

ПРОТЕФЛАЗІД®

ЕТІОТРОПНА ТЕРАПІЯ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ У ГІНЕКОЛОГІЇ



Рекомендоване одночасне застосування

Протефлазід® краплі та Протефлазід® супозиторії*



- ✓ папіломавірусна інфекція
- ✓ генітальний герпес
- ✓ інфекції змішаної етіології

Витяг з інструкції для медичного застосування препарату ПРОТЕФЛАЗІД® краплі

Склад: 1 мл крапель містить 1 мл рідиного екстракту Протефлазид (вміст флавоноїдів не менше 0,32 мг/мл у перерахунку на рутин, вміст карбонових кислот не менше 0,30 мг/мл у перерахунку на яблучну кислоту) із трави шучки дернистої (Herba Deschampsia caespitosa L.) та трави війника наземного (Herba Calamagrostis L.) (1:1). Розчинник екстракції: етанол 96%. **Фармакотерапевтична група.** Протівірусні засоби прямої дії. Код АТХ J05A X. **Показання.** Лікування захворювань та профілактика рецидивів, спричинених: вірусами простого герпесу (Herpes simplex) 1-го та 2-го типів; вірусами оперізувального герпесу та вітряної віспи (Herpes zoster, 3-й тип); вірусами герпесу 4-го типу (вірус Епштейна — Барр), гострої та хронічної активної форм; вірусами герпесу 5-го типу (цитомегаловірус). Лікування та профілактика грипу та інших ГРВІ, в тому числі пандемічних штамів грипу. У складі комплексного лікування гепатитів В та С; вірусних, бактеріальних, грибкових інфекцій, їх асоціацій (хламідії, мікоплазми, уреаплазми тощо); ВПІ-інфекції та СНІДу. Етіотропна терапія легких та середніх форм дисплазії шийки матки (CIN1 та CIN2), спричиненої папіломавірусною інфекцією, в тому числі онкогенними штамми. У складі комплексної терапії інших форм захворювань, викликаних папіломавірусною інфекцією, в тому числі онкогенними штамми. **Протипоказання.** Підвищена чутливість до компонентів препарату. Виразка шлунка або дванадцятипалої кишки. **Спосіб застосування та дози.** Схему прийому препарату Протефлазид®, краплі, залежно від віку: від народження до 1 року — 1 крапля на добу; 1–2 роки — 1 крапля 2 рази на добу; 2–4 роки — 2 краплі 2 рази на добу; 4–6 років — 4 краплі 2 рази на добу; 6–9 років — 9 крапель 2 рази на добу; 9–12 років — 10 крапель 2 рази на добу; діти віком від 12 років та дорослі — 12–15 крапель 2 рази на добу. Тривалість застосування препарату Протефлазид® залежить від показань та перебігу захворювання. **Побічні реакції.** В осіб із підвищеною чутливістю можливі реакції гіперчутливості. Рідко — еритематозні висипання, свербіж. Спостерігаються поодинокі випадки шлунково-кишкових розладів — біль в епігастральній ділянці, нудота, блювання, діарея. У пацієнтів із хронічним гастродуоденітом можливе загострення гастродуоденіту, виникнення гастрофлегмального рефлюксу. У поодиноких випадках можливий головний біль, загальна слабкість, транзиторне підвищення температури тіла до 38 °С на 3–10-й день терапії препаратом та ін. **Категорія відпуску.** За рецептом. **Виробник.** ТОВ «НВК «Екофарм». **Заявник.** ТОВ «НВК «Екофарм».

*Витяг з інструкції для медичного застосування препарату ПРОТЕФЛАЗІД® супозиторії

Склад: діюча речовина: 1 супозиторій містить флавоноїди Протефлазиду, одержані із суміші (1:1) трави шучки дернистої (Herba Deschampsia caespitosa L.) та трави війника наземного (Herba Calamagrostis epigeios L.) не менше 1,8 мг; допоміжні речовини: бутилгідроксиснізол (Е320), поліетиленгліколь-400, поліетиленгліколь-1500, поліетиленгліколь-4000, до одержання маси 3 г. **Фармакотерапевтична група.** Протівірусні засоби прямої дії. Код АТХ J05A X. Інші гінекологічні засоби. Код АТХ G02 C X. **Показання.** Лікування захворювань жіночих статевих органів, спричинених вірусами простого герпесу (Herpes simplex) 1-го та 2-го типів, цитомегаловірусами та вірусами Епштейна — Барр; вірусами папіломи людини (ВПЛ), включаючи онкогенні штами. У складі комплексного лікування захворювань жіночих статевих органів, спричинених збудниками запальних захворювань змішаної етіології (віруси, бактерії, патогенні грибки, хламідії, мікоплазми, уреаплазми). **Протипоказання.** Індивідуальна підвищена чутливість до компонентів препарату. **Спосіб застосування та дози.** Супозиторії застосовувати по 1 супозиторию 1 раз на добу протягом 7–10 днів і більше до зникнення симптомів захворювання. Для лікування рецидивуючої герпетичної інфекції, у тому числі при наявності цитомегаловірусної інфекції та інфекції Епштейна — Барр — по 1 супозиторию 1 раз на добу протягом 10 днів упродовж 3 міс (щомісячно по 10 днів). У разі наявності папіломавірусної інфекції та/або герпетичних інфекцій у поєднанні з бактеріальними, грибковими інфекціями застосовувати по 1 супозиторию 2 рази на добу щомісячно по 14 днів протягом 3 міс. **Особливості застосування.** Етіотропну терапію захворювань, зазначених у розділі «Показання», крім місцевої терапії препаратом ПРОТЕФЛАЗІД® (супозиторії), необхідно доповнити пероральним застосуванням препарату ПРОТЕФЛАЗІД® (краплі) за схемою та у дозах, вказаних у відповідній інструкції. **Побічні реакції.** Можливі незначний місцевий свербіж або печія слизової оболонки, які зникають самостійно та не потребують відміни препарату. Можливі реакції гіперчутливості, алергічні реакції. **Категорія відпуску.** За рецептом. **Виробник.** ТОВ «НВК «Екофарм». **Заявник.** ТОВ «НВК «Екофарм».

Перед призначенням ознайомтеся з детальними інструкціями для медичного застосування лікарських засобів Протефлазид® краплі та Протефлазид® супозиторії.



ТОВ «Науково-виробнича компанія «Екофарм»

Україна, 04210, м. Київ, вул. Оболонська набережна, буд. 19, корпус 1.
Тел./факс: (044) 594-05-99 office@ecopharm.ua www.ecopharm.ua

О.Н. Дерябин¹, М.П. Завелевич², Д.Б. Старосила¹, Л.И. Пальчиковская³,
М.О. Платонов³, В.П. Атаманюк⁴, С.Л. Рыбалко¹

¹ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л.В. Громашевского НАМН Украины», Киев

²Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

³Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

⁴НПО «Экофарм», Киев

Природные полифенолы как ингибиторы взаимодействия коронавируса с клетками: обзор литературы и экспериментальные данные

К моменту наступления пандемии, вызванной SARS-CoV-2, специфические ингибиторы репродукции коронавируса человека, которые были бы активны в отношении этого вируса, разработаны не были, хотя и проводились интенсивные исследования в этом направлении. Показано, что некоторые флавоноиды и их производные ингибируют *in vitro* репродукцию коронавируса животных и человека. Выявлены специфические мишени действия флавоноидов на различных этапах взаимодействия коронавируса с клеткой, которые рассмотрены в настоящем обзоре. Особого внимания заслуживают ингибирование проникновения вируса в клетку и ингибирование ферментативной активности вирусспецифической протеазы, играющей важную роль в процессе репродукции коронавируса. Рассмотрены перспективы использования флавоноидов и их производных как возможных перспективных веществ для создания субстанций, которые могли бы найти применение в клинической практике. Подчеркивается, что важной особенностью флавоноидов (как биологически активных молекул) является полимишеневый механизм их действия. Приведены данные собственного пилотного проекта по исследованию влияния флавоноидов отечественного флавоноидсодержащего препарата Протефлазид на репродукцию коронавируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней и изучению *in silico* взаимодействия активных структур — компонентов Протефлазида с 3С-подобной протеазой коронавируса человека.

Ключевые слова: коронавирусы, SARS-CoV-2, флавоноиды, противовирусные средства, Протефлазид.

Трудности создания препаратов, избирательно подавляющих репродукцию вирусов и не затрагивающих процессы жизнедеятельности клеток, объясняют то, что количество эффективных специфических противовирусных терапевтических препаратов пока весьма ограничено. С другой стороны, наличие специфических ферментов, участвующих в репликации вируса, в ряде случаев значительно облегчает задачу разработки и внедрения в практику этиотропных методов терапии вирусных инфекций, что представляет собой одно из главных направлений современной биологии и медицины. Если первыми противовирусными препаратами были ингибиторы специфических ДНК- и РНК-полимераз, участвующих в репликации вирусов, которые отличаются от соответствующих ферментов клетки, то впоследствии появились соединения, ингибирующие активность ряда других вирусных ферментов. В настоящее время поиск антивирусных препаратов идет по двум направлениям: скрининг имеющихся и вновь синтезированных соединений и направленный поиск с использованием современных методов компьютерного моделирования.

Помимо направленного поиска и скрининга синтетических соединений, обладающих противовирусной активностью, существенное внимание уделяется и поиску эффективных в противовирусном плане веществ природного происхождения. Вещества растительного происхождения продолжают оставаться одним из основных источников для прототипов антимикробных и антивирусных препаратов (DeClercq E., 2009). Особое место среди них занимают растительные полифенолы, в частности флавоноиды. Эти соединения широко распространены в растительном мире. Природные флавоноиды, обладающие противовирусной активностью, известны еще с 1940-х годов. Уже давно исследуются антивирусные свойства ряда веществ этого класса. Эффективное подавление репродукции вирусов самых различных так-

сономических групп показано в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (Zakaryan H. et al., 2017).

По мере развития исследований противовирусной активности флавоноидов наметился переход от изучения феноменологии ингибирования вирусов в экспериментальных системах к выяснению механизмов противовирусных эффектов. Значительная часть исследований в этом направлении была сосредоточена на выявлении модифицирующего действия флавоноидов на клеточные и вирусные ферменты. Оказалось, что флавоноиды различных классов являются ингибиторами ряда ферментов, в частности гидролаз, оксидоредуктаз, ДНК-синтаз, РНК-полимераз, фосфатаз, протеинфосфокиназ, оксигеназ. Стало понятным, что многочисленные эффекты флавоноидов в клетках зависят не от их классических антиоксидантных свойств, а от способности оказывать модулирующее действие на различные компоненты каскадов внутриклеточной передачи сигналов, включая каскады тирозинкиназ, MAP-киназ, протеинкиназы C и др. (Williams R.J. et al., 2004). Ингибирование ферментов может быть конкурентным и неконкурентным, чаще всего имеет место аллостерический механизм ингибирования (Sosa H.M. et al., 2017). Изучены зависимости между структурой флавоноидов и их ингибирующей активностью. Оказалось, что эффективность ингибирования меняется в зависимости от структуры флавоноидов и их стерического соответствия различным ферментам. Результаты многочисленных исследований прояснили, что именно благодаря ингибированию активности ферментов опосредуются многочисленные биологические, в том числе противовирусные, эффекты этих природных соединений.

Коронавирусы человека, вызывающие острые респираторные заболевания, известны давно. Еще в 1965 г. впервые выделен коронавирус от больного острой респираторной вирусной инфекцией. Тем не менее до определенного времени ко-

ронавирусы человека почти не привлекали внимания исследователей, пока в Китае в 2002–2003 гг. не была зафиксирована вспышка атипичной пневмонии, или тяжелой острой респираторной инфекции (Severe acute respiratory syndrome — SARS), за которой последовала вспышка ближневосточного респираторного синдрома (Middle East respiratory syndrome — MERS). Проблема коронавирусных инфекций человека стала предельно актуальной после появления в 2019 г. особо опасной эмерджентной инфекции, зарегистрированной в Китае и вызываемой коронавирусом 2019-nCoV (SARS-CoV-2), перешедшей в пандемию.

В Украине во время всплеск респираторных заболеваний у людей в предшествующие десятилетия клиницисты не выделяли коронавирусных штаммов, имеющих сколько-нибудь существенное значение с точки зрения эпидемиологии и практики отечественного здравоохранения. Гораздо большее значение в нашей стране имели и имеют те коронавирусы, которые поражают сельскохозяйственных животных и птиц. Здесь наиболее важны вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) и вирус инфекционного бронхита птиц, давно уже (с момента их выявления) изучаемые в лабораториях ветеринарной вирусологии.

Эмпирические исследования эффективности флавоноидов на коронавирусных инфекциях животных проводились давно, еще до появления серьезных в эпидемическом плане коронавирусных инфекций человека. В экспериментах продемонстрирована ингибирующая активность ряда флавоноидов в отношении репродукции коронавирусов *in vitro*. Так, на модели коронавируса коров продемонстрирован протекторный эффект *in vitro* теофлавинов, представляющих собой продукты конденсации флаван-3-олов (Clark K.J. et al., 1998). При исследовании на модели вируса диареи свиней (Choi H.J. et al., 2009; Song J.H. et al., 2011) показана высокая эффективность кверцетин-7-рамнозида. Антивирусный эффект в культуре клеток достигался уже в концентрации порядка 0,1 мкг/мл с очень высоким терапевтическим индексом и не коррелировал с антиоксидантным эффектом данного соединения, что позволяло предположить наличие специфических механизмов, опосредующих противовирусный эффект этого флавоноидного соединения. Противовирусный эффект кверцетин-7-рамнозида на двух моделях коронавирусов животных превышал таковой апигенина, лютеолина, кверцетина, кверцетрина, что, вероятно, связано с наличием гликозидного остатка (Kwon D.H. et al., 2007). Ингибирующий эффект в отношении вируса ТГС *in vitro* продемонстрирован также для флаванола катехина (Liang W. et al., 2015). Ряд исследований ингибирующих свойств флавоноидов проведен также на моделях вирусов, таксономически близких коронавирусам.

Интерес к химиопрофилактике и химиотерапии коронавирусных ветеринарных инфекций был в значительной мере утрачен в связи с успешным созданием и применением вакцин. Однако с появлением коронавирусов человека, представляющих повышенную опасность в эпидемиологическом плане, возобновился интерес к исследованию веществ различных классов, обладающих специфической ингибирующей активностью в отношении этих агентов. А. Zumla и соавторы (2016) отметили несколько подходов к созданию и испытанию препаратов, обладающих активностью против коронавирусов. Это тестирование широкого спектра уже существующих препаратов против других вирусов, скрининг существующих библиотек химических соединений и разработка и конструирование *de novo* веществ с учетом индивидуальных особенностей коронавирусов. Все эти принципы вполне применимы к разнообразным природным флавоноидным соединениям, равно как и их синтетическим производным.

Между тем к моменту наступления пандемии, вызванной SARS-CoV-2, несмотря на предыдущие исследования с SARS-CoV и MERS-CoV, в том числе с использованием флавоноидных соединений, так и не было создано специфических ингибиторов вирус-специфических ферментов, подобно таковым для вирусов гриппа (например озельтамивир) или ВИЧ (например лопинавир, ритонавир). Поэтому поиск таких соединений является актуальным (Jin Z. et al., 2020), хотя механизмы действия флавоноидов

на коронавирусы стали понятными благодаря исследованиям последних лет.

К этому времени появились данные, которые позволили выявить специфические мишени действия флавоноидов на различных этапах взаимодействия коронавирусов человека с клеткой. Определены несколько основных мишеней, заслуживающих внимания для поиска и создания противовирусных препаратов (Kilianski A., Baker S.C., 2014). На первом этапе взаимодействия коронавируса с клеткой возможно блокирование взаимодействия наружных структур (белка S шипов) с клеточными рецепторами для воспрепятствования проникновению вируса в клетку. Известно, что для успешного прикрепления вируса и последующего проникновения в клетку после связывания с рецепторами требуется протеолитическое расщепление указанных наружных структур вируса, что приводит к слиянию мембран вируса и клетки. Такой протеолиз осуществляется с участием клеточных протеаз, которые в значительной мере определяют тропизм вируса и патогенез коронавирусной инфекции (Millet J.K., Whittaker G.R., 2015). Коронавирусы проникают в клетку путем рецепторопосредованного эндоцитоза или слияния мембран вируса и клетки. В обоих случаях в этом процессе задействованы клеточные протеазы, поскольку для успешного проникновения РНК вируса в клетку с последующей инициацией репликативного процесса белок S должен быть праймирован. Такая активация белка S может осуществляться несколькими путями, а именно:

- пропротеиновыми конвертазами (такими как фурин) при сборке вируса в продуцирующих клетках;
- внеклеточными протеазами, такими как эластаза, уже после выхода вируса из клетки;
- протеазами, располагающимися на поверхности клетки, такими как трансмембранная протеаза типа II после присоединения вируса к поверхности клетки;
- лизосомальными протеазами (катепсинами) после эндоцитоза вирусных частиц (в случае проникновения вируса в клетку по эндоцитозному типу) (Li F., 2016).

Этап начального взаимодействия коронавируса с клеткой — одна из первых возможных мишеней действия для разработки соответствующих противовирусных средств. Ингибирование входа коронавируса в клетку может осуществляться как за счет веществ, специфически взаимодействующих с белком S, так и за счет ингибирования клеточных факторов, преимущественно различных протеаз, необходимых для этого процесса. Использование даже обычных ингибиторов катепсинов приводит к существенному блокированию проникновения коронавируса SARS-CoV в клетки *in vitro* (Kawase M. et al., 2012). Следует отметить, что флавоноиды могут быть ингибиторами катепсинов (Ramalho S.D. et al., 2015). При скрининге большого количества природных низкомолекулярных соединений относительно специфического связывания с белком S и блокирования входа в клетку псевдотипа SARS-CoV были выявлены и флавоноиды. В частности, лютеолин эффективно связывался с белком S2, препятствуя благодаря этому входу тестируемого псевдовirusа в клетку, а при исследовании в системе инфекционного SARS-CoV — оказывал ингибирующее действие на репродукцию последнего. Такой же активностью обладал и кверцетин (Yi L. et al., 2004).

Поверхностные белки, которые могут выполнять роль рецепторов, способствующих взаимодействию коронавируса человека, включая SARS-CoV-2, с клеткой, также являются потенциальными мишенями для поиска и конструирования лекарственных средств. Роль ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2) в таком взаимодействии показана еще для SARS-CoV (Li W. et al., 2003) и подтверждена недавними исследованиями для SARS-CoV-2, в которых установлена структура домена белка S, связывающегося с АПФ2 (Hoffmann M. et al., 2020; Lu R. et al., 2020). Сейчас изучается влияние известных ингибиторов АПФ на проникновение коронавируса в клетку. Между тем в свое время уже было установлено, что ряд флавоноидов в микромолярных концентрациях существенно ингибируют ферментативную активность АПФ, наиболее эффективным в этом отношении оказался лютеолин (Guerrero L. et al., 2012). В недавно проведенных исследованиях методом молекулярного докинга установлено, что эпигаллокатехина галлат, гесперидин и нарингенин взаимодей-

ствують з певними амінокислотними залишками домена білка S, зв'язуючись з АПФ2, в той час як кверцетин блокує сам рецептор АПФ2, перешкоджаючи тим самим зв'язуванню заблокованого рецептора з білком S (Bhowmik D. et al., 2020). При вивченні взаємодії з клітками SARS-CoV-2 виявлено ще один білок з суперсімейства імуноглобулінів CD147, з яким може зв'язуватися білок S вірусу (Wang K. et al., 2020). Відзначимо, що експресія CD147 раніше вже була добре вивчена в інших аспектах на ряді нормальних і пухлинних кліток людини, а в пошуках засобу цільової протипухлинної терапії серед ряду різних речовин досліджено і флавоноїд байкалін, який подавляє експресію CD147 і викликає апоптоз і аутофагію кліток (Zhang X. et al., 2012).

Інгібітори вірусних протеаз виявилися дуже ефективними для блокування реплікації ряду вірусів людини, таких як ВІЧ і вірус гепатита С. В реплікативному циклі коронавірусів, як і багатьох інших вірусів з одноцепочковою ланкою РНК, протеази грають важливу роль, розщеплюючи транскрибований поліпротеїн на неструктурні вірусні білки. РНК коронавірусів кодує дві цистеїнові протеази — папаїноподібну протеазу (PLpro) і хімотрипсиноподібну протеазу — протеазу, подібну до 3C (3CLpro), або 3C2 ендонуклеїдазу, яка є головною протеазою коронавірусу. Протеази такого типу широко поширені у вірусів, схожих з коронавірусами таксономічних груп, і діють за схожим механізмом (Ziebuhr J. et al., 2000). При цьому у протеаз вірусів з одноцепочковою ланкою РНК визначається деяке сходинство як в відношенні субстратної специфічності, так і в відношенні ефективності їх інгібування тими чи іншими зв'язками. PLpro коронавірусів людини розщеплює поліпротеїн коронавірусу в трьох, а 3CLpro — в 11 місцях, що в результаті призводить до утворення 16 неструктурних білків.

В експериментах *in vitro* показано безпосередньо інгібування флавоноїдами природного походження ферментативної активності 3CLpro в системі коронавірусної інфекції (Ryu Y.B. et al., 2010). Найбільш вираженим інгібуючим дією в відношенні цієї протеази мав бифлавонол аментофлавонол. Інгібувальний ефект продемонстровано також у апігенина, лютеоліна і кверцетина. Дані про вимірювання енергії зв'язування лігандів з ферментом, отримані за допомогою комп'ютерного моделювання, підтвердили ефекти, виявлені при безпосередньому визначенні інгібування активності цих речовин. Показано залежність ефективності інгібування від структури флавоноїдів, афінність зв'язування яких з 3CLpro SARS-CoV забезпечується за рахунок ароматических циклів і гідрофільних гідроксильних груп. Згідно з даними Т.Т. Nguyen і співавторів (2012), протеолітична активність клонированної рекомбінантної 3CLpro, визначена методом резонансного переносу енергії флуоресценції з флуорохромними субстратами, інгібувалася кверцетином і катехинами, а при використанні молекулярного докінгу було показано, що епігаллокатехин галлат і галлокатехин галлат зв'язуються з субстратозв'язуючим карманом 3CLpro завдяки гідрофобним взаємодіям і водородним зв'язкам.

Систематичне порівняння афінності зв'язування флавоноїдів з протеазою 3CLpro дозволило оцінити внесок як основної частини молекули, так і її функціональних груп. Найкращі параметри зв'язування і інгібування протеазної активності виявлені у одного флавонола — гербацетина і двох флавонолів — роїфоліна і пектолінарина. Показано, що найкращий інгібувальний ефект досягається в тому випадку, якщо до основного флавоноїдного ядра приєднані гідрофобні замісники або вуглеводи. Крім того, важливе значення для зв'язування грають вуглеводні групи, приєднані до основного ядра флавоноїдних молекул (Jo S. et al., 2019; 2020).

Протеаза SARS-CoV виявилася такою перспективною мішенню для пошуку речовин, вибірково блокуючих репродукцію коронавірусу, що було запропоновано використовувати в найближчому цю ферментативну модель для пошуку і направлення конструювання інгібіторів реплікації коронавірусів

(Grum-Tokars V. et al., 2008). По результатах цитування вище і ряду інших досліджень серед активних флавоноїдних зв'язків, інгібувальних протеази коронавірусу, з використанням різних методів виявилися такі флавоноїди, як апігенин, лютеолін, кверцетин, аментофлавонол, даїдзєїн, пуэарин, епігаллокатехин, епігаллокатехин галлат, галлокатехин галлат, кемпферол (Ryu Y.B. et al., 2010; Nguyen T.T. et al., 2012; Schwarz S. et al., 2014). В недавньому дослідженні >10 тис. зв'язків різної природи на предмет виявлення фармакологічно активних кандидатів — речовин-інгібіторів протеази SARS-CoV-2 — були обрані декілька найбільш активних низкомолекулярних зв'язків різної природи з значеннями IC_{50} 0,67–21,4 мкМ і значеннями EC_{50} в культурі кліток 4,67–16,77 мкМ (Jin Z. et al., 2020). Ці показники повністю співставимі з відповідними величинами для ряду найбільш активних флавоноїдів, наведених в роботах інших дослідників, що свідчить про потенціал флавоноїдів як можливих інгібіторів реплікації коронавірусів.

Окрім головної протеази коронавірусу, досліджують також інші можливі мішені, зокрема нуклеокапсидний білок SARS-CoV, який є структурним білком віриону, який бере участь в процесах транскрипції і збирання вірусних частин. Цей білок помітний тим, що він багато визначає розвиток ініційованого коронавірусом патологічного процесу в організмі, індукуючи продукцію провоспалительних цитокінів, блокуючи реакції вродженого імунітету і викликаючи апоптоз кліток. При дослідженні ряду флавоноїдів показано, що катехин і галлокатехин блокують взаємодію нуклеокапсидного білка SARS-CoV з специфічними олигонуклеотидами, що може бути важливим для розробки інгібіторів, блокуючих функціональну активність цього білка (Roh C., 2012).

Інтерес можуть представляти і інші мішені в реплікативно-транскрипційному комплексі коронавірусу, такі як РНК-залежна-РНК полімераза, праймаза, геліказа, ексонуклеаза. На протязі останніх років проводилися скринінг і пошук зв'язків, активних в відношенні кожного з цих вірусспецифічних ферментів. Серед інгібіторів гелікази коронавірусу виявлені природні флавоноїди миріцетин і скутелларєїн (Keum Y.S., Jeong Y.J., 2012). Ефективним інгібітором НТФази/гелікази виявився кверцетин, причому заміна 7-ОН-групи на арилметильні залишки суттєво підвищила таку активність (Lee C. et al., 2009).

Ще однією можливою точкою призначення таргетспецифічних зв'язків можуть бути механізми остаточної збирання і виходу вірионів. Так, показано, що производні кемпферолу, зокрема його глікозиди, інгібують утворення катіонізуючих іонних каналів, формуваних при репродукції SARS-CoV і беручих участь в высвобождении вірионів з клітки (Schwarz S. et al., 2014).

Слід відзначити також і інші аспекти дії флавоноїдів, окрім їх протівовірусних ефектів, опосередкованих вищеозначеними різноманітними механізмами. Так, L. Cheng і співавтори (2020) відзначають, що завдяки протівовоспалительним ефектам флавоноїдів вони можуть мати благотворний ефект в умовах інфекції SARS-CoV-2, запобігаючи цитокіновій бурі, яку, як вважають, грає неабияк важливу роль в патогенезі коронавірусної інфекції. В експериментах *in vivo* нарингін значно знижує рівень індукованих ліпополісахаридом провоспалительних цитокінів.

Нерідко, порівнюючи ефективність розроблених протівовірусних хіміопрепаратів з такою у індивідуальних флавоноїдів і їх производних, відзначають більш високу специфічність взаємодії хімотерапевтичних засобів з мішенями, не враховуючи відносно більш високу токсичність і наявність побічних ефектів при застосуванні таких засобів. Між тим, потенціал взаємодії флавоноїдів в визначених модельних системах, за даними молекулярного докінгу, може бути не нижче, ніж у специфічних синтезованих речовин, застосовуваних як протівовірусні препарати, як це було показано при порівнянні енергії зв'язування флавоно-

идов и озельтамивира с активным центром нейраминидазы вируса гриппа (Sadati S.M. et al., 2019). Уже показано, что ряд синтетических производных на основе флавоноидов обладает более высокой эффективностью на модели коронавируса по сравнению с исходными веществами природного происхождения (Park H.R. et al., 2012).

Вышеизложенное свидетельствует о перспективности и целесообразности изучения противовирусной активности флавоноидов с целью отбора наиболее перспективных веществ этого класса и возможности синтеза на их основе субстанций, которые могли бы найти применение в клинической практике. В ряде исследований приводятся данные, что подобранные композиции, включающие несколько флавоноидов, могут быть более эффективными благодаря различной степени аффинного взаимодействия с несколькими мишенями, что в еще большей степени позволяет реализовать преимущества полимишеневых механизмов действия этих соединений. Учитывая сложную структуру молекул флавоноидов, можно предположить вклад различных фармакофоров (химических группировок) в реализацию их биологических эффектов и сложные корреляции между активностью и структурой молекулы. Исследования противовирусной и противоопухолевой активности флавоноидов проводятся в ряде научных учреждений Украины. Одной из исследуемых флавоноидных композиций является препарат Протефлазид, разработанный в Украине фирмой «Экофарм». Композиция включает молекулярные комплексы О- и С-гликозидов флавонов с доминированием трицина. Постоянство состава композиции подтверждено методами жидкостной хроматографии высокого давления и газовой хроматографии. Проведенные нами ранее исследования позволили определить спектр противовирусной активности *in vitro* в отношении вирусов ряда таксономических групп, а также выявить *in silico* наиболее перспективные ферментативные мишени и охарактеризовать эффективность взаимодействия отдельных флавоноидных компонентов Протефлазида с соответствующими мишенями (Пальчиковська Л.Г. та співавт., 2013; Trokhymchuk T. et al., 2017).

В сложившейся ныне ситуации представляло интерес изучить *in vitro* влияние данного флавоноидного препарата в системе коронавирусной инфекции. Работы с высокопатогенными коронавирусами человека в нашей стране в настоящее время не проводятся в частности из-за отсутствия надлежащих условий работы с высокопатогенными материалами. Тем не менее в Украине накоплен многолетний опыт работы с коронавирусами животных, которые не являются патогенными для человека. Совместными усилиями Института инфекционных болезней НАМН Украины и Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины осуществлен пилотный проект по исследованию влияния флавоноидов на репродукцию коронавируса ТГС и изучения *in silico* взаимодействия активных структур — компонентов Протефлазида с 3С-подобной протеазой коронавируса человека.

Протефлазид эффективно ингибирует репродукцию коронавируса свиней в клетках перевиваемой линии почки свиньи СПЭВ в концентрации 0,02–0,225 мкг/мл, снижая инфекционный титр вируса на 6,0 IgID₅₀ с индексом селективности 60. В дозах, ингибирующих репродукцию вируса, препарат не проявляет цитотоксичности и не влияет на митотический режим исследованных клеток. Активное флавоноидное начало, выделенное из препарата Протефлазид, ингибирует репродукцию вируса при еще более высоком индексе селективности (до 200). Инфицирование вирусом ТГС клеток СПЭВ вызывает значительный апоптоз в культуре. Внесение в культуральную среду флавоноидной композиции существенно снижает долю апоптотических клеток в сравнении с клетками, инфицированными вирусом.

Ранее выявлено, что кверцетин ингибирует трипсиноподобные сериновые протеиназы, связываясь с двумя соседними фенольными гидроксильными группами (или катехолом) с важными для распознавания субстрата и ферментативной активности аминокислотными остатками каталитического кармана протеаз (Kim Y. et al., 2012). В исследованиях методом компьютерного моделирования в качестве объекта выбрана 3С-подобная протеаза нового коронавируса SARS-CoV-2. Информация о протеазном комплексе нами получена по данным «The crystal structure

of 2019-nCoV main protease in complex with an inhibitor N3», депонированным в Protein Data Bank (DOI: 10.2210/pdb6LU7/pdb) (Liu X. et al., 2020). Мы использовали представленный по данной ссылке необратимый комплекс пептидоподобного лиганда с белком-мишенью — как базовую модель для докинга непептидного лиганда, в качестве которого применяли базовое флавоноидное соединение препарата Протефлазид.

Методом молекулярного докинга в кристаллическую структуру протеазы nCoV2019 было показано, что лиганд хорошо располагается в кристаллическом кармане протеазы, образуя водородные связи с остатками Ser 144, Gly 143, и располагается между каталитическими остатками His 163, Asn 142 и Cys 145, и образует двумя гидроксильными катехола водородные связи с остатком Glu 166, что свидетельствует об ингибировании главной протеазы коронавируса 2019-nCoV активной структурой препарата Протефлазид.

Приведенные данные пилотного проекта могут служить базой для скрининга и конструирования соединений, которые могут найти применение как основы для создания противовирусных лекарственных средств.

Список использованной литературы

- Пальчиковська Л.Г., Васильченко О.В., Платонов М.О. та ін. (2013) Антивірусні властивості рослинних флавоноїдів – інгібіторів синтезу ДНК і РНК. *Biopolym. Cell*, 29(2): 150–156 (<http://dx.doi.org/10.7124/bc.000813>).
- Bhowmik D., Nandi R., Kumar D. (2020) Evaluation of flavonoids as 2019-nCoV cell entry inhibitor through molecular docking and pharmacological analysis (https://chemrxiv.org/articles/Evaluation_of_Flavonoids_as_2019-nCoV_Cell_Entry_Inhibitor_Through_Molecular_Docking_and_Pharmacological_Analysis/12071508/1).
- Cheng L., Zheng W., Li M. et al. (2020) Citrus Fruits are rich in flavonoids for immunoregulation and potential targeting ACE2 (<https://www.preprints.org/manuscript/202002.0313/v1>).
- Choi H.J., Kim J.H., Lee C.H. et al. (2009) Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Virology*, 48: 460. doi: 10.1016/j.virol.2008.10.010.
- Clark K.J., Grant P.G., Sarr A.B. et al. (1998) An *in vitro* study of theaflavins extracted from black tea to neutralize bovine rotavirus and bovine coronavirus infections. *Vet. Microbiol.*, 63(2–4): 147–157. doi: 10.1016/S0378-1135(98)00242-9.
- DeClercq E. (2009) Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 33: 307–320. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.010.
- Grum-Tokars V., Ratia K., Begaye A. et al. (2008) Evaluating the 3C-like protease activity of SARS Coronavirus: recommendations for standardized assays for drug discovery. *Virus Res.*, 133: 63–73. doi: 10.1016/j.virusres.2007.02.015.
- Guerrero L., Castillo J., Quiñones M. et al. (2012) Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *PLoS One*, 7(11): e49493. doi:10.1371/journal.pone.0049493.
- Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. et al. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 181(2): 271–280. e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- Jin Z., Du X., Xu Y. et al. (2020) Structure of M^{pro} from COVID-19 virus and discovery of its inhibitors (<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>).
- Jo S., Kim H., Kim S. et al. (2019) Characteristics of flavonoids as potent MERS-CoV 3C-like protease inhibitors. *Chem. Biol. Drug. Des.*, 94: 2023–2030. doi: 10.1111/cbdd.13604.
- Jo S., Kim S., Shin D.H., Kim M.S. (2020) Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 35(1): 145–151. doi: 10.1080/14756366.2019.1690480.
- Kawase M., Shirato K., van der Hoek L. et al. (2012) Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J. Virol.*, 86(12): 6537–6545. doi: 10.1128/JVI.00094-12.
- Keum Y.S., Jeong Y.J. (2012) Development of chemical inhibitors of the SARS coronavirus: viral helicase as a potential target. *Biochem. Pharmacol.*, 84(10): 1351–1358. doi: 10.1016/j.bcp.2012.08.012.
- Kilianski A., Baker S.C. (2014) Cell-based antiviral screening against coronaviruses: developing virus-specific and broad-spectrum inhibitors. *Antiviral Res.*, 101: 105–112. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.11.004.
- Kim Y., Lovell S., Tiew K.-C. et al. (2012) Broad-spectrum antivirals against 3C or 3C-like proteases of picornaviruses, noroviruses, and coronaviruses. *J. Virol.*, 86(21): 11754–11762.
- Kwon D.H., Choi W.J., Lee C.H. et al. (2007) Flavonoid compound having an antiviral activity. Patent WO2007069823A1.
- Lee C., Lee J.M., Lee N.-R. et al. (2009) Investigation of the pharmacophore space of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) NTPase/helicase by dihydroxymethylene derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19: 4538–4541. doi:10.1016/j.bmcl.2009.07.009.

- Li W., Moore M.J., Vasilieva N. et al. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426: 450–454. doi:10.1038/nature02145.
- Li F. (2016) Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu. Rev. Virol.*, 3(1): 237–261. doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042301.
- Liang W., He L., Ning P. et al. (2015) (+)-Catechin inhibition of transmissible gastroenteritis coronavirus in swine testicular cells is involved in its antioxidant. *Res. Vet. Sci.*, 103: 28–33. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.09.009.
- Liu X., Zhang B., Jin Z. et al. (2020) The crystal structure of COVID-19 main protease in complex with an inhibitor N3. DOI: 10.2210/pdb6LU7/pdb.
- Lu R., Zhao X., Li J. et al. (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224): 565–574. doi: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- Millet J.K., Whittaker G.R. (2015) Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.*, 202: 120–134. doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.021.
- Nguyen T.T., Woo H.J., Kang H.K. et al. (2012) Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3C-like protease expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, 34: 831–838. doi: 10.1007/s10529-011-0845-8.
- Park H.R., Yoon H., Kim M.K. et al. (2012) Synthesis and antiviral evaluation of 7-O-arylmethylquercetin derivatives against SARS-associated coronavirus (SCV) and hepatitis C virus (HCV). *Arch. Pharm. Res.*, 35(1): 77–85. doi: 10.1007/s12272-012-0108-9.
- Ramalhõ S.D., de Sousa L.R., Burger M.C. et al. (2015) Evaluation of flavonols and derivatives as human cathepsin B inhibitor. *Nat. Prod. Res.*, 29(23): 2212–2214. doi: 10.1080/14786419.2014.1002404.
- Roh C. (2012) A facile inhibitor screening of SARS coronavirus N protein using nanoparticle-based RNA oligonucleotide. *Int. J. Nanomedicine*, 7: 2173–2179. doi: 10.2147/IJN.S31379.
- Ryu Y.B., Jeong H.J., Kim J.H. et al. (2010) Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CL(pro) inhibition. *Bioorg. Med. Chem.*, 18(22): 7940–7947. doi: 10.1016/j.bmc.2010.09.035.
- Sadati S.M., Gheibi N., Ranjbar S., Hashemzadeh M.S. (2019) Docking study of flavonoid derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 virus neuraminidase. *Biomed. Rep.*, 10(1): 33–38. doi: 10.3892/br.2018.1173.
- Schwarz S., Sauter D., Wang K. et al. (2014) Kaempferol derivatives as antiviral drugs against the 3a channel protein of coronavirus. *Planta Med.*, 80: 177–182. doi: 10.1055/s-0033-1360277.
- Song J.H., Shim J.K., Choi H.J. (2011) Quercetin 7-rhamnoside reduces porcine epidemic diarrhea virus replication via independent pathway of viral induced reactive oxygen species. *Virol. J.*, 8: 460. doi: 10.1186/1743-422X-8-460.
- Sosa H.M., Sosa Y.J., Phansalkar S., Stieglitz K.A. (2017) Structural analysis of flavonoid/drug target complexes: natural products as lead compounds for drug development. *Nat. Prod. Chem. Res.*, 5: 2. doi:10.4172/2329-6836.1000254.
- Trokhymchuk T., Zavelevich M., Liulchuk M. et al. (2017) *In vitro* study of anti-HIV activity of proteflazid herbal composition. *Am. J. Fundam. Appl. Exp. Res.*, 7: 87–91.
- Wang K., Chen W., Zhou Y.S. et al. (2020) SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *bioRxiv*. doi:10.1101/2020.03.14.988345.
- Williams R.J., Spencer J.P.E., Rice-Evans C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.*, 36(7): 838–849. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001.
- Yi L., Li Z., Yuan K. et al. (2004) Small molecules blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells. *J. Virol.*, 78: 11334–11339. doi: 10.1128/JVI.78.20.11334-11339.2004.
- Zakaryan H., Arabyan E., Oo A., Zandi K. (2017) Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Arch. Virol.*, 162(9): 2539–2551. doi: 10.1007/s00705-017-3417-y.
- Zhang X., Tang X., Liu H. et al. (2012) Autophagy induced by baicalin involves downregulation of CD147 in SMMC-7721 cells *in vitro*. *Oncol. Rep.*, 27(4): 1128–1134. doi: 10.3892/or.2011.1599.
- Ziebuhr J., Snijder E.J., Gorbalenya A.E. (2000) Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.*, 81: 853–879. doi: 10.1099/0022-1317-81-4-853.
- Zumla A., Chan J.F., Azhar E.I. et al. (2016) Coronaviruses – drug discovery and therapeutic options. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 15: 327–347. doi: 10.1038/nrd.2015.37.

Природні поліфеноли як інгібітори взаємодії коронавірусів із клітинами: огляд літератури й експериментальні дані

О.М. Дерябін, М.П. Завелевич, Д.Б. Старосила, Л.Г. Пальчиківська, М.О. Платонов, В.П. Атаманюк, С.Л. Рибалко

Резюме. На момент пандемії, спричиненої SARS-CoV-2, специфічні інгібітори репродукції коронавірусів людини, які були б активні щодо цього вірусу, розроблені не були, хоча і проводилися інтенсивні дослідження в цьому напрямі. Показано, що деякі флавоноїди та їхні похідні інгібують *in vitro* репродукцію коронавірусів тварин і людини. Виявлено специфічні мішені дії флавоноїдів на різних етапах взаємодії коронавірусів із клітиною, які розглянуті в цьому огляді. На особливу увагу заслуговують інгібування проникнення вірусу до клітини та гальмування ферментативної активності віруссPECIFIC протези, що відіграє важливу роль у процесі репродукції коронавірусів. Розглянуто перспективи використання флавоноїдів та їхніх похідних як можливих перспективних речовин для створення субстанцій, які могли б знайти застосування у клінічній практиці. Підкреслено, що важливою особливістю флавоноїдів (як біологічно активних молекул) є полімішеневий механізм їхньої дії. Наведено дані власного пілотного проекту із дослідження впливу флавоноїдів вітчизняного флавоноїдвмісного препарату Протефлазид на репродукцію коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней і вивчення *in silico* взаємодії активних структур — компонентів Протефлазиду із 3C-подібною протезазою коронавірусу людини.

Ключові слова: коронавіруси, SARS-CoV-2, флавоноїди, противірусні засоби, Протефлазид.

Natural polyphenols as inhibitors of coronavirus-cell interaction: review of literature and experimental data

О.М. Deriabin, М.Р. Zavelevych, D.B. Starosyla, L.G. Palchikovska, М.О. Platonov, V.P. Atamaniuk, S.L. Rybalko

Summary. At the time of the pandemic outbreak caused by SARS-CoV-2, no specific inhibitors of the human coronavirus reproduction have not been designed, although such studies were in full swing. Several flavonoids and their derivatives were shown to inhibit effectively reproduction of human and animal coronaviruses *in vitro*. The specific targets of flavonoids at different stages of coronavirus-cell interaction have been elucidated. These targets are disclosed in this review. Of particular importance are the inhibition of virus penetration into the cell as well as the inhibition of virus-specific protease — one of the important virus-specific enzymes. The prospects for using flavonoids and their derivatives as probable antiviral substances of clinical utility are considered. The multitarget patterns of flavonoid action is the key feature of these substances. The data of the original pilot project on the effects of flavonoid-containing composition Proteflazidum on the reproduction of the porcine transmissible gastroenteritis virus *in vitro* has been provided. Furthermore, the data on the molecular interaction of the active structures of Proteflazidum with 3C-like protease of SARS-CoV-2 obtained by computer simulation have been presented.

Key words: coronaviruses, SARS-CoV-2, flavonoids, antivirals, Proteflazid.

Адрес для переписки:

Рибалко Светлана Леонтьевна
03680, Киев, ул. Н. Амосова, 5
Институт эпидемиологии и инфекционных болезней
имени Л.В. Громашевского НАМН Украины
E-mail: epidemics@ukr.net

Получено 15.05.2020