

## Nowości bibliograficzne

Pandemia COVID-19 sprawiła, że naukowcy z całego świata zaangażowali się w poszukiwanie skutecznych leków, też jako alternatywy dla szczepień. Poza próbami znalezienia nowych substancji, które sprawdziłyby się w tej roli, rozważane jest wykorzystanie już istniejących leków przeznaczonych do leczenia innych chorób. Okazuje się, że pomocne w tym drugim przypadku mogą być komputerowe symulacje interakcji różnych leków z SARS-CoV-2, czyli wirusem wywołującym COVID-19. Jedną z najpopularniejszych metod w dziedzinie komputerowego wspomaganie projektowania leków (CADD) i do identyfikacji potencjalnych leków jest dokowanie molekularne, pozwalające na szybkie analizowanie dużej liczby leków, oszczędzając w ten sposób ogromną ilość energii, czasu i kosztów. Chociaż badanych jest szereg leków syntetycznych, to związki naturalne obecne w roślinach mają tę przewagę, że wykazują wielokierunkową aktywność i są bezpieczne w stosowaniu. Spośród flawonoidów duży potencjał przeciw wirusowi wywołującemu COVID-19 ma rutyna, szeroko występująca w roślinach, stosowana też w lecznictwie. Rutyna hamuje szereg białek niezbędnych wirusowi do wnikięcia do komórki gospodarza i wywołania infekcji.

### **Glikozydy flawonoidowe w sposób strukturozależny hamują SARS-CoV-2 Mpro, co może być brane pod uwagę jako cel molekularny do powstrzymania rozprzestrzeniania się wirusa**

*Cherrak S.A., Merzouk H., Mokhtari Soulimane N. Potential bioactive glycosylated flavonoids as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: A molecular docking and simulation studies. PLoS ONE (2020), 15(10), e0240653.*

Odkrycie leku, który ograniczyłby rozprzestrzenianie się wirusa SARS-CoV-2, jest jednym z największych wyzwań stojących ostatnio przed ludzkością. Wirusy mają zdolność do szybkiej adaptacji i mutacji, co zmusza do poszukiwań coraz to nowych strategii terapeutycznych, aby przerwać cykl życiowy wirusa (blokowanie cyklu życiowego wirusa lub utrudnianie fuzji z błoną).

Znanych jest kilka flawonoidów, które uniemożliwiają proliferację wirusa przez hamowanie jego namnażania albo przez blokowanie wejścia do komórek gospodarza. Naturalnymi związkami o potencjalnym działaniu anty-SARS-CoV-2, poprzez zdolność wiązania się z receptorem ACE2, są: bajkalina, scutelaryna, hesperetyna, nikotianamina i glicyryzyna. Ponadto stwierdzono, że kwercetyna, daidzeina, pueraryna, epigallokatechina, galusan epigallokatechiny, galusan galokatechiny i kemferol hamują aktywność proteolityczną hydrolazy SARS-CoV 3CL. Nieustannie trwają prace przy użyciu metod obliczeniowych lub badań eksperymentalnych nad znalezieniem struktur, które mogą zakłócać cykl życiowy wirusa.

Interesującą strategią braną pod uwagę jako cel molekularny do powstrzymania rozprzestrzeniania się wirusa jest główna proteaza (Mpro), a silne działanie hamujące SARS-CoV-2 Mpro wykazują glikozydy flawonoidowe.

W pracy przeprowadzono badanie przesiewowe 38 związków (głównie flawonoidów), testując ich potencjalne działanie hamujące Mpro SARS-CoV-2, poprzez dokowanie molekularne i dynamikę molekularną (użyto oprogramowanie Autodock Vina, symulację dynamiki molekularnej prowadzono z pakietem GROMACS 2020 przy użyciu pola siłowego CHARMM36, zainstalowanego na systemie Linux). Uzyskane dane obliczeniowe sugerują, że zachodzą silne interakcje między flawonoidami z resztami cukrowymi i główną proteazą wirusa SARS-CoV-2. Wyniki te mogą stanowić obiecujący punkt wyjścia dla terapii przeciwwirusowych, które są alternatywą dla strategii szczepień.

Naturalne aglikony miały wysokie wyniki dokowania; z maksymalnym wynikiem uzyskanym dla pochodnej katechiny – EGCG przy  $-7,9$  kcal/mol<sup>-1</sup>, porównywalnym z wynikiem uzyskanym dla inhibitora N3 ko-kryształizowanego z proteazą (6LU7), stosowanego jako kontrola pozytywna ( $-7,5$  kcal/mol).

Trzy związki o najwyższym powinowactwie do miejsca aktywnego to 3-ramnozyd kwercetyny, 3-rutynozyd mirycetyny i rutyna o energiach wiązania odpowiednio  $-9,7$ ,  $-9,3$  i  $9,2$  kcal/mol<sup>-1</sup>, wyższych od uzyskanych dla inhibitora N3 ( $-7,5$  kcal/mol<sup>-1</sup>).

Spośród glikozydów flawonoidowych najwyższy wynik:  $-9,7 \text{ kcal/mol}^{-1}$  uzyskano dla 3-ramnozydu kwercetyny. Ważna też wydaje się pozycja wiązania cukru z aglikonem. Związki podstawione przy C-3 wykazują wyższe wyniki niż podstawione przy C-7. Dla genistyny, flawonoidu podstawionego w C-7, energia wiązania wynosi  $-7,5 \text{ kcal/mol}^{-1}$ , podczas gdy dla podstawionych w C-3 daticyny i hiperozydu:  $-8,2$ ,  $-8,4 \text{ kcal/mol}^{-1}$ . Na aktywność wpływa również charakter reszty cukrowej. Najaktywniejsze związki to flawonole, zawierające ramnozę lub rutynozę (6-O- $\alpha$ -L-ramnozylo- $\beta$ -D-glukoza) w pozycji C-3. 3-ramnozyd kwercetyny i 3-rutynozyd mirycetyny wiążą się z większą siłą niż daticyna, która w pozycji 3 jest podstawiona glukozą.

Główną niedogodnością w stosowaniu flawonoidów, jako naturalnych leków, jest ich niska biodostępność. Obecność reszt cukrowych zwykle zwiększa biodostępność odpowiedniego aglikonu flawonoidowego w zależności od charakteru podstawionego cukru. Wydaje się, że flawonoidy z glukozą wchłaniane są szybciej niż flawonoidy podstawione ramnozą, ramnoglukozą, rutynożą i neohesperydozą.

Przyjmuje się, że biodostępność glikozydów flawonoidowych jest osiągana przez część aglikonową w osoczu krwi, po odszczepieniu części cukrowej w wyniku hydrolizy enzymatycznej w przewodzie pokarmowym człowieka. Cząsteczki glukozy są łatwo hydrolizowane w komórkach nabłonka jelita cienkiego. Jednak brak ramnozydazy lub rutynozydazy w ludzkich komórkach sprawia, że biodostępność flawonoidów w dużej mierze zależy od ich hydrolizy przez bakterie jelitowe, jednak niewiele bakterii jelitowych może spowodować rozszczepienie tego typu wiązań.

Podsumowując, wiązanie flawonoidów w miejscu aktywnym proteazy jest wyraźnie strukturozależne; z większą siłą wiążą się flawonole mono- lub disacharydy podstawione w pozycji C-3, a najsilniejsze powinowactwo wiązania mają flawonoidy z ramnożą.

Flawonoidy podstawione ramnożą nieulegające żadnej lub niewielkiej modyfikacji w jelicie mogą być więc dobrym kandydatem w leczeniu infekcji koronawirusem SARS-CoV-2.

**Rutyna, składnik licznych preparatów ziołowych, hamuje główną proteazę (Mpro) wirusa SARS-CoV-2, co może być wykorzystane w leczeniu COVID-19, skuteczniejsze okazały się jej pochodne, szczególnie oznaczony przez autorów M2**

Huynh T., Wang H., Luan B. Structure-based lead optimization of herbal medicine rutin for inhibiting SARS-CoV-2's main protease. *Phys Chem Chem Phys* 2020, 22(43), 25335-25343.

Choroba COVID-19 wywołana koronawirusem SARS-CoV-2 spowodowała pandemię, a metody jej leczenia są ograniczone. W Chinach zakażonym pacjentom z łagodnymi lub umiarkowanymi objawami podawano różne tradycyjne ziołowe leki przeciwwirusowe, które okazały się skuteczne w kontrolowaniu choroby. Molekularne mechanizmy interakcji tych leków z wirusem SARS-CoV-2, powodującym COVID-19, nie są znane. Wiadomo jednak, że główna proteaza (Mpro) SARS-CoV-2 odgrywa ważną rolę w dojrzewaniu wielu białek wirusowych, takich jak polimeraza RNA zależna od RNA. Częstym składnikiem wielu tradycyjnych ziołowych leków przeciwwirusowych, takich jak Lianhuaqinwen i Shuanghuanlian, jest rutyna, która okazała się najlepszym kandydatem do hamowania Mpro. Wykorzystując metody *in silico* (dokowanie i symulacje dynamiki molekularnej), autorzy określili dynamikę i energię interakcji rutyny z Mpro SARS-CoV-2, które sugerują, że wysoce hydrofilowa cząsteczka rutyny może być związana wewnątrz kieszeni Mpro (miejsca aktywnego) i prawdopodobnie może hamować jej funkcje biologiczne. Ponadto autorzy zaprojektowali dwa kolejne hydrofobowe analogi rutyny, M1 i M2, które (szczególnie M2) mają znacznie silniejsze powinowactwo wiązania z Mpro SARS-CoV-2 niż rutyna, ze względu na zwiększone oddziaływanie hydrofobowe, a także większą liczbę wiązań wodorowych. Uzyskane wyniki dostarczają ważnych informacji na temat mechanizmu wiązania liganda wewnątrz Mpro i rzucają światło na przyszłe struktury oparte na modelu silnych inhibitorów SARS-CoV-2 Mpro.

**Rutyna, podobnie jak jej aglikon kwercetyna, jest silnym inhibitorem głównej proteazy wirusa SARS-CoV-2, 3CL-pro (Mpro)**

Rizzuti B., Grande F., Conforti F. i wsp. Rutin Is a Low Micromolar Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease 3CLpro: Implications for Drug Design of Quercetin Analogs. *Biomedicines* 2021, 9(4):375.

Pandemia spowodowana koronawirusem 2 (SARS-CoV-2) pobudziła do poszukiwania leków przeciwwirusowych do leczenia COVID-19, zespołu ostrej niewydolności oddechowej. Przewiduje się, że cząsteczki o znanej farmakokinetyce i już stosowane u ludzi nadają się do wykorzystania bezpośredniego lub jako substancje modelowe do projektowania leków przeciwwirusowych. Wiadomo, że kwercetyna jest silnym inhibitorem *in vitro* 3CLpro, głównej proteazy SARS-CoV-2, jednak jej niska biodostępność *in vivo*

wymaga modyfikacji struktury molekularnej. Problem ten może być rozwiązany poprzez zastosowanie jako modelu naturalnego flawonoidu – rutyny, który jest glikozydową pochodną kwercetyny. Łącząc techniki eksperymentalne (spektroskopia i kalorymetria) i symulacyjne (dokowanie i symulacje dynamiki molekularnej), autorzy wykazali, że część cukrowa nie utrudnia wiązania rutyny z 3CLpro, a rutyna zachowuje wysoką siłę działania (stała hamowania w niskim zakresie mikromolarnym,  $K_i = 11 \mu\text{M}$ ). Chociaż struktura chemiczna rutyny zakłóca pseudosymetrię, ma większą objętość przestrzenną i masę cząsteczkową oraz lepszą rozpuszczalność od kwercetyny, to jest zdolna do asocjacji w miejscu aktywnym 3CLpro, oddziałując z katalityczną diadą (His41/Cys145).

W porównaniu z kwercetyną 3-O-glikozyd kwercetyny ma wyższą biodostępność, a rutyna (3-O-rutynozyd kwercetyny, szeroko rozpowszechniona jako metabolit wtórny w roślinach) jest co najmniej dwukrotnie lepiej rozpuszczalna (130 mg/l).

Zarówno kwercetyna, jak i rutyna są składnikami wielu preparatów ziołowych i były szeroko badane pod kątem różnorodnych działań farmakologicznych, w tym właściwości przeciwwirusowych, przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych.

Wcześniej autorzy, stosując kombinację biofizycznych technik *in vitro*, wykazali, że kwercetyna ma zdolność hamowania głównej proteazy SARS-CoV-2 (Mpro = 3CLpro/proteaza podobna do 3C). 3CLpro stanowi doskonały cel farmakologiczny, ponieważ jest wysoce konserwatywna wśród różnych członków rodziny koronawirusów i żadna z ludzkich proteaz komórek gospodarza nie wykazała podobnej specyficzności. Białko to jest kluczowym składnikiem mechanizmu replikacji wirusa SARS-CoV-2, gdyż uczestniczy w przetwarzaniu poliprotein uzyskanych od komórek gospodarza, w celu wytworzenia wielu kluczowych białek wirusowych, w tym samego 3CLpro. Ponieważ kwercetyna została uznana jako najlepszy kandydat w eksperymentalnym programie badań przesiewowych związków, autorzy postanowili sprawdzić, czy obecność najczęściej występującej części cukrowej, naturalnie przyłączonej do kwercetyny, pozwala formie glikozydowej zachować kluczowe bioaktywne właściwości aglikonu.

Wyniki uzyskane przez autorów, dzięki połączeniu technik symulacyjnych i eksperymentalnych, pokazują, że rutyna wiąże się z kieszenią katalityczną 3CLpro i, podobnie jak jej macierzysty związek kwercetyna, oddziałuje z diadą reszt białkowych, odpowiedzialnych za katalityczną aktywność proteazy.

Identyfikacja i projektowanie związków przeciwwirusowych przeciwko SARS-CoV-2 ma ogromne

znaczenie jako jeden z głównych sposobów zmniejszenia wpływu COVID-19 na zdrowie publiczne. W szczególności hamowanie aktywności katalitycznej głównej proteazy 3CLpro (Mpro) jest jedną z najlepszych farmakologicznych strategii blokowania replikacji wirusa u dotkniętych chorobą pacjentów. Wysokie podobieństwo miejsca aktywnego między różnymi wariantami SARS-CoV-2 a także innymi koronawirusami sprawia, że podejście to jest szczególnie interesujące również w celu zmniejszenia częstości występowania obecnych i prawdopodobnie przyszłych zakażeń z powodu innych pokrewnych szczepów wirusów. Po uprzednio opisanej roli kwercetyny jako silnego inhibitora 3CLpro *in vitro* autorzy wykazali, że rutyna – jej glikozydowa forma – jest również skuteczna w tym zakresie i ma porównywalną siłę działania. Określenie działania przeciwwirusowego *in vivo* tego związku i ewentualnie jego pochodnych na ludzkie komórki da konkretną odpowiedź na możliwość bezpośredniego zastosowania jako środka leczniczego.

Jest to jeszcze jeden naturalny związek, potencjalnie aktywny przeciwko SARS-CoV-2, wykazujący dobrą tolerancję w stosowaniu u ludzi. Autorzy sugerują, że ze względu na obecność wielu grup hydroksylowych, umożliwiających ich łatwe podstawienie, istnieją duże możliwości modyfikacji kwercetyny/rutyny i zaprojektowania bardziej skutecznych analogów.

### **Rutyna jako inhibitor białek SARS-CoV-2 może być substancją modelową do opracowania leku do stosowania w COVID-19**

*Rahman F., Tabrez S., Ali R. i wsp. Molecular docking analysis of rutin reveals possible inhibition of SARS-CoV-2 vital proteins. J Tradit Complement Med 2021, 11(2), 173-179.*

Autorzy wykazali, że rutyna tworzy wiele interakcji, w tym konwencjonalne wiązania wodorowe, pi-siarkowe, pi-alkilowe i wiązania węgiel-wodór z resztami kieszeni wiążących substrat białek SARS-CoV-2. Te interakcje pomagają zablokować rutynę wewnątrz kieszeni wiążącej substrat, a tym samym skutecznie hamować białka SARS-CoV-2. Zarówno charakter wiązań, jak i właściwości terapeutyczne sprawiają, że rutyna jest wiodącym związkiem do opracowania potencjalnego inhibitora białek SARS-CoV-2: Mpro, RdRp, PLpro i proteiny S.

Proteaza Mpro jest wirusowi potrzebna, aby mógł replikować, a jej zahamowanie lub unieszkodliwienie prowadzi do zniszczenia wirusa. Okazało się, że składniki obecne w zielonej herbacie, skórce i nasionach

niektórych odmianach winogron w kakao i gorzkiej czekoladzie przyłączają się do różnych fragmentów kluczowej dla wirusa proteazy. Mpro ma część przypominającą kieszeń, która wypełnia się tymi substancjami, a kiedy zostanie zapełniona, proteaza traci swoją ważną funkcję.

Dzięki polimerazie RNA, zależnej od RNA (RdRp) wpływającej na tworzenie długich łańcuchów kwasów nukleinowych, koronawirus replikuje swój genom RNA. Ponieważ w ludzkim organizmie białko to nie występuje – polimeraza RDRp może być idealnym celem dla działania leku przeciw wirusowi wywołującemu COVID-19.

Jednym z głównych białek SARS-CoV-2 jest proteaza PLpro (proteaza podobna do papainy), odgrywająca kluczową rolę w replikacji wirusa poprzez wpływ

na przetwarzanie białek (zwiększa szybkość rozkładu białek na polipeptydy lub pojedyncze aminokwasy) i wpływająca na obniżenie odpowiedzi immunologicznej. Hamowanie aktywności PLpro stanowi więc ważną strategię terapeutyczną, a sam enzym – świetny cel dla potencjalnych substancji leczniczych.

Białko kolca S pełni kluczową rolę w zarażaniu komórek gospodarza, umożliwia wniknięcie wirusa do wnętrza komórki (interakcja z receptorem ACE2) i zainfekowanie jej.

Rutyna jest flawonoidem szeroko występującym w świecie roślinnym, niewykazującym toksyczności ogólnoustrojowej, a jej plejotropowe działanie jest wykorzystywane w medycynie tradycyjnej. Obecne badanie może być pomocne w opracowywaniu nowych lub skojarzonych leków do leczenia COVID-19.

*Wybór i opracowanie  
prof. dr hab. n. farm. Irena Matławska*