تاریخ پذیرش ۹۹/۱۲/۳

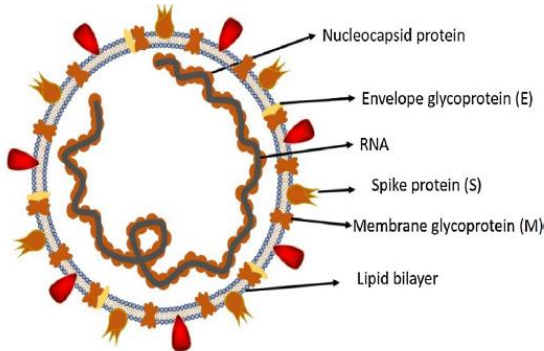
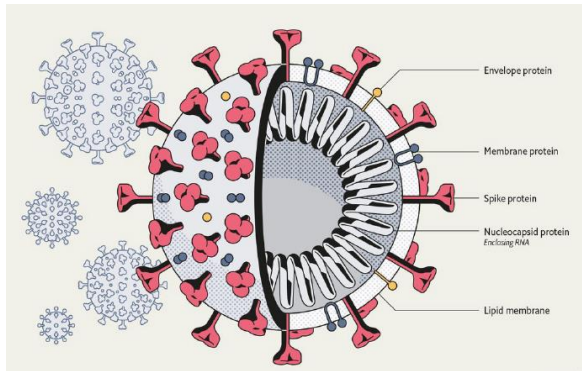
*نویسنده مسئول: bathai_z@modares.ac.ir

مقدمه

کروناویروس‌ها خانواده بزرگی از ویروس‌ها هستند که موجب بروز بیماری در انسان یا حیوان می‌شوند. در انسان، چندین نوع کروناویروس شناخته شده است که در محدوده وسیعی، از سرماخوردگی معمولی تا بیماری‌های بسیار حاد مثل سندروم تنفسی خاورمیانه (MERS) Middle East Respiratory Syndrome و سندروم حاد شدید تنفسی (SARS) Severe Acute Respiratory Syndrome، موجب عفونت دستگاه تنفسی می‌شوند. جدیدترین نوع کشف شده کروناویروس به نام SARS-CoV-2 سبب بیماری کوید-۱۹ می‌شود [۱]. یک جستجو در PubMed با کلیدواژه SARS-CoV-2 در عنوان، نشان داد که تا امروز (۹۹/۰۵/۲۹) ۶۲۷ مقاله و مستند علمی درباره کروناویروس سندرم حاد شدید تنفسی ۲ در پاب‌مد فهرست شده است که همگی، جز یک مورد در سال ۲۰۲۰ به چاپ رسیده‌اند. این ویروس یا کروناویروس جدید، عامل بیماری است که به اختصار، کوید-۱۹ نامیده شده است تا با بیماری‌های ناشی از انواع دیگر این ویروس مثل MERS یا SARS اشتباه نشود [۱]. این بیماری اثراتی متفاوت بر افراد آلوده می‌گذارد و در اکثر افراد

چکیده

کروناویروس جدید به SARS-CoV-2 از خانواده کروناویروس‌هاست و باعث القاء بیماری کوید-۱۹ و عفونت حاد تنفسی در انسان می‌شود. این نوع جدید ویروس که برای اولین بار در سال ۲۰۱۹ در ووهان چین شناسایی شد، به سرعت در سراسر جهان انتشار پیدا کرد. در این مقاله، ساختارهای پروتئینی خارگلیکوپروتئینی (S) در این ویروس بررسی و گیرنده‌های آن در سطح سلول میزبان مرور می‌شود. تحقیقات نشان داده است که علاوه بر ACE2 به عنوان اولین گیرنده سطح سلولی شناخته شده برای این ویروس، CD147 و GRP78 نیز به عنوان گیرنده‌های آن فعالیت دارند. همچنین، ضمن معرفی اجمالی داروهای مورد استفاده برای درمان این ویروس بر اساس مکانیزم عمل، که پروتئین S، انواع پروتئین‌ها، RNA پلیمراز وابسته به RNA، هلیکازها، یا لیپیدهای ساختاری غشای این ویروس را هدف قرار می‌دهند، ترکیبات دارویی پیشنهادی بامنشاء طبیعی / گیاهی نیز معرفی شده‌اند که در حال حاضر به عنوان مکمل توصیه می‌شوند. برای مثال، فلاونوئیدها، پلی فنل‌ها و ترکیبات قطبی موادی هستند



شکل ۱. ویروس کوید-۱۹. ساختار کلی به طور شماتیک نمایش داده شده و انواع پروتئین‌های غشایی و ژنوم نیز در محل خود نشان داده شده‌اند [۳، ۶].

بعد از برش در مرز بین زیرواحدهای S1 و S2 که جلوتر شرح داده خواهد شد، گلیکوپروتئین S به صورت سه زیرواحدی با اتصالات غیرکولان باقی می‌ماند. میان‌کنش با گیرنده‌های میزبان و فرایند پروتئولیزی باعث دومین برش (S2') و موجب جدا شدن زیرواحدهای S1 از پروتئین S می‌شود [۸، ۹]. باقی‌مانده سه زیرواحدی S2، که در میان تمام کروناویروس‌ها از نظر توالی حفظ شده است، متحمل یک سری تغییرات بنای فضائی می‌شود تا هم‌جوشی غشایی بین غشاهای ویروس و میزبان را شروع کند [۱۰].

جایگاه اتصال به گیرنده

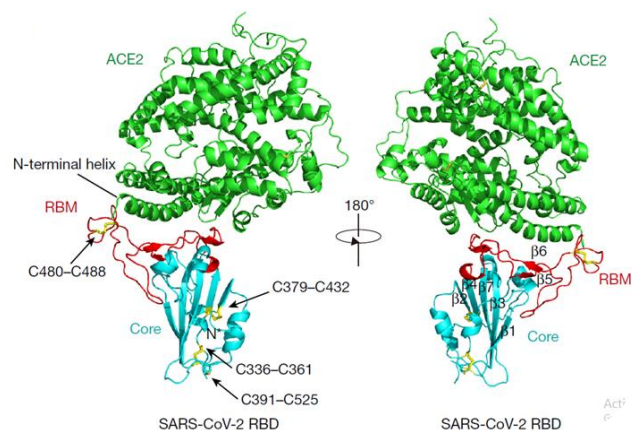
همان‌طور که ذکر شد، اتصال پروتئین‌های S به گیرنده سطحی در سلول میزبان، به هم‌جوشی بین غشاء ویروس و سلول میزبان، و زمینه‌سازی جهت ورود محتویات ژنتیکی ویروس به سلول میزبان

شدت بیماری از ملایم تا متوسط است، بدون نیاز به بستری شدن در بیمارستان. علائم عمومی بیماری، تب، خستگی شدید و سرفه‌های خشک است. سایر علائم عبارت‌اند از دردهای عضلانی، گلودرد، اسهال، سردرد، ورم ملتحمه، ازدست‌دادن حس بویایی یا چشائی، بثورات روی دست و پا، و تغییر رنگ انگشتان دست و پا.

ساختار ویروس SARS-CoV-2

این ویروس حاوی RNA تک‌ رشته با پلاریته مثبت (Positive-sense) است که با یک غشای دولایه لیپیدی احاطه شده است و در ابتدا سلول‌های اپیتلیال موجود در ریه‌ها را آلوده می‌کند [۲، ۳]. هر ویرون SARS-CoV-2 تقریباً ۵۰-۲۰۰ نانومتر قطر دارد [۴]. این ویروس، چهار نوع پروتئین ساختاری دارد و همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، به نام‌های پروتئین‌های سنبله یا خارگلیکوپروتئینی (Spike protein, S)، پوششی (Envelope, E)، غشایی (Membrane, M) و نوکلئوکپسید (Nucleocapsid, N) شناخته می‌شوند. پروتئین N، ژنوم RNA را در خود نگه می‌دارد، و پروتئین‌های S، E و M با هم پوشش ویروس را ایجاد می‌کنند. پروتئین‌های S که از پروتئین‌های سرتاسری غشایی هستند، به صورت سه زیرواحد هم‌جنس، از سطح ویروس بیرون زده‌اند، و روی پوشش ویروس قرار دارند [۵]. وظیفه این پروتئین‌ها اتصال و ادغام یا هم‌جوشی (Fusion) غشای ویروس به غشای سلول میزبان است.

شاخص کلیدی در انتقال کروناویروس از حیوان به انسان و از انسان به انسان، گلیکوپروتئین S است که در سطح ویروس قرار دارد. گلیکوپروتئین S در کروناویروس یک پروتئین هم‌جوشی کلاس I ویروسی است که به صورت سه زیرواحدی با جایگاه‌های متعدد گلیکوزیله شدن وجود دارد. این گلیکوپروتئین S یک بخش آمینی انتهائی حاوی زیرواحد S1 دارد که واسطه شناسائی گیرنده در سلول میزبان است و یک بخش کربوکسیل انتهائی که حاوی زیرواحد S2 است و برای هم‌جوشی غشاهای ویروس و میزبان ضروری است [۷].



شکل ۲: ساختار کلی گلیکوپروتئین S، دامین اتصال به گیرنده (RBD) در آن و پروتئین ACE2. در شکل سمت راست، محل دقیق زنجیره‌های بتا-۱ تا ۷ نشان داده شده و در شکل سمت چپ، پیوندهای دی سولفیدی همراه با شماره آمینواسیدهای سیستئین نشان داده شده است [۱۲].

چندین گروه تحقیقاتی این آنزیم را به‌عنوان گیرنده سطح سلولی SARS-CoV-2 نشان داده‌اند [۱۲، ۱۴-۱۸]. حتی مشاهده شده است که، سلول‌های HeLa که ACE2 را بیان می‌کنند نیز، مستعد ابتلا به عفونت این ویروس هستند درحالی که سلول‌های بدون ACE2 این‌گونه نیستند و پاسخی به این ویروس ندارند [۱۹].

مطالعه میکروسکوپ الکترونی انجمادی Cryogenic Electron Microscopy (cryoEM) روی پروتئین S در ویروس SARS-CoV-2 و میان‌کنش آن با ACE2 به‌عنوان گیرنده سلولی، نشان داده است که اتصال به گیرنده باعث القای قطعه‌قطعه‌شدن S1 توسط ACE2 و این امر موجب می‌شود حالت ادغامی زیرواحد S2 که برای هم‌جوشی با غشاء سلول میزبان ضروری است، تثبیت شود [۱۲].

بنابراین، اتصال به گیرنده ACE2 گام اولیه مهمی برای ورود SARS-CoV-2 به سلول‌های هدف است [۱۳، ۲۰]. همچنین، مطالعه‌ای نشان داده است که این ویروس تمایل بیشتری از سویه ویروس "سارس اصلی" به ACE2 انسانی دارد [۲۰]. اندازه‌گیری‌های اتصال به طریق آزمایشگاهی نشان می‌دهند که دامین اتصال به گیرنده در SARS-CoV-2 با تمایلی در محدوده نانومولار به ACE2 متصل می‌شود. این امر نشان‌دهنده آن است که دامین RBD یک مؤلفه کلیدی در زیرواحد S1 است که مسئول

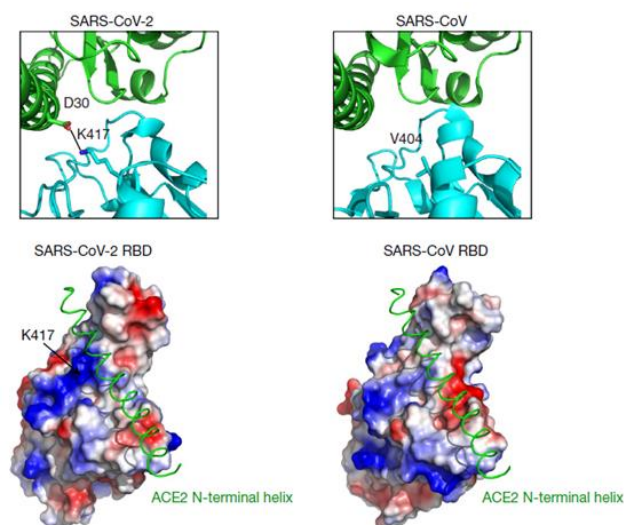
منجر می‌شود [۵]. هرکدام از پروتئین‌های S، حاوی دو زیر واحد کاربردی S1 و S2 هستند. زیرواحد S1 مسئول اتصال به گیرنده سلول میزبان و زیرواحد S2 مسئول هم‌جوشی غشاهای ویروس و سلول میزبان است. زیرواحد S1 حاوی دامین‌های متصل‌شونده به گیرنده (Receptor-binding domain, RBD) است و به تثبیت زیر واحد S2 پس از اتصال به غشاء و فرایند هم‌جوشی کمک می‌کند [۱۱].

اتصال ویروس به آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۲ (ACE2) Angiotensin converting enzyme 2 به‌عنوان گیرنده

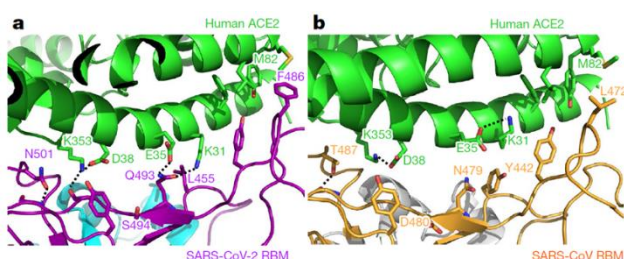
همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، دامین RBD پروتئین S از پنج رشته (Strand) بتای تاخورده و ناهم‌سو (Antiparallel) به نام‌های $\beta 1$ ، $\beta 2$ ، $\beta 3$ ، $\beta 4$ و $\beta 7$ تشکیل شده است که با مارپیچ‌های کوتاه و لوپ‌های موجود در مرکز پروتئین (Core)، به هم متصل شده‌اند. رشته‌های $\beta 4$ و $\beta 7$ در مرکز پروتئین و همچنین بخش‌هایی کوتاه از رشته‌های $\beta 5$ و $\beta 6$ به مارپیچ‌های $\alpha 4$ و $\alpha 5$ و لوپ‌ها متصل هستند. این بخش، حاوی الگوی (Motif) اتصال به گیرنده (Receptor-binding motif, RBM) است و حاوی ریشه‌های (Residues) آمینواسیدهای متصل‌شونده به آنزیم ACE2 در ویروس است. در مجموع، ۹ ریشه سیستئین در RBD یافت می‌شود، که ۸ عدد از آنها موجب تشکیل ۴ جفت پیوند دی‌سولفیدی مستحکم می‌شوند. در بین این ۴ جفت، ۳ پیوند (Cys336-Cys361، Cys379-Cys432 و Cys391-Cys525) در مرکز، به تثبیت ساختار صفحات β کمک می‌کنند. درحالی که دیگری (Cys480-Cys488) موجب اتصال لوپ‌ها در انتهای دورتر (Distal) RBM می‌شود [۱۲].

آزمایش‌های مدل‌سازی پروتئینی، درباره گلیکوپروتئین S نشان می‌دهد که ویروس SARS-CoV-2 تمایل کافی برای اتصال به آنزیم ACE2 موجود روی سلول‌های انسانی دارد. این آنزیم در سطح بیرونی غشای سلولی سلول‌های موجود در بافت‌های دیگر ازجمله: ریه‌ها، شریان‌ها، قلب، کلیه و روده نیز حضور دارد. این ویروس از این آنزیم به‌عنوان واسطه‌ای جهت ورود به سلول استفاده می‌کند [۱۳].

این میان‌کنش را به تفکیک در هر دو ویروس این خانواده با ACE2، نشان می‌دهد.



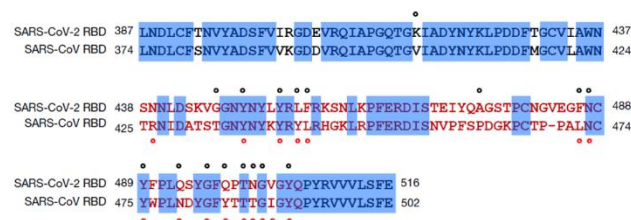
شکل ۴. موقعیت K417 / V404 در خارج از RBM و نقشه‌های الکترواستاتیک از SARS-CoV-2 RBD و SARS-CoV RBMs. موقعیت K417 در SARS-CoV-2 RBD با فلش سیاه مشخص شده است. ماریج N ترمینال ACE2 با روبان سبز نشان داده شده است. کد برای مجموعه SARS-CoV RBD-ACE2: 2AJF [۱۲].



شکل ۵. وضعیت دقیق میان‌کنش‌های ساختاری بین آمینواسیدهای RBM از دو نوع کروناویروس و ACE2 انسانی [۲۲].

دو ناحیه تکراری پپتیدهای هفت تایی ۱ و ۲ به نام‌های Membrane-distal heptad repeat 1 (HR1) و Membrane-proximal heptad repeat 2 (HR2) روی پروتئین S برای اتصال به گیرنده مهم هستند. پس از اتصال RBD در زیر واحد S1 از

اتصال SARS-CoV-2 به ACE2 است [۱۱، ۲۱]. تفاوت دو نوع ویروس کرونا ۱ و ۲ در اتصال به ACE2، ناشی از تفاوت‌های ساختاری آن دو است که در شکل ۳ به مهم‌ترین آنها اشاره شده است. یکی از این تفاوت‌ها در توالی الگوی متصل‌شونده به گیرنده ACE2 بین دو ویروس است؛ به این صورت که ۱۴ آمینواسید واکنش‌دهنده با ACE2 به‌طور مشترک در RBM هر دو ویروس وجود دارد. ۸ مورد از این ۱۴ آمینواسید در دو ویروس مشابهند، ولی در پنج مورد به‌رغم تفاوت‌های زنجیره جانبی، خاصیت بیوشیمیایی مشابه وجود دارد. یک مورد نیز در موقعیت Gln498 / Tyr484 است (شکل ۳)، که در موقعیت ۴۹۸ در SARS-CoV-2 گلوتامین و در موقعیت ۴۸۴ در SARS-CoV تیروزین حضور دارد. هر دو این آمینواسیدها با Asp38، Tyr41، Lys353 و Leu45، Gln42 در آنزیم ACE2 میان‌کنش دارند [۱۲].

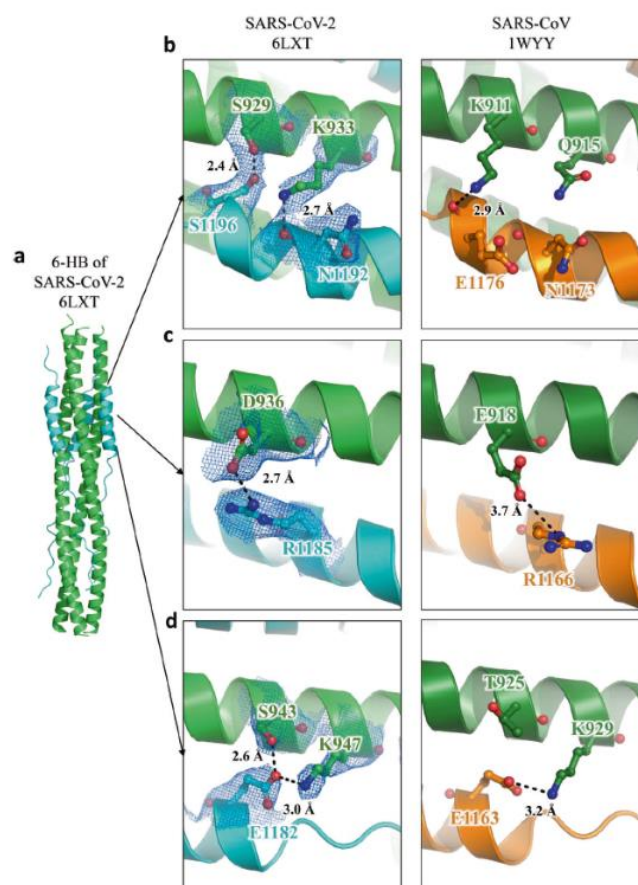


شکل ۳. توالی‌های SARS-CoV-2 RBD و SARS-CoV RBD [۱۲].

آمینواسیدهای متصل‌شونده در SARS-CoV-2 RBD با نقاط سیاه نشان داده شده‌اند. آمینواسیدهای متصل‌شونده در SARS-CoV RBD با نقاط قرمز نشان داده شده‌اند.

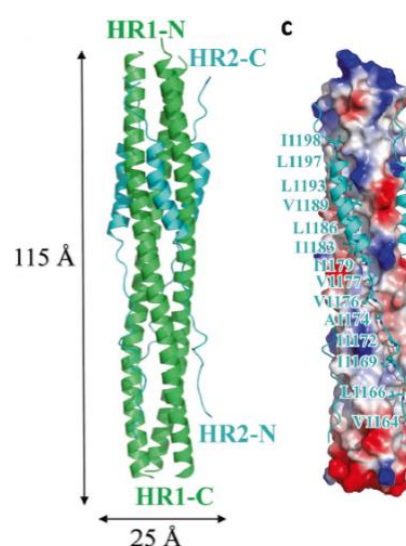
علاوه بر این، تفاوت‌های داخلی RBD، در خارج از RBD در SARS-CoV-2، آمینواسید Lys417 (یا K417) وجود دارد که با گیرنده ACE2 میان‌کنش می‌کند و باعث به‌وجود آمدن پل نمکی بین لیزین-۴۱۷ ویروس و آسپارات-۳۰ در ACE2 می‌شود، درحالی‌که در سویه "سارس اصلی"، به جای لیزین-۴۱۷ یک ریشه والین حضور دارد که نمی‌تواند چنین پل نمکی را به‌وجود آورد (شکل ۴)، در نتیجه با تمایل کمتری به ACE2 متصل می‌شود [۱۲]. شکل ۵ نیز موقعیت سایر آمینواسیدهای دخیل در

با SARS-CoV پایدارتر کند. همان‌طور که در شکل ۷b نشان داده شده است، K911 در SARS-CoV HR1 می‌تواند از طریق یک پل نمکی از فاصله ۲٫۹ Å به E1176 در HR2 متصل شود. اگرچه، با جایگزینی Lys-Ser، S929 در SARS-CoV-2 از طریق پیوند هیدروژنی قوی از فاصله ۲٫۴ Å به S1196 متصل می‌شود. در SARS-CoV، Q915 در دمین HR1 به دمین HR2 متصل نمی‌شود. ولی، با جایگزینی Q-K در ویروس جدید، K933 در دمین HR1 به اکسیژن کربنیل N1172 در HR2 از طریق یک پل نمکی از فاصله ۲٫۷ Å متصل می‌شود (شکل ۷b). در SARS-CoV، E918 در دمین HR1 از طریق یک پل نمکی ضعیف از فاصله ۳٫۷ Å به R1166 در دمین HR2 متصل می‌شود. در SARS-CoV-2، E918 به D936 جهش می‌یابد و از طریق یک پل نمکی با فاصله ۲٫۷ Å به R1185 در دمین HR2 متصل می‌شود (شکل ۷c).



شکل ۷. میان‌کنش بین HR1 و HR2 در SARS-CoV و SARS-CoV-2 [۲۴].

پروتئین S به گیرنده ACE2 روی سلول هدف، دمین‌های تکراری هفتایی ۱ و ۲ در زیر واحد S2 پروتئین S با یکدیگر میان‌کنش می‌دهند و یک دسته شش مارپیچی (six-helix bundle) میله‌ای با طول ۱۱۵ و قطر ۲۵ آنگسترم را می‌سازند. به‌طوری‌که سه مارپیچ HR1 یک پیچش درهم‌رفته مرکزی را تشکیل می‌دهد و سه رشته‌ای HR2 به شکل ناهم سو به آن می‌پیوندد (شکل ۶). این کمپلکس شش تایی خیلی پایدار نیست و احتمال دارد بعد از هم‌جوشی اولیه بخش HR1 در غشاء گیرنده تشکیل شود [۲۳]. [۲۴]



شکل ۶. ساختار مارپیچ شش تایی پس از هم‌جوشی در SARS-CoV-2 [۲۴].

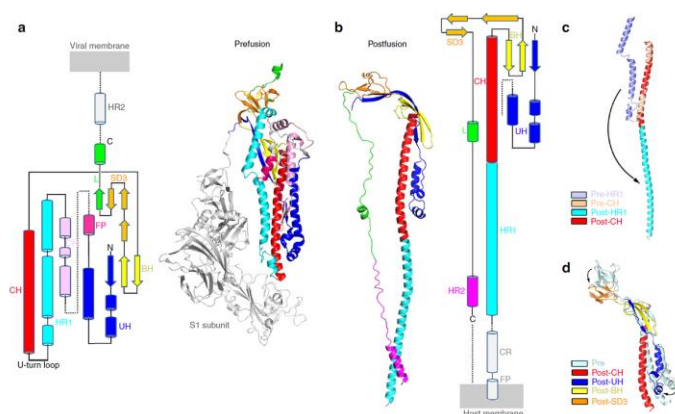
در شکل سمت چپ ساختار HR1 به رنگ سبز و ساختار HR2 به رنگ آبی نشان داده شده است. شکل سمت راست، ساختار الکترواستاتیکی HR1 را نشان می‌دهد که با ساختار روبانی HR2 احاطه و آمینواسیدهای مهم در میان‌کنش نیز نشان داده شده‌اند.

با توجه به مطالعات تعیین توالی و مقایسه آنها، زیر واحد S2 از SARS-CoV-2 و SARS-CoV به ترتیب با ۹۲٫۶٪ و ۱۰۰٪ یکسانی کلی در دمین‌های HR1 و HR2 بسیار حفظ شده‌اند. در ناحیه مرکزی دمین هم‌جوشی HR1، ۸ آمینواسید مختلف وجود دارد که ممکن است باعث تقویت میان‌کنش بین HR1 و HR2 شود و ساختار دسته شش مارپیچی SARS-CoV-2 را در مقایسه

تغییرات ساختاری ویروس در هنگام، و پس از هم‌جوشی با گیرنده در سلول میزبان

از سال‌ها پیش، مطالعات متعددی در این زمینه روی ویروس‌های خانواده کرونا انجام شده که اخیراً نیز به طور خاص روی SARS-CoV-2 ادامه یافته است.

مطالعات ساختاری نشان داده است که ناحیه رابط در توالی HR2 که به ساقه مارپیچ متصل می‌شود نقشی مهم در تشکیل دسته شش تایی مارپیچ HR1-HR2 بازی می‌کند. این مرحله برای ورود ویروس به سلول میزبان ضروری است و با پروتئین‌های کلاس I هم‌جوشی واسطه‌گری می‌شود. مکانیزم هم‌جوشی با سه زیرواحدی SARS-CoV S2، بسیار شبیه سایر گلیکوپروتئین‌های هم‌جوشی کلاس I به نظر می‌رسد [۲۶، ۲۷]. شکل ۸ ساختار و تغییرات بنای فضایی گلیکوپروتئین SARS-CoV S از قبل تا بعد از هم‌جوشی را نشان می‌دهد. شکل ۹ نیز دستگاه هم‌جوشی SARS-CoV S2 پس از هم‌جوشی را نشان می‌دهد.



شکل ۸. ساختار و تغییرات بنای فضایی گلیکوپروتئین SARS-CoV S از قبل تا بعد از هم‌جوشی [۲۷].

- نمایش هندسی و کارتونی SARS-CoV S2 در حالت قبل از هم‌جوشی (PDB: 6NB6) همانند آن چیزی است که در شکل ۵a نیز نمایش داده شده است. زیرواحد S1 قبل از هم‌جوشی، بی‌رنگ نمایش داده شده است.
- نمایش هندسی و کارتونی SARS-CoV S2 در حالت بعد از هم‌جوشی. نمایش رنگ‌ها همانند شکل ۵a است.
- تغییرات ساختاری بخش‌های HR1 و CH در هنگام

شکل‌های a تا d ساختار شش مارپیچی HR1 را به رنگ سبز روشن در SARS-CoV-2 و سبز تیره در SARS-CoV نشان می‌دهد. همچنین HR2 به رنگ آبی در SARS-CoV-2 و رنگ نارنجی در SARS-CoV نشان داده شده است.

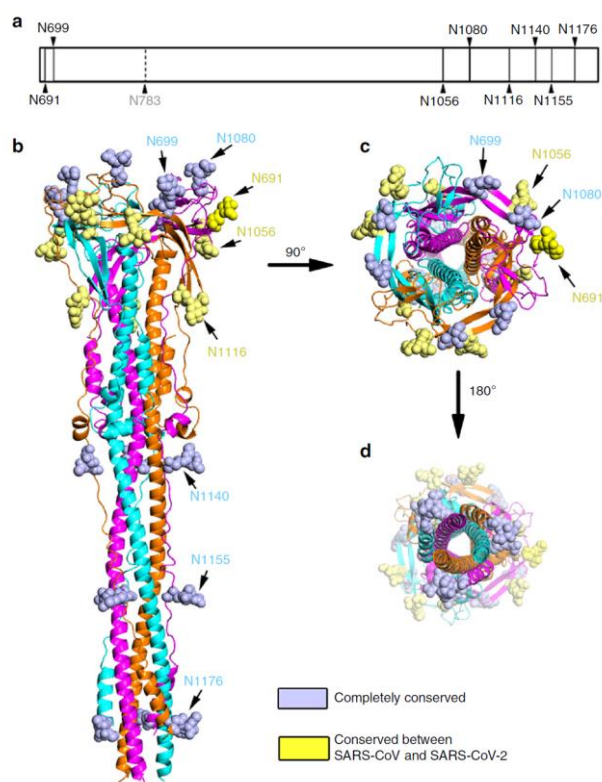
نقش پروتئاز سرتاسری سرین ۲ (Transmembrane TMPRSS2, protease serine 2) در ادغام غشاهای ویروس و میزبان

در SARS-CoV، K929 در HR1 به E1163 در HR2 از طریق یک پل نمکی از فاصله ۳٫۲ Å متصل می‌شود، درحالی‌که T925 در میان‌کنش وارد نمی‌شود. اگرچه، هنگامی که T925 به S943 جهش یابد، می‌تواند به E1182 در دمین HR2 با پیوند هیدروژنی از فاصله ۲٫۶ Å متصل شود، و K947 نیز می‌تواند از طریق یک پل نمکی از فاصله ۳٫۰ Å به E1182 متصل شود (شکل ۷d). این نتایج بیانگر این است که جایگزینی‌های متعدد آمینواسیدها در دمین HR1 ویروس SARS-CoV-2 می‌تواند میان‌کنش‌های بین دمین‌های HR1 و HR2 را تقویت کند تا ساختار دسته شش مارپیچی را پایدارتر کند که این احتمالاً به افزایش عفونت‌زایی ویروس منجر می‌شود.

در ویروس SARS-CoV-2، پروتئین S با پروتئازهای میزبان از جمله پروتئاز سرتاسری TMPRSS2، در محلی بلافاصله در بالادست پپتید ادگامی (S2)، بریده می‌شود. این برش برای فعال‌سازی پروتئین جهت هم‌جوشی غشاهای واسطه تغییرات زیاد و برگشت‌ناپذیر ساختار فضایی ضروری است [۲۱]. پس از این برش، پروتئین S ویروس باز می‌شود و پپتید ادگامی در معرض گیرنده قرار می‌گیرد.

مطالعه قبلی نشان داده است که TMPRSS2 اساساً در پروستات و کلیه موش بیان می‌شود. مطالعه با هیبرید کردن درجا نشان داده است که این پروتئین در اپیتلیوم دستگاه گوارش، دستگاه ادراری تناسلی و دستگاه تنفسی جنین موش و موش بالغ نیز بیان می‌شود. درحالی‌که بیان آن در پروستات، کولون، معده و غدد بزاقی و بافت‌های دیگر انسان نیز مشاهده شده است [۲۵].

N691، N699، N1056 و N1080 که در منطقه نسبتاً پایدار دارای رشته‌های β در اطراف پایه C در ماریچ تنه مرکزی قرار دارند. چهار جایگاه گلیکوزیله شدن دیگر N1116، N1140، N1155 و N1176 در ناحیه HR2 و منطقه اتصال دهنده بالادست آن قرار دارند.

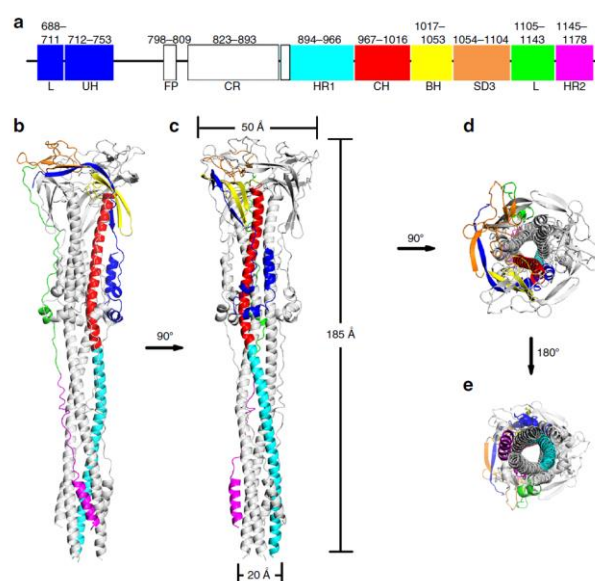


شکل ۱۰. وضعیت واحدهای گلیکان در دستگاه هم‌جوشی SARS-CoV S2 در وضعیت پس از هم‌جوشی [۲۸].

a. دیگرام شماتیک جایگاه‌های گلیکوزیله شدن در زیرواحد SARS-CoV S2. جایگاه‌های مرئی گلیکوزیله شدن N با خطوط ممتد و جایگاه نامرئی گلیکوزیله شدن N با خط چین نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل‌ها نشان می‌دهد که پنج جایگاه گلیکوزیله شدن N699، N1080، N1140، N1155 و N1176 به طور کامل در میان SARS، MERS و SARS-CoV-2 حفظ شده‌اند. درحالی‌که سه جایگاه گلیکوزیله شدن N691، N1056 و N1116 فقط بین SARS-CoV و SARS حفظ شده‌اند. این گلیکان‌ها سطح در دسترسی از مناطق مربوط را طی انتقال از حالت پیش-به پس-

هم‌جوشی است. d. تغییرات ساختاری بخش‌های BH، UH و SD3 در هنگام فیوژن غشایی.



شکل ۹: نمای کلی از دستگاه هم‌جوشی SARS-CoV S2 پس از هم‌جوشی [۲۷].

a. یک نمودار شماتیک از اکتودمین زیرواحد S2 از SARS CoV. نواحی بی‌رنگ قسمت هادی را نشان می‌دهند که ساختار آن تعیین نشده است. اختصارات در آن به شرح زیر است: L linker region, UH the upstream helices, FP fusion peptide, CR connecting region, HR heptad repeat, CH central helix, BH β -hairpin, SD3 subdomain. b تا e. تصاویر کارتنونی سه زیرواحدی S2 با رنگ‌هایی همانند آنچه در a دیده می‌شود.

نقش پوشش قندی سه زیرواحدی SARS-CoV S2 در فرار از سیستم ایمنی:

گلیکوپروتئین S، آنتی‌ژن اصلی تعیین‌شده در سطح ویروس است. کروناویروس تعداد زیادی از گلیکان‌های متصل با پیوند N را در سطح گلیکوپروتئین S دارد تا دسترس آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده را محدود کند و از حمله سیستم ایمنی میزبان محفوظ بماند. تاکنون ۸ مورد از ۹ گلیکانی که از طریق N متصل می‌شوند، شناسایی شده است. شکل ۱۰ پراکندگی گلیکان پوشش دهنده سطح سه زیرواحدی SARS-CoV S2 را پس از هم‌جوشی نشان می‌دهد. چهار ناحیه گلیکوزیله شدن از طریق N عبارت‌اند از:

توزیع بافتی گیرنده ACE2

همان‌طور که در بالا نیز اشاره شد، مطالعات بیان ACE2 در سایر بافت‌ها مثل روده کوچک، بیضه، کلیه، قلب، تیروئید، بافت چربی، ریه‌ها، روده بزرگ، کبد، مثانه و غده فوق کلیه را نشان داده‌اند، که البته خطر آلودگی آنها یکسان نیست و آلودگی بعضی مثل ریه پرخطرتر است. همچنین تفاوتی در سطح بیان ACE2 بین زن و مرد یا بین افراد جوان‌تر و مسن‌تر در هر بافت دیده نشده است [۲۹، ۳۰].

سایر گیرنده‌های SARS-CoV-2 در سطح سلول میزبان

در مطالعات اخیر نشان داده شده است که SARS-CoV-2 می‌تواند از یک پروتئین غشایی به نام CD147 که یک گلیکوپروتئین سرتاسری غشایی از خانواده ایمونوگلوبولین‌هاست نیز، برای ورود به سلول کمک بگیرد [۱۳]. بیان CD147 در بافت‌های توموری، بافت‌های ملتهب و سلول‌های آلوده به پاتوژن زیاد می‌شود، که با کاهش واکنش متقاطع این سلول‌ها با سلول‌های طبیعی، از آنها حفاظت می‌کند [۳۱]. نتایج مطالعه به روش SPR (Surface Plasmon Resonance) نشان می‌دهد، که میل ترکیبی CD147 و دمین RBD پروتئین S، چیزی در حدود $1/85 \mu M$ است. همچنین آزمایش‌ها نشان داده‌اند که پس از مواجهه سلول‌های Vero E6 با ویروس SARS-CoV-2، سلول‌هایی که از قبل در آنها بیان پروتئین CD147، مسدود شده بوده است به میزان ۵۰ درصد کمتر از نمونه کنترل توسط ویروس SARS-CoV-2 آلوده شده‌اند [۲۸]. این مطالعه دلیل دیگری بر اهمیت این گیرنده در سطح سلول میزبان برای میان‌کنش با ویروس است.

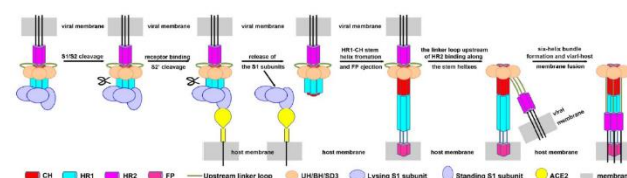
همچنین، با استفاده از هر دو روش مدلینگ ملکولی و بیوانفورماتیک ساختاری نشان داده شده که گلیکوپروتئین S در SARS-CoV-2 به پروتئین Glucose Regulated Protein 78 (GRP78) نیز متصل می‌شود [۳۲]. بررسی هم‌ترازی چندگانه توالی پروتئین S در انواع کروناویروس و نحوه میان‌کنش آن با پروتئین GRP78 در شکل ۱۲ نشان داده شده است.

پروتئین GRP78 که نام دیگر آن Binding immunoglobulin protein (BiP) است، پروتئین ملایم (Chaperone) اصلی در پاسخ

هم‌جوشی پنهان می‌کنند. بنابراین، ممکن است زیرواحد S2 را از شناسایی توسط آنتی‌بادی محافظت کند. این مسئله یادآور گلیکان موجود در HCoV-NL63 S42 و HIV-1Env44 است که در فرار از سیستم ایمنی با پوشاندن سطح پروتئین کمک می‌کند. غنی بودن جایگاه‌های گلیکوزیله شدن در ناحیه HR2 و منطقه پیونددهنده بالادست آن، نشان‌دهنده اهمیت این مناطق برای هم‌جوشی غشاء به واسطه گلیکوپروتئین S2 است.

b-d. توزیع لایه قندی در زیرواحد S2 در نمای جانبی (b)، نمای بالا (c) و نمای پایین (d) نشان داده شده است. مناطق بسیار حفاظت‌شده گلیکوزیله شدن در کروناویروس با کره‌های آبی روشن نشان داده شده است. جایگاه‌های گلیکوزیله شدن کاملاً محافظت‌شده بین SARS-CoV و SARS-CoV-2 به صورت کره‌های زرد نشان داده شده‌اند.

مکانیزم پیشنهادی فرایند هم‌جوشی غشای کروناویروس توسط گلیکوپروتئین S در SARS-CoV به طور شماتیک در شکل ۱۱ نشان داده شده است. برش در مرز بین دو زیر واحد S1 و S2 ساختار کلی سه زیرواحدی پروتئین S قبل از هم‌جوشی را تغییر نمی‌دهد. اتصال به گیرنده میزبان و شکاف در جایگاه S2 باعث تسریع در آزادسازی زیرواحدهای S1 می‌شود. تغییرات ساختاری ناحیه مارپیچ مرکزی، پپتید هم‌جوشی (Fusion peptide, FP) را به درون غشای هدف می‌راند. مناطق پیونددهنده بالادست الگوی HR2، آزاد می‌شوند و در امتداد مارپیچ ساقه قرار می‌گیرند. سپس HR2 به ساختار HR1 نزدیک می‌شود و یک دسته شش مارپیچی را تشکیل می‌دهد که در نهایت باعث هم‌جوشی غشاها می‌شود [۲۷].



شکل ۱۱. نمایش چگونگی نزدیک شدن غشاهای ویروس و میزبان، نقش پروتئین S و سرانجام تشکیل دسته شش‌تایی و هم‌جوشی غشاء ویروس با سلول میزبان [۲۷].

۳ نمایش داده شده است. در بالا نواحی ساختار دوم پروتئین S کوید-۱۹، و در قسمت پائین تر سطح در دسترس (آبی، سطح در دسترس؛ بنفش، نیمه دسترس؛ و سفید نواحی پنهان) نمایش داده شده است. چهار ناحیه پروتئین S با سایه سبز (I)، آبی (II)، ارغوانی (III) و قرمز (IV) نشان داده شده‌اند. تطابق ساختاری پروتئین S در سارس اصلی و کوید-۱۹ نشان‌دهنده RMSD حدود ۰/۲۸۴ آنگستروم و یکسانی توالی‌ها حدود ۷۷/۳۸ درصد بود. (B) مدل ساختاری گلیکوپروتئین S به شکل سه زیر واحدی مشابه. دو زنجیره A سبز و B فیروزه‌ای ساختار بسته دارند. در حالی که زنجیره C به رنگ بنفش، ساختار باز دارد که آن را قادر می‌کند گیرنده روی سلول میزبان شناسایی می‌کند. بیان شده که ناحیه IV در پروتئین S (C4 80-C4 88) جایگاه شناسایی GRP78 در سطح سلول است، که در سمت راست بالا بزرگ‌تر و به صورت کارتونی نمایش داده شده است.

سرنوشت ویروس پس از ورود به سلول میزبان

همان‌طور که در شکل ۱۳ نشان داده شده است، ویروس پس از ورود به سلول میزبان RNA خود را به داخل سلول آزاد کرده و سلول را مجبور می‌کند تا نسخه‌های بیشتری از ویروس را تولید و منتشر کند که باعث می‌شود میزبان بیشتر آلوده شود [۲۱]. نتیجه، ورود کروناویروس به سلول‌های در معرض، یک فرآیند پیچیده است که به اقدام هماهنگ گیرنده و پردازش پروتئولیزی پروتئین S2 برای هم‌جوشی سلول-ویروس نیاز دارد [۱۳]. به‌طور کلی، مراحل ورود و تکثیر ویروس در سلول میزبان را می‌توان به شش مرحله تقسیم کرد [۳۳].

۱. هم‌جوشی غشاهای ویروس و سلول میزبان از طریق گیرنده خاص. سپس اندوسیتوز وابسته به گیرنده که به این ترتیب ویروس وارد سلول میزبان می‌شود.

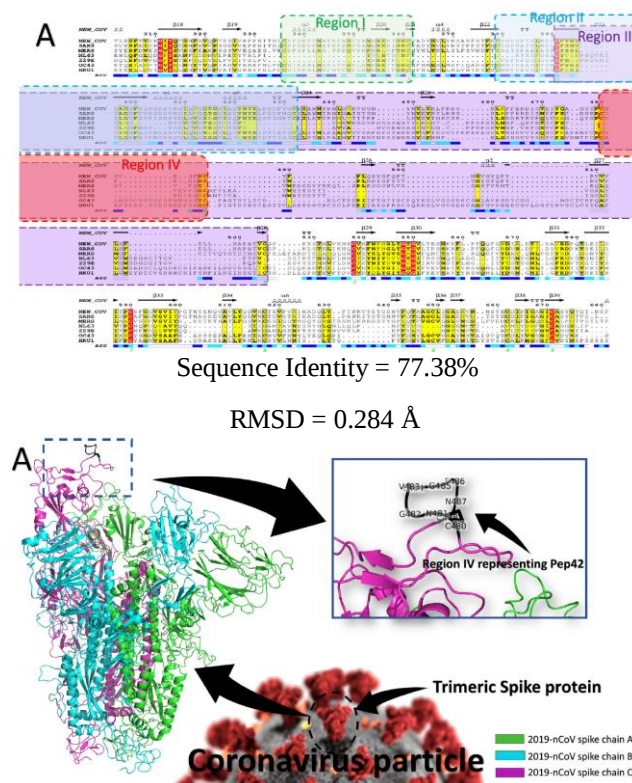
۲. ترجمه RNA ویروس و بیان پروتئین‌های آن توسط ریبوزوم‌های سلول میزبان.

۳. پروتئولیز پروتئین‌ها و پپتیدهای ساخته‌شده.

۴. ترجمه و همانندسازی RNA.

۵- بسته‌بندی مجدد پروتئین‌ها و ماده ژنتیکی ویروس.

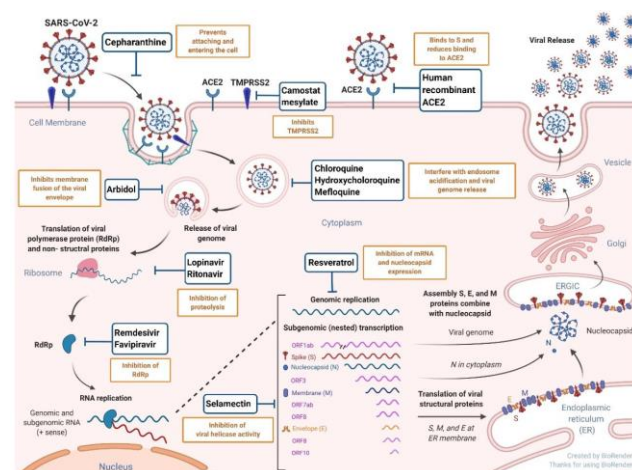
به پروتئین تانخورده (Unfolded protein response) است، وقتی که پروتئین‌های تانخورده یا غلط تاخورده تجمع پیدا می‌کنند. در این شرایط، GRP78 در لومن ER متصل و سه آنزیم (ATF6, PERK, and IRE1) دخیل در مرگ سلولی یا تمایز را غیرفعال می‌کند. اگر غلظت پروتئین‌های تانخورده خیلی زیاد باشد، GRP78 این آنزیم‌ها را آزاد و فعال می‌کند. نتیجه آن مهار ساخت پروتئین و تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها خواهد بود. در تنش‌ها، بیان GRP78 زیاد می‌شود که امکان فرار آن از ER و حضور در غشای سلول را فراهم می‌کند. وقتی GRP78 وارد غشاء شد، از طریق دمین اتصال به سوبسترا (Substrate-binding domain, SBD) می‌تواند به ویروس متصل شود و واسطه انتقال آن به داخل سلول باشد [۳۲].



شکل ۱۲. بررسی هم‌ترازی چندگانه توالی پروتئین‌های S در انواع ویروس‌های سارس و ساختار سه‌زنجیره‌ای پروتئین S در کوید-۱۹ [۳۲].

(A) تراز توالی چندگانه تمام پروتئین‌های S در سوش‌های مختلف کروناویروس که تاکنون گزارش شده است. هم‌ترازی با استفاده از وب سرور کلاستال امگا انجام و با نرم‌افزار ای اسپریت

۶- رهاسازی ویروس جدید با مکانیزم آگزوسیتوز به خارج سلول.



شکل ۱۳. چرخه حیات کوید-۱۹ در میزبان. اتصال، ورود و چرخه همانندسازی SARS-CoV-2 در سلول‌های اپی تلیال و اثر مواد ضدویروس [۳۴].

همان‌طور که در شکل ۱۳ نشان داده شده است، اتصال پروتئین S از ویروس به آنزیم ACE2 باعث اندوسیتوز ویروس به درون سلول میزبان می‌شود. ورود به سلول به اتصال پروتئین S به گیرنده‌های سلولی و عملکرد سرین پروتئاز تراغشایی TMPRSS2 بستگی دارد. سفارانتین که یک ACE2 نو ترکیب انسانی است و کاموستال مسیلات مهارکننده‌های ورود ویروس هستند که از اتصال پروتئین S به ACE2 و آغاز ورود مانع می‌کند. در مرحله پوشش، ویرون توسط مکانیزم اندوسیتوز وابسته به گیرنده که با pH پائین اندوزوم هم‌جوشی غشاهای ویروس و اندوزوم شروع می‌شود و سپس تک-رشته RNA در سیتوپلاسم آزاد می‌شود. آربیدل مهارکننده هم‌جوشی غشای ویروس و سلول میزبان است. کلراکونین، هیدروکسی کلراکونین و مفلوکونین با اسیدی شدن اندوزوم و رها شدن ماده ژنتیکی تداخل دارند. به نظر می‌رسد که این داروها در درمان کوید-۱۹ مؤثر باشند، ولی آزمایش‌های بالینی این فرضیه را ثابت نکرد. نسخه‌برداری از ژنوم ویروس توسط RdRp و تجزیه پروتئولیزی پلی پروتئین رپلیکاز و سپس پردازش پروتئین‌های ترجمه‌شده صورت انجام می‌گیرد. لویپیناویر و ریتاناویر مانع پروتئولیز، رمدسیویر و فاویپیراویر

مهارکننده‌های فعالیت RdRp هستند. پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری از جمله پروتئین‌های نوکلئوکپسید به صورت تحت ژنومی RNAs بیان می‌شوند. سلامکتین هم به‌عنوان مهارکننده فعالیت هلیکاز پیشنهاد شده است و رزوراترول نیز که از انگور قرمز به دست آمده است احتمالاً سنتز mRNA ویروس، و بیان پروتئین‌های نوکلئوکپسید را مهار می‌کند. تجمع و جوانه‌زدن پروتئین‌های ویروس و نوکلئوکپسید در غشاهای اندوپلاسمیک رتیکولوم (ER)، بخش‌های مابین ER-گلژی (ERGIC) یا در کمپلکس گلژی اتفاق می‌افتد. در نهایت، ویرون جدید SARS-CoV-2 از طریق آگزوسیتوز رها می‌شود.

داروهای پیشنهادی بر اساس مکانیزم عمل ویروس کوید-۱۹

به خاطر اهمیت حیاتی گلیکوپروتئین S در انتقال ویروس، این گلیکوپروتئین هدفی مهم برای خنثی‌شدن توسط آنتی‌بادی‌ها و هدف اصلی برای طراحی و توسعه دارو علیه این ویروس است [۳۵، ۷]. آنتی‌بادی‌ها و ملکول‌های کوچک علیه هر دو زیرواحد S1 و S2 به‌منظور مهار ورود این ویروس به سلول میزبان مطالعه و گزارش شده‌اند [۳۵-۳۹]. به خاطر درصد یکسانی زیاد بین توالی آمینواسیدی در زیرواحد S2 کروناویروس‌ها، به نظر می‌رسد که پیشنهاد درمان اختصاصی براساس این زیرواحد (S2-specific therapies) برای درمان محدوده وسیع‌تری از عفونت‌های ویروسی مؤثر باشد [۳۸، ۴۰].

برخی از این داروها و با تأکید بر مکانیزم عمل در شکل ۱۳ نشان داده شد. این داروها به‌طور اختصاصی مرحله خاصی از ورود، تکثیر و عفونت‌زایی آن را هدف قرار می‌دهد و مهار می‌کنند. به هر حال، به‌رغم استفاده از دسته وسیعی از داروها که به نظر می‌رسد بتوانند مفید باشند، هنوز داروی مؤثری برای از بین بردن کوید-۱۹ شناخته نشده است. بنابراین، با توجه به اهمیت مواد طبیعی و داروهای که بر اساس طب سنتی به‌عنوان درمان مکمل یا مؤثر در پیشگیری از کوید-۱۹ مطرح شده‌اند، در اینجا به برخی از این ترکیبات طبیعی را که بر اساس مکانیزم عمل یا تأثیرات ساختاری مفید به نظر می‌رسند، معرفی می‌کنیم.

جستجو در مواد فعال طبیعی به منظور مهار کوید-۱۹

یافتن ترکیب طبیعی با خاصیت ضدویروسی موثر در میان انبوهی از ترکیبات و عصاره‌های موثر گیاهی/طبیعی همانند یافتن سوزن در انبار کاه است. با این حال، در مدت زمانی که از ظهور انواع کروناویروس می‌گذرد، مطالعات متعددی به منظور غربالگری ترکیبات طبیعی با استفاده از مدل‌سازی رایانه‌ای [۴۱-۴۵] یا آزمایش‌های تجربی روی مدل‌های حیوانی و حتی انسان انجام و گزارش شده است. به طور معمول، در مدل‌های رایانه‌ای انرژی آزاد اتصال بین لیگاند و گیرنده را بررسی و تعیین می‌کنند [۴۶]. انرژی آزاد اتصال کمتر، پیوند قوی‌تر بین لیگاند و گیرنده را نشان می‌دهد. اگرچه به‌دست‌آوردن نتایج نامتناقض و تکرارپذیر از طریق روش‌های مختلف مدل‌سازی چالش برانگیز است، با وجود این، مدل‌سازی رایانه‌ای امکان مقایسه تمایل نسبی اتصال تعدادی از ملکول‌ها با گیرنده مورد نظر را فراهم می‌کند [۴۷]. در این روش‌ها، علاوه بر کاهش هزینه‌های آزمایش‌های تجربی و مدت زمان غربالگری فیزیکی (واقعی) تعداد زیادی از ترکیبات یا عصاره‌های گیاهی بررسی می‌شوند؛ که سرعت و تطبیق‌پذیری آن ممکن است برای پیدا کردن سریع یک مهارکننده قوی ویروس SARS-CoV-2 ارزش باشد [۴۸]. پروتئین‌های هدف در ساختار این ویروس که برای این مطالعات انتخاب شده‌اند، بیشتر پروتئین S، RNA پلیمرز وابسته به RNA یا RdRp، پروتئاز شبه کیموتریپسین (3-3CL^{pro}) و Chymotrypsin-like cysteine protease و پروتئاز شبه پاپائین (PL^{pro}) بوده‌اند. معمولاً، ترکیباتی که از طریق این روش مشخص می‌شوند، می‌توانند با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی مبتنی بر سلول، برای بررسی اثرات برون‌تنی و سمیت، قبل از آزمایش‌های حیوانی و بالینی ارزیابی بیشتری شوند.

شایان ذکر است که 3CL^{pro} [۴۹] و PL^{pro} [۵۰-۵۲] آنزیم‌هایی از خانواده سیستمین پروتئازها در این ویروس هستند که همانندسازی آن را کنترل می‌کنند و برای چرخه حیات آن ضروری هستند. بنابراین، این پروتئازها هدفی برای روش‌های درمانی SARS و MERS و همچنین کوید-۱۹ هستند، تا با مهار آنها بتوان جلوی تکثیر این ویروس‌ها را گرفت. با توجه به اینکه نقش آنزیم روکیناز (Rho kinase) و مسیر سیگنالینگ رو/راک در عفونت‌های ویروسی

به آسیب ریوی شناخته‌شده منجر است، بنابراین بررسی نقش مهارکننده‌های روکیناز در عفونت ویروسی کوید-۱۹ پیشنهاد شده است [۵۳].

به نقش لیپیداها که در ساختار غشای این ویروس دخیل هستند و در اتصال آن به سلول میزبان اهمیت دارند، نیز توجه شده و نیز پیشنهاد شده که با کاهش سنتز آنها شاید بتوان ساخت ویروس جدید را مهار کرد [۵۴]. به نقش استاتین‌ها نیز که مهارکننده سنتز کلسترول هستند در مهار تکثیر این ویروس توجه و پیشنهاد بررسی اثر مهاری آن بر مویید-۱۹ داده شده است [۵۵].

با توجه به اینکه بیماران مبتلا به کوید-۱۹ تب و درد زیادی دارند، معمولاً مصرف استامینوفن برای ایشان تجویز می‌شود. از عوارض مصرف درازمدت استامینوفن نیز مشکلات انعقادی و خونریزی مغزی عنوان شده است. مکانیزم این اثر، مهار آنزیم ویتامین K اپوکسی‌دردوکتاز توسط استامینوفن و متابولیت اصلی آن است. اخیراً، در یک مطالعه بیوانفورماتیکی، ما میان‌کنش این آنزیم را با استامینوفن، متابولیت اصلی آن، و ان-استیل سیستمین بررسی کردیم. نتایج نشان داد که متابولیت اصلی استامینوفن و ان-استیل سیستمین قویاً به آنزیم متصل می‌شوند و عملکرد ویتامین K در ممانعت از خونریزی را مهار می‌کنند. بنابراین، مصرف درازمدت استامینوفن در بیماران کوید-۱۹ به‌عنوان مکانیزمی برای عوارض و مشکلات انعقادی و خونریزی در این بیماران پیشنهاد شد [۵۶].

لانگ و همکاران در سال ۲۰۲۰، ۸۳ ترکیبی از داروهای سنتی چینی را که در برابر RdRp در کوید-۱۹ فعالیت دارند غربالگری کردند. از بین این ترکیبات، تی‌فلاوین (Theaflavin) که یک آنتی‌اکسیدان پلی‌فنلی است، به‌عنوان مهارکننده بالقوه پیشنهاد شد [۵۷]. به همین ترتیب، ژانگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ تقریباً ۱۱۵ ترکیب موجود در داروهای سنتی چینی را غربالگری و ۱۳ مورد را برای مطالعات بیشتر مشخص کردند [۴۵]. تعدادی از این ترکیبات پلی‌فنلی/فلاونوئیدی مانند کوئرسیتین (Quercetin) و کمفرول (Kaempferol) که در بیماری‌های دیگر هم توجه زیادی به آنها شده بود [۵۸-۶۰] در اینجا نیز به آنها توجه شد. پاندی و همکاران نیز در سال ۲۰۲۰ با استفاده از مطالعات داکینگ و اندازه‌گیری انرژی آزاد، میان‌کنش پروتئین S را با فلاونوئیدها و ترکیبات غیر

scipionum و سیر یافت می شود [۶۶]. سوتلارین از گیاه بشقابی یا قاشقک (*Scutellaria baicalensis*) که به آن اسکالکپ چینی (*Chinese Skullcap*) هم می گویند، جداسازی می شود که به صورت سنتی علاوه بر استفاده های دیگر، در درمان التهاب و عفونت های تنفسی استفاده می شود [۶۷]. این مطالعه نشان داد که هر دو این ترکیبات از فعالیت آنزیم هلیکاز SARS-CoV (nsP13) از طریق مهار فعالیت ATPase عمل می کنند و مستقیماً این آنزیم را مهار نمی کنند.

به طور کلی، فرآورده های گیاهی / طبیعی دارای خاصیت ضدویروسی علیه این خانواده از ویروس ها را می توان به چند دسته زیر تقسیم بندی کرد، که عبارت اند از:

پلی فنل ها / فلاونوئیدها

همان طور که در بالا نیز اشاره شد، پلی فنل ها خانواده ای از مواد مؤثره جدا شده از گیاهان دارویی با فعالیت ضدویروسی هستند (شکل ۱). برای مثال IC50 کوثرستین علیه SARS-CoV برابر ۳/۲ ± ۸/۶ میکرومولار و مهارکننده PL^{pro} است [۶۸]. کوثرستین یک فلاونوئید است که در بسیاری از غذاها و به مقدار زیاد در انواع توت ها و گیاهان خاص یافت می شود [۶۹، ۷۰]. همچنین، شباهت ساختاری دو ترکیب میرستین و سوتلارین عامل فعالیت و ویژگی مهارکنندگی آنها در برابر آنزیم هلیکاز در SARS-CoV است [۷۱].

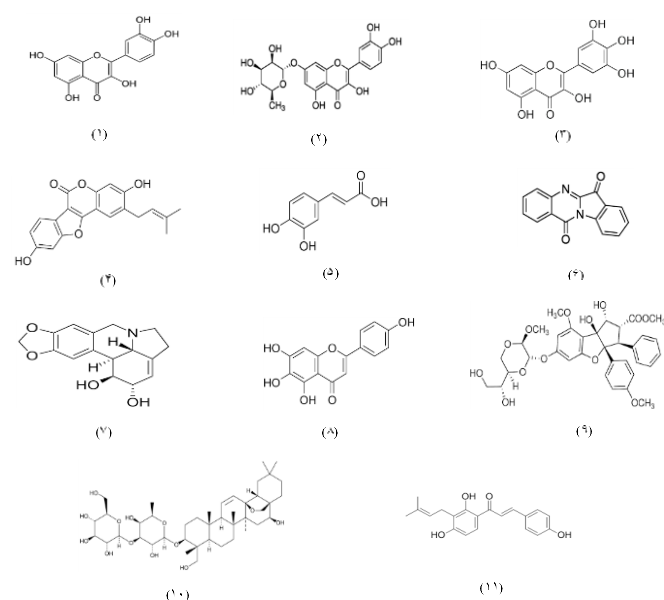
عصاره اتانولی به دست آمده از دانه های بابچی یا باکوچی (*Psoralea corylifolia*) حاوی ترکیبات پلی فنلی است که فعالیت زیستی علیه SARS-CoV PL^{pro} دارد [۷۲]. علاوه بر این، شش ترکیب شیمیایی گیاهی جدا شده از عصاره اتانولی که به عنوان باواچنینین (*Bavachinin*)، نئوباواچینوفلاون (*Neobavaisoflavone*)، ایزوباواچالکون (*Isobavachalcone*)، ۴-اومیتیل باواچالکون (*4'-O-(Methylbavachalcone)*)، سورالیدین (*Psoralidin*) و کورلیفول A (*Corylifol A*) دارای فعالیت ضدویروسی با مقادیر IC50 بین ۳/۸ - ۴/۲ میکرومول هستند. ایزوباواچالکون و سورالیدین بیشترین فعالیت ضد ویروس را نشان دادند، و مخلوط هر دو اینها، مهارکننده برگشت پذیر PL^{pro} از طریق

فلاونوئیدی گیاهی بررسی کردند و نشان دادند که فisetin (*Fisetin*)، کوثرستین و کمفرول تمایل زیادی برای اتصال به این پروتئین و مهار احتمالی ویروس دارند [۶۱]. در همین سال نقش مهاری دسته-ای از مواد شیمیایی گیاهی (*Phytochemical*) بر پروتئاز اصلی (*Main protease* (M^{pro}) کوید-۱۹ بررسی شد. نتایج نشان داد که اورسلیک اسید (*Ursolic acid*)، کارواکرال (*Carvacrol*) و اولئولیک اسید (*Oleanolic acid*) می توانند مهارکننده های این پروتئاز باشند [۶۲]. همچنین مطالعات داکینگ (*Docking*) برای ترکیبات دیگری با فعالیت بالقوه ضدویروسی مانند سابادینین (*Sabadinine*) و اورانتیامید (*Aurantiamide*) به منظور بررسی میان کنش با پروتئین های کلیدی در مهار ویروس SARS بررسی شد [۴۱، ۴۳، ۴۴].

در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۵ بیش از ۲۰۰ عصاره اتانول / کلروفرم گیاهان دارویی چینی را بررسی شد و تنها چهار مورد (*Lycoris radiata*، *Artemista annua*، *Pyrrosia lingua* و *Lindera aggregate*) با فعالیت ضدویروسی متوسط تا زیاد شناسایی شدند. از این تعداد، ترکیب لیکورین (*Lycorine*) از یک گونه گیاهی (*L. radiata*) به عنوان یک داروی بالقوه و کاندیدای ترکیب ضدویروس SARS-CoV مشخص شد. اثر ضد ویروسی لیکورین بسیار بالا بود (دارای EC50 ۱/۲ ± ۱۵/۷ نانومول) [۶۳]. البته لیکورین می تواند در مقادیر دوز کم (حدود ۱ میلی گرم در کیلوگرم در سگ ها) اثرات سمی ایجاد کند [۶۴]. از این رو، احتیاط بیشتر برای توسعه این ترکیب به عنوان داروی کاندیدای ضدویروس لازم است.

یو و همکاران در سال ۲۰۱۲ فعالیت یک کتابخانه متشکل از ۶۴ ترکیب طبیعی را در برابر آنزیم هلیکاز ویروس SARS-CoV، که در تکثیر ژنوم ویروسی، رونویسی و ترجمه نقش کلیدی دارد، بررسی کردند. ترکیبات پلی فنولی سوتلارین (*Scutellarein*) و مایرستین (*Myricetin*) به عنوان مؤثرترین ترکیبات ضدویروس (با مقادیر IC50 به ترتیب ۰/۱۹ ± ۲/۷۱ و ۰/۴۸ ± ۰/۸۶) مشخص شد. این ترکیبات روی سلول های طبیعی اپی تلیال پستان تأثیری نداشتند. مایرستین با غلظت بالا در میوه های مانند زغال اخته (*Cranberry*) [۶۵] و همچنین در گیاهانی مانند *Calamus*

مطالعه انجام شده، در ۵۰٪ موارد در روش‌های استخراج مواد فعال ضدکروناویروس از اتانول یا ترکیب اتانول/آب استفاده شده است. به دنبال آن، متانول یا ترکیب متانول/آب (۲۷٪) بیشترین مورد را داشته است. بیشتر از ۱۷٪ از مقالات از روشی استفاده کرده‌اند که استخراج ماده فعال فقط با آب انجام شده و فقط در سه مقاله از حلال‌های نسبتاً غیرقطبی (دی‌آمینوپروپان، کلروفرم و استون) استفاده کرده‌اند. این یافته با تحقیقات گسترده‌ای که نشان می‌دهد عصاره‌های نسبتاً قطبی عموماً سطحی بالاتر از ترکیبات فعال زیستی و آنتی‌میکروبی را در مقایسه با حلال‌های غیرقطبی در خود حل می‌کنند، هماهنگی دارد [۸۴-۸۶]. این یافته‌ها ممکن است نشان‌دهنده افزایش فعالیت زیستی ترکیبات گلیکوزیده بسیار قطبی باشد که با تفاوت زیاد در فعالیت آنتی‌ویروسی مشاهده شده میان کوئرستین و کوئرستین-۷-رامنوزید تطابق دارد [۸۷].



شکل ۱۴. ساختار برخی ترکیبات طبیعی که فعالیت ضدویروسی مناسبی از خود نشان داده‌اند. (۱) کوئرستین (۲) کوئرستین-۷-رامنوزید (۳) مایرستین (۴) سورالیدین (۵) اسید کافئیک (۶) تربیتانتین (۷) لایکورین (۸) اسکاتالارین (۹) سیلوسترول (۱۰) سایکوساپونین (۱۱) ایزوبواچالکون [۸۸].

اهمیت سویه‌های ویروسی

همان‌طور که در بخش‌های قبلی نیز اشاره شد، تفاوت در اثربخشی درمان‌ها، به‌ویژه درمان‌های طبیعی بین گونه/سویه‌های مختلف

مکانیسم نوع I، یعنی ترجیحاً اتصال به آنزیم آزاد به جای کمپلکس آنزیم-سوبسترا، عمل می‌کند [۷۲].

همچنین، پلی‌فنل‌های موجود در چای و سایر گیاهان دارویی در مهار این ویروس مؤثر تشخیص داده شد و مکانیزم اثر آنها مهار پروتئین‌های اصلی (M^{pro}) بیان شده است [۷۳-۷۷].

لکترین‌ها

لکترین‌های گیاهی، پروتئین‌هایی هستند که می‌توانند به طور مشخص و برگشت‌پذیر به گروه‌های کربوهیدرات متصل شوند [۷۸]. اینها گروهی از مواد مؤثره طبیعی هستند که ممکن است SARS-CoV را مهار کنند. لکترین‌ها فعالیت خوبی علیه ویروس‌هایی مانند ویروس آنفلوآنزا، ویروس تبخال سیمپلکس (Herpes simplex virus) [۷۹] و همچنین ویروس ابولا نشان داده‌اند [۸۰]. نکته مهم، افزایش سطح پلاسمایی لکترین متصل به مانوز نوترکیب انسانی در موش‌ها است که این امکان را فراهم کرده که موش در برابر عفونت کشنده ویروس ابولا زنده بماند [۸۱]. کیارتس و همکاران [۸۲] فعالیت طیف گسترده‌ای از لکترین‌های گیاهی (در مجموع ۳۳ مورد) را در برابر SARS-CoV با استفاده از اثر سیتوپاتی (CPE assay) بررسی کردند و مقدار $EC_{50} \pm 0.08$ میکروگرم/میلی‌لیتر را برای لیکورین رادیاتا یافتند. اگرچه مکانیسم دقیق عمل آن مشخص نشده است، اما فعالیت آن در مرحله اتصال ویروس یا در پایان چرخه آلودگی ویروسی به‌عنوان محتمل‌ترین عملکرد این ترکیب فرض شد. در آزمایش‌های بالینی، دیگر لکترین‌ها سطح تحمل منطقی و خوبی در برابر ویروس از خود نشان دادند [۸۳]. از این‌رو، با آزمایش‌های بیشتر، ممکن است این ترکیبات را مؤثرترین کلاس‌های مشتقات طبیعی در درمان SARS-CoV-2 و عفونت‌های دیگر خانواده کروناویروس یافت.

ترکیبات قطبی

مهار کروناویروس با استفاده از ترکیبات شیمیایی قطبی که برخی از آنها در شکل ۱۴ نمایش داده شد، نیز گزارش شده است. از ۳۰

دیگری از آنتی‌ویروس‌های مهم هستند. برای مثال، عصاره *Cinnamomo sp.* مسیر اندوسیتوز وابسته به کلاترین را مهار می‌کند، بنابراین از ورود ویروس به سلول میزبان جلوگیری می‌کند [۹۱]. دیگر ترکیبات آنتی‌ویروس که سلول میزبان را هدف قرار می‌دهند ممکن است پاسخ سیستم ایمنی را تحریک کنند [۹۲]. مطالعات وسیع‌تری در این زمینه به طریق تئوری یا تجربه آزمایشگاهی در جریان است.

نتیجه‌گیری

سویه‌های کروناویروس مسئول عوارض شدید بیماری در دامنه وسیعی از حیوانات اهلی و خانگی است ولی ویروس جدید SARS-CoV-2 اپیدمی جهانی پیدا کرده و نه تنها باعث مرگ و میر بسیار زیادی در بسیاری از کشورها شده، بلکه به سقوط عمده اقتصاد جهانی نیز منجر شده است. طبیعت ژنتیکی کروناویروس با انطباق و جهش‌های زیاد همراه است، که چالش زیادی در توسعه و تولید واکسن، دارو یا عوامل درمانی جدید ایجاد می‌کند. از این‌رو، شناخت مکانیزم عمل این ویروس، گیرنده‌های آن و بافت‌های درگیر با آن، کمک بسیار زیادی در جهت کاوش و پیگیری روش‌های جایگزین برای کنترل این ویروس خواهد بود. این ویروس عملکرد بسیار پیچیده‌ای دارد. نه تنها می‌تواند به آنزیم تبدیل‌کننده آنزیماتازین به عنوان یک گیرنده سطحی حاضر در چندین بافت متصل بشود، بلکه از طریق اتصال به سایر پروتئین‌ها و گیرنده‌های سطح سلولی مثل CD147 یا GRP78 نیز می‌تواند عمل کند. بنابراین مطالعات بیشتری برای بررسی ساختار و مکانیزم عمل آن، جهت طراحی و ساخت داروی مؤثر و اختصاصی مورد نیاز هست. بر اساس شناختی که تاکنون به دست آمده، داروهایی پیشنهاد شده‌اند که متأسفانه برخی از آنها اثر چندانی در کنترل بیماری کوید-۱۹ نداشتند و هنوز داروی کاملاً مؤثری برای کنترل کامل ورود، تکثیر یا روند خروج آن از سلول و جلوگیری از عفونت‌زایی آن شناخته نشده است. ترکیبات طبیعی، به‌ویژه مواد مؤثره گیاهی که بر طیف وسیعی از پاتوژن‌های ویروسی اثر دارند، می‌توانند بر این ویروس نیز مؤثر باشند. بنابراین، مطالعات وسیعی برای استفاده از ترکیبات طبیعی/گیاهی

کروناویروس مشاهده شده که دلیل آن تفاوت‌های ساختاری آنهاست. برای مثال پارک و همکارانش [۶۸] دریافتند که ترکیب ۳- (۳-متیل‌بوت-۲-انیل)-۴،۷،۳-تری‌هیدروکسیل فلاوان که از *Broussonetia papyrifera* جداسازی شده است، به خوبی PL^{pro} را در SARS-CoV (با IC_{50} برابر $1/6 \pm 3/7$ میکرومولار) مهار می‌کند در صورتی که عملکرد خوبی در برابر MERS-CoV نداشته است. متقابلاً، ترکیبات پلی‌فنلی کازینول و برو سوچالکون A جدا شده از گونه‌های مشابه، اثربخشی بهتری در مقابل PL^{pro} ویروس MERS-CoV داشته‌اند. به همین ترتیب، اوکفی و همکاران در سال ۲۰۱۰ دریافتند که اثربخشی ترکیبات گریفیسین در مقابل SARS-CoV برای سویه‌های Urbani و Tor-II بالاترین میزان (EC_{50} برابر $0/61$ میکروگرم/میلی‌لیتر) و برای سویه کمترین میزان Frank (EC_{50} برابر $1/19$ میکروگرم/میلی‌لیتر) بوده است. گریفیسین از یک نوع جلبک (*Griffithsia sp.*) جداسازی شده و یک لکترین دارای سه دمین اتصالی به کربوهیدرات بزرگ است که به صورت یک مثلث جهت‌گیری کرده است و اتصال چندتایی را برای این ترکیب امکان‌پذیر کرده است [۸۹]. اگرچه، دلیل این تفاوت‌ها توسط این گروه تحقیقاتی مشخص نشده، اما ممکن است به دلیل تفاوت ژنومی و در نتیجه تفاوت در توالی آمینواسیدهای پروتئین‌های S بین سویه‌های SARS-CoV باشد که منجر به میان‌کنش چندگانه با دمین‌های اتصالی به کربوهیدرات می‌شود و در نهایت تمایل متفاوتی برای اتصال به پروتئین‌های S را در پی خواهد داشت. با این وجود این مطالعات، اهمیت آزمایش‌های برون‌تنی درمان‌های بالقوه طبیعی (گیاهی) را بر روی SARS-CoV پیش از آزمایش‌های حیوانی و بالینی نشان می‌دهد [۸۸].

اکثریت ترکیبات طبیعی در این مطالعه مروری، ترکیباتی بودند که مستقیماً خاصیت ضدویروسی دارند و از طریق مهار مستقیم ویروس، مانند مهار پروتئازها یا پروتئین‌های S عمل می‌کنند. برای مثال، سیلوسترول از تکثیر ویروس از طریق مهار اختصاصی RNA هلیکاز به عنوان بخشی از پروتئین eIF4A جلوگیری می‌کند [۹۰]، درحالی‌که گریفیسین مستقیماً به پروتئین S می‌چسبد و از ورود ویروس به سلول میزبان جلوگیری می‌کند [۸۹]. با این حال، ترکیبات ضدویروسی که میزبان را هدف قرار می‌دهند، دسته

16. Wang, Q., et al., Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, 2020.
17. Yan, R., et al., Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020. 367(6485): p. 1444-1448.
18. Zhang, H., et al., Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med*, 2020. 46(4): p. 586-590.
19. Letko, M., A. Marzi, and V. Munster, Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*, 2020. 5(4): p. 562-569.
20. Wrapp, D., et al., Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020. 367(6483): p. 1260-1263.
21. Hoffmann, M., et al., SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 2020. 181(2): p. 271-280 e8.
22. Shang, J., et al., Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, 2020.
23. Bosch, B.J., et al., Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(22): p. 8455-60.
24. Xia, S., et al., Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res*, 2020. 30(4): p. 343-355.
25. Vaarala, M.H., et al., Expression of transmembrane serine protease TMPRSS2 in mouse and human tissues. *J Pathol*, 2001. 193(1): p. 134-40.
26. Harrison, S.C., Viral membrane fusion. *Virology*, 2015. 479-480: p. 498-507.
27. Fan, X., et al., Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein. *Nat Commun*, 2020. 11(1): p. 3618.
28. Wang, K., et al., SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *BioRxiv*, 2020.
29. Zou, X., et al., Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*, 2020. 14(2): p. 185-192.
30. Li, M.Y., et al., Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty*, 2020. 9(1): p. 45.
31. Su, H. and Y. Yang, The roles of CyPA and CD147 in cardiac remodelling. *Experimental and molecular pathology*, 2018. 104(3): p. 222-226.
32. Ibrahim, I.M., et al., COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction. *J Infect*, 2020.
33. Kupferschmidt, K. and J. Cohen, Race to find COVID-19 treatments accelerates. *Science*, 2020. 367(6485): p. 1412-1413.
34. Riggioni, C., et al., A compendium answering 150 questions on COVID-19 and SARS-CoV-2. *Allergy*, 2020.
35. Du, L., et al., The spike protein of SARS-CoV-2 a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*, 2020. 18(3): p. 226-36.
36. Sui, J., et al., Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to

صورت گرفته است. اگرچه مصرف این ترکیبات به عنوان داروی مکمل موجب کاهش علائم شده است، یا اثر پیشگیری‌کنندگی در ابتلا و عفونت‌زایی داشته، ولی درمان کامل را در پی نداشته‌اند. با توجه به پیچیدگی‌های ساختاری این ویروس و جهش‌های سریع آن، مطالعات همه‌جانبه و وسیع‌تری مورد نیاز هست.

منابع

1. WHO, Q&A on coronaviruses (COVID-19). 2020.
2. Odega, K., et al., Safe Laboratory Practices in the Light of Covid-19 Pandemic: Way Forward in a Resource Limited Setting. 2020.
3. Shereen, M.A., et al., COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res*, 2020. 24: p. 91-98.
4. Han, Y. and P. Kral, Computational Design of ACE2-Based Peptide Inhibitors of SARS-CoV-2. *ACS Nano*, 2020.
5. Wu, C., et al., Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B*, 2020.
6. Anatomy of a killer. Understanding SARS-CoV-2 and the drugs that might lessen its power. 2020; Available from: <https://www.economist.com/briefing/2020/03/12/understanding-sars-cov-2-and-the-drugs-that-might-lessen-its-power>.
7. Lu, G., Q. Wang, and G.F. Gao, Bat-to-human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. *Trends Microbiol*, 2015. 23(8): p. 468-78.
8. Beniac, D.R., et al., Conformational reorganization of the SARS coronavirus spike following receptor binding: implications for membrane fusion. *PLoS One*, 2007. 2(10): p. e1082.
9. Belouzard, S., V.C. Chu, and G.R. Whittaker, Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(14): p. 5871-6.
10. Bosch, B.J., et al., The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*, 2003. 77(16): p. 8801-11.
11. Walls, A.C., et al., Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 2020. 181(2): p. 281-292 e6.
12. Lan, J., et al., Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 2020.
13. Xu, X., et al., Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Science China Life Sciences*, 2020. 63(3): p. 457-460.
14. Li, Y., et al., Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor. *Pharmacol Res*, 2020: p. 104833.
15. Qiu, Y., et al., Predicting the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) utilizing capability as the receptor of SARS-CoV-2. *Microbes Infect*, 2020.

54. Baglivo, M., et al., Natural small molecules as inhibitors of coronavirus lipid-dependent attachment to host cells: a possible strategy for reducing SARS-CoV-2 infectivity? *Acta Biomed*, 2020. 91(1): p. 161-164.
55. Bifulco, M. and P. Gazerro, Statins in coronavirus outbreak: It's time for experimental and clinical studies. *Pharmacol Res*, 2020. 156: p. 104803.
56. Hashemi, S.A. and S.Z. Bathaie, The in Silico Mechanism of hVKOR Interaction with Acetaminophen, its Metabolite, and N- Acetyl Cysteine; Caution on Application in COVID-19 Patients. Submitted., 2020.
57. Lung, J., et al., The potential chemical structure of anti-SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase. *J Med Virol*, 2020.
58. Cassidy, L., et al., Oxidative stress in alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complement Ther Med*, 2020. 49: p. 102294.
59. Khan, H., et al., Polyphenols in the treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 2019. 18(7): p. 647-657.
60. Tome-Carneiro, J. and F. Visioli, Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. *Phytomedicine*, 2016. 23(11): p. 1145-74.
61. Pandey, P., et al., Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: an in silico study for drug development. *J Biomol Struct Dyn*, 2020: p. 1-11.
62. Kumar, A., et al., Identification of phytochemical inhibitors against main protease of COVID-19 using molecular modeling approaches. *J Biomol Struct Dyn*, 2020: p. 1-11.
63. Li, S.Y., et al., Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Res*, 2005. 67(1): p. 18-23.
64. Kretzing, S., et al., Dose-dependent emetic effects of the Amaryllidaceous alkaloid lycorine in beagle dogs. *Toxicol*, 2011. 57(1): p. 117-24.
65. Hakkinen, S.H., et al., Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem*, 1999. 47(6): p. 2274-9.
66. Miesan, K.H. and S. Mohamed, Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem*, 2001. 49(6): p. 3106-12.
67. Zhao, Q., X.Y. Chen, and C. Martin, *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. *Sci Bull (Beijing)*, 2016. 61(18): p. 1391-1398.
68. Park, J.Y., et al., Evaluation of polyphenols from *Broussonetia papyrifera* as coronavirus protease inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017. 32(1): p. 504-515.
69. Justesen, U. and S. Knuthsen, Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food chemistry*, 2001. 73(2): p. 245-250.
70. Kaack, K. and T. Austed, Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods Hum Nutr*, 1998. 52(3): p. 187-98.
71. Yu, M.S., et al., Identification of myricetin and scutellarein as novel chemical inhibitors of the SARS coronavirus helicase, nsP13. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012. 22(12): p. 4049-54.
72. Kim, D.W., et al., Phenolic phytochemical displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the seeds of S1 protein that blocks receptor association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(8): p. 2536-41.
37. Lip, K.M., et al., Monoclonal antibodies targeting the HR2 domain and the region immediately upstream of the HR2 of the S protein neutralize in vitro infection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, 2006. 80(2): p. 941-50.
38. Ng, O.W., et al., Substitution at aspartic acid 1128 in the SARS coronavirus spike glycoprotein mediates escape from a S2 domain-targeting neutralizing monoclonal antibody. *PLoS One*, 2014. 9(7): p. e102415.
39. Coughlin, M.M. and B.S. Prabhakar, Neutralizing human monoclonal antibodies to severe acute respiratory syndrome coronavirus: target, mechanism of action, and therapeutic potential. *Rev Med Virol*, 2012. 22(1): p. 2-17.
40. Elshabrawy, H.A., et al., Human monoclonal antibodies against highly conserved HR1 and HR2 domains of the SARS-CoV spike protein are more broadly neutralizing. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e50366.
41. Liu, B. and J. Zhou, SARS-CoV protease inhibitors design using virtual screening method from natural products libraries. *J Comput Chem*, 2005. 26(5): p. 484-90.
42. Lung, J., et al., The potential chemical structure of anti-SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase. *J Med Virol*, 2020. 92(6): p. 693-697.
43. Toney, J.H., et al., Sabadinine: a potential non-peptide anti-severe acute-respiratory-syndrome agent identified using structure-aided design. *J Med Chem*, 2004. 47(5): p. 1079-80.
44. Wang, S.Q., et al., Virtual screening for finding natural inhibitor against cathepsin-L for SARS therapy. *Amino Acids*, 2007. 33(1): p. 129-35.
45. Zhang, D.H., et al., In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus. *J Integr Med*, 2020. 18(2): p. 152-158.
46. Forli, S., et al., Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc*, 2016. 11(5): p. 905-19.
47. Aldeghi, M., et al., Accurate calculation of the absolute free energy of binding for drug molecules. *Chem Sci*, 2016. 7(1): p. 207-218.
48. Chen, Y., C. de Bruyn Kops, and J. Kirchmair, Data Resources for the Computer-Guided Discovery of Bioactive Natural Products. *J Chem Inf Model*, 2017. 57(9): p. 2099-2111.
49. Ul Qamar, M.T., et al., Structural basis of SARS-CoV-2 3CL(pro) and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *J Pharm Anal*, 2020.
50. Naidoo, D., et al., Cyanobacterial metabolites as promising drug leads against the M(pro) and PL(pro) of SARS-CoV-2: an in silico analysis. *J Biomol Struct Dyn*, 2020: p. 1-13.
51. Swaim, C.D., et al., 6-Thioguanine blocks SARS-CoV-2 replication by inhibition of PLpro protease activities. *bioRxiv*, 2020.
52. Rut, W., et al., Activity profiling and structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2-PLpro protease provides a framework for anti-COVID-19 drug design. *bioRxiv*, 2020.
53. Abedi, F., R. Rezaee, and G. Karimi, Plausibility of therapeutic effects of Rho kinase inhibitors against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (COVID-19). *Pharmacol Res*, 2020. 156: p. 104808.

83. Petersen, K.A., et al., Phase I safety, tolerability, and pharmacokinetic study of recombinant human mannan-binding lectin. *J Clin Immunol*, 2006. 26(5): p. 465-75.
84. Han, T., et al., Bioactivity-guided fractionation for anti-inflammatory and analgesic properties and constituents of *Xanthium strumarium* L. *Phytomedicine*, 2007. 14(12): p. 825-9.
85. Tian, F., et al., Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food chemistry*, 2009. 113(1): p. 173-179.
86. Wigmore, S.M., M. Naiker, and D.C. Bean, Antimicrobial Activity of Extracts from Native Plants of Temperate Australia. *Pharmacognosy Communications*, 2016. 6(2).
87. Choi, H.J., et al., Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Res*, 2009. 81(1): p. 77-81.
88. Mani, J.S., et al., Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses: A review. *Virus Res*, 2020. 284: p. 197989.
89. O'Keefe, B.R., et al., Broad-spectrum in vitro activity and in vivo efficacy of the antiviral protein griffithsin against emerging viruses of the family Coronaviridae. *J Virol*, 2010. 84(5): p. 2511-21.
90. Muller, C., et al., Broad-spectrum antiviral activity of the eIF4A inhibitor silvestrol against corona- and picornaviruses. *Antiviral Res*, 2018. 150: p. 123-129.
91. Zhuang, M., et al., Procyanidins and butanol extract of *Cinnamomi Cortex* inhibit SARS-CoV infection. *Antiviral Res*, 2009. 82(1): p. 73-81.
92. Lau, K.M., et al., Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata*. *J Ethnopharmacol*, 2008. 118(1): p. 79-85.
- Psoralea corylifolia. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2014. 29(1): p. 59-63.
73. Yang, K.S., et al., A Speedy Route to Multiple Highly Potent SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *bioRxiv*, 2020.
74. Ghosh, R., et al., Identification of polyphenols from *Broussonetia papyrifera* as SARS CoV-2 main protease inhibitors using in silico docking and molecular dynamics simulation approaches. *J Biomol Struct Dyn*, 2020: p. 1-14.
75. Mohammad, T., et al., Identification of high-affinity inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: Towards the development of effective COVID-19 therapy. *Virus Res*, 2020. 288: p. 198102.
76. Fiorucci, D., et al., Computational drug repurposing for the identification of SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *J Biomol Struct Dyn*, 2020: p. 1-7.
77. Bhardwaj, V.K., et al., Identification of bioactive molecules from tea plant as SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *J Biomol Struct Dyn*, 2020: p. 1-10.
78. Mitchell, C.A., K. Ramessar, and B.R. O'Keefe, Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. *Antiviral Res*, 2017. 142: p. 37-54.
79. Hwang, H.J., et al., Characterization of a Novel Mannose-Binding Lectin with Antiviral Activities from Red Alga, *Grateloupia chiangii*. *Biomolecules*, 2020. 10(2).
80. Coves-Datson, E.M., et al., Inhibition of Ebola Virus by a Molecularly Engineered Banana Lectin. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019. 13(7): p. e0007595.
81. Michelow, I.C., et al., High-dose mannose-binding lectin therapy for Ebola virus infection. *J Infect Dis*, 2011. 203(2): p. 175-9.
82. Keyaerts, E., et al., Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antiviral Res*, 2007. 75(3): p. 179-87.