

# ПРОТЕФЛАЗІД®

ЕТИОТРОПНА ТЕРАПІЯ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ У ГІНЕКОЛОГІЇ



## Рекомендоване одночасне застосування

Протефлазід® краплі та Протефлазід® супозиторії\*



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

Ліцензія №Л/042/20/017/01 від 17.02.2021.

### Витяг з інструкції для медичного застосування препарату ПРОТЕФЛАЗІД® краплі

**Склад:** 1 мл крапель містить 1 мл рідкого екстракту Протефлазід (вміст флавоноїдів не менше 0,32 мг/мл у перерахунку з трави щучки дерністої (Herba Deschampsia caespitosa L.) та трави війника наземного (Herba Calamagrostis L.) (1:1)). Розчинник екстракції: етанол 96%.

**Фармакотерапевтична група:** Противірусні засоби прямого дії. Код ATX J05A X. **Показання.** Лікування захворювань та профілактика рецидивів, спричинених вірусами простого герпесу (*Herpes simplex*) 1-го та 2-го типів; вірусами оперібульзального герпесу та вітряної віспи (*Herpes zoster*, 3-й тип); вірусами герпесу 5-го типу (цитомегаловірус). Лікування та профілактика грипу та інших ГРВІ, в тому числі пандемічних лікування гепатитів В та С; вірусних, бактеріальних, грибкових інфекцій, їх асociацій (хламідії, мікоплазми, уреаплазми тощо); ВЛ-інфекції та СНДу. Етіотропна терапія легких та середніх форм дисплазії шийки матки (CIN1 та CIN2), спричиненої папіломавірусною інфекцією, в тому числі онкогенними штамами. У склад комплексної терапії інших форм захворювань, викликаних папіломавірусною інфекцією, в тому числі онкогенними штамами. **Протипоказання.** Підвищена чутливість до компонентів препарату. Виразка шпунка або двадцятипапільоїди кишki. **Спосіб застосування та дози.** Схема прийому препарату Протефлазід® 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 роки — 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. Гравітант застосуванням препарату Протефлазід® заснований на показаннях та передбігу захворювання. **Побічні реакції.** В осіб із підвищеною чутливістю можливі реакції гіперчутливості. Рідко — еритематозні висипання, свербіж. Постерігаються поодинокі випадки шлунково-кишкових розладів — біль в епігастральній ділянці, нудота, бл�вання, діарея. У пацієнтів із хронічним гастроудоведенітм можливі загострення гастроудоведеніту, виникнення гастрозоефагеального рефлюксу. У поодиноких випадках можливий головний біль, занадти слабкість, транзиторне підвищення температури тіла до 38 °C на 3–10 днів терапії препаратом та ін. **Категорія відпуску.** За рецептром.

**Виробник.** ТОВ «НВК «Екофарм». **Заявник.** ТОВ «НВК «Екофарм».



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

### Витяг з інструкції для медичного застосування препарату ПРОТЕФЛАЗІД® супозиторії

**Склад:** діюча речовина: 1 супозиторій містить флавоноїд Протефлазід, одержаний із суміші (1:1) трави щучки дерністої (Herba Deschampsia caespitosa L.) та трави війника наземного (Herba Calamagrostis epigejos L.) не менше 1,8 мг; допоміжні речовини: бутилгідроксанізол (E320), поліліненгліколов-400, поліліненгліколов-1500, поліліненгліколов-4000, до одержання маси 3 г. **Фармакотерапевтична група.** Противірусні засоби прямої дії. Код ATX J05A X. **Інші гінекологічні засоби.** Код ATX 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 — Барра; вірусами папіломи людини (ВПЛ), включаючи онкогенні штамами. У склад комплексного лікування захворювань жіночих статевих органів, спричинених збудниками затальних захворювань змішаної етіології (віруси, бактерії, патогенні грибки, хламідії, мікоплазми, уреаплазми).

**Протипоказання.** Індивідуальна підвищена чутливість до компонентів препарату. **Спосіб застосування та дози.** Супозиторій застосовувати по 1 супозиторію 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 — Барра — по 1 супозиторію 1 раз на добу протягом 10 днів упродовж 3 міс (можливою до 10 днів). У разі наявності папіломавірусної інфекції та/або герпетичних інфекцій у поєднанні з бактеріальними, грибковими інфекціями застосовувати по 1 супозиторію 2 рази на добу щомісячно по 14 днів протягом 3 міс. **Особливості застосування.** Етіопатогенетичну 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.** Можливий незначний місцевий свербіж або пеїчні сплизові оболонки, які зникають самостійно та не потребують відміні препарату. Можливі реакції гіперчутливості, алергічні реакції. **Категорія відпуску.** За рецептром. **Виробник.** ТОВ «НВК «Екофарм». **Заявник.** ТОВ «НВК «Екофарм».

Перед призначенням ознайомтеся з додатковими інструкціями для медичного застосування лікарських засобів Протефлазід® краплі та Протефлазід® супозиторії.

О.Н. Дерябин<sup>1</sup>, М.П. Завелевич<sup>2</sup>, Д.Б. Старосила<sup>1</sup>, Л.И. Пальчиковская<sup>3</sup>,  
М.О. Платонов<sup>3</sup>, В.П. Атаманюк<sup>4</sup>, С.Л. Рыбалко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Інститут епідеміології і інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України», Київ

<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Е. Кавецького НАН України, Київ

<sup>3</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

<sup>4</sup>НПО «Экофарм», Київ

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

К моменту наступления пандемии, вызванной SARS-CoV-2, специфические ингибиторы репродукции коронавирусов 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 ингибирывают *in vitro* репродукцию коронавирусов животных и человека. Выявлены специфические мишени действия флавоноидов на различных этапах взаимодействия коронавирусов 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 коронавирусов. 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 ЗС-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 antimикробных 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 С и др. (Williams R.J. et al., 2004). Ингибирование ферментов может быть конкурентным и неконкурентным, чаще всего имеет место аллостерический механизм ингибирования (Sosa N.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 тяжелого острого респираторного синдрома (*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*), передешей в пандемию.

В Украине во время вспышек 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, представляемых повышенной опасностью в эпидемиологическом плане, возобновился интерес к исследованию веществ различных классов, обладающих специфической ингибирующей активностью в отношении этих агентов. A. 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 мишней, 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 фурины) при сборке вируса в продуцирующих клетках;
- внеклеточными протеазами, такими как эластаза, уже после выхода вируса из клетки;
- протеазами, располагающимися на поверхности клетки, такими как трансмембранный 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 мишней действия для разработки соответствующих противовирусных средств. Ингибиование 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 (Ramilho S.D. et al., 2015). При скрининге большого количества природных низкомолекулярных соединений относительно специфического связывания с белком S и блокирования входа в клетку псевдовируса SARS-CoV были выявлены и флавоноиды. В частности, лютеолин эффективно связывался с белком S2, препятствуя благодаря этому входу тестируемого псевдовируса 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 коронавирусов человека, включая SARS-CoV-2, с клеткой, также являются потенциальными мишнями 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 налингенин взаимодей-

ствуют с определенными аминокислотными остатками домена белка S, связывающегося с АПФ2, в то время как кверцетин блокирует сам рецептор АПФ2, препятствуя тем самым связыванию блокированного рецептора с белком S (Bhowmik D. et al., 2020). При изучении взаимодействия с клетками SARS-CoV-2 выявлен еще один белок из суперсемейства иммуноглобулинов CD147, с которым может связываться белок S вируса (Wang K. et al., 2020). Отметим, что экспрессия CD147 ранее уже была хорошо изучена в других аспектах на ряде нормальных и опухолевых клеток человека, а в поисках средства таргетной противопухолевой терапии среди ряда многих веществ исследованы и флавоноид байкалин, который подавляет экспрессию CD147 и приводит к апоптозу и аутофагии клеток (Zhang X. et al., 2012).

Ингибиторы вирусных протеаз оказались весьма эффективными для блокирования репликации ряда вирусов человека, таких как ВИЧ и вирус гепатита С. В репликативном цикле коронавирусов, как и многих других вирусов с одноцепочечной смысловой цепью РНК, протеазы играют важную роль, расщепляя транслированный полипротеин на неструктурные вирусные белки. РНК коронавирусов кодирует две цистeinовые протеазы — папапиноподобную протеазу (PLpro) и химотрипсинподобную протеазу — протеазу, подобную 3C (3CLpro), или C30 эндопептидазу, являющуюся главной протеазой коронавируса. Протеазы такого типа широко распространены у вирусов, сходных с коронавирусами таксономических групп, и действуют по сходному механизму (Ziebuhr J. et al., 2000). При этом у протеаз вирусов с одноцепочечной смысловой цепью РНК определяется некоторое сходство как в отношении субстратной специфичности, так и в отношении эффективности их ингибирования теми или иными соединениями. PLpro коронавирусов человека расщепляет полипротеин коронавируса в трех, а 3CLpro — в 11 участках, что в результате приводит к образованию 16 неструктурных белков.

В экспериментах *in vitro* показано непосредственно ингибирование флавоноидами природного происхождения ферментативной активности 3CLpro в системе коронавирусной инфекции (Ryu Y.B. et al., 2010). Наиболее выраженным ингибирующим действием в отношении этой протеазы обладал бифлавон аментофлавон. Ингибирующий эффект продемонстрирован также у апигенина, лютеолина и кверцетина. Данные по вычислению энергии связывания лигандов с ферментом, полученные с применением компьютерного моделирования, подтвердили эффекты, выявленные при непосредственном определении ингибирующей активности этих веществ. Показана зависимость эффективности ингибирования от структуры флавоноидов, аффинность связи которых с 3CLpro SARS-CoV обеспечивается благодаря ароматическим циклам и гидрофильным гидроксильным группам. Согласно данным Т.Т. Nguyen и соавторов (2012), протеолитическая активность клонированной рекомбинантной 3CLpro, определяемая методом резонансного переноса энергии флуоресценции с флуорохромными субстратами, ингибировалась кверцетином и катехинами, а при использовании молекулярного докинга было показано, что эпигаллокатехина галлат и галлокатехина галлат связываются с субстратом связывающим карманом 3CLpro благодаря гидрофобным взаимодействиям и водородным связям.

Систематическое сравнение аффинности связывания флавоноидов с протеазой 3CLpro позволило оценить вклад как основной части молекулы, так и ее функциональных групп. Наилучшие параметры связывания и ингибирования протеазной активности выявлены у одного флавонола — гербацетина и двух флавонов — роифолина и пектолинарина. Показано, что наилучший ингибирующий эффект достигается в случае, если к основному флавоноидному ядру присоединены гидрофобные заместители или углеводы. Кроме того, важное значение для связывания играют углеводные группы, присоединенные к основному ядру флавоновых молекул (Jo S. et al., 2019; 2020).

Протеаза SARS-CoV оказалась столь перспективной мишенью для поиска веществ, избирательно блокирующих репродукцию коронавируса, что было предложено использовать в дальнейшем эту ферментативную модель для поиска и направленного конструирования ингибиторов репликации коронавирусов

(Grum-Tokars V. et al., 2008). По результатам цитированных выше и ряда других исследований среди активных флавоноидных соединений, ингибирующих протеазы коронавируса, с использованием различных методов оказались такие флавоноиды, как апигенин, лютеолин, кверцетин, аментофлавон, даидзein, пуэрарин, эпигаллокатехин, эпигаллокатехина галлат, галлокатехина галлат, кемпферол (Ryu Y.B. et al., 2010; Nguyen T.T. et al., 2012; Schwarz S. et al., 2014). В недавно проведенном исследовании >10 тыс. соединений различной природы на предмет выявления фармакологически активных кандидатов — веществ ингибиторов протеазы SARS-CoV-2 — были отобраны несколько наиболее активных низкомолекулярных соединений различной природы со значениями  $IC_{50}$  0,67–21,4 мкм и значениями  $EC_{50}$  в культуре клеток 4,67–16,77 мкм (Jin Z. et al., 2020). Эти показатели вполне сопоставимы с соответствующими величинами для ряда наиболее активных флавоноидов, приведенных в работах других исследователей, что свидетельствует о потенциале флавоноидов как возможных ингибиторов репликации коронавирусов.

Помимо главной протеазы коронавируса, исследуются также другие возможные мишени, в частности нуклеокапсидный белок SARS-CoV, являющийся структурным белком вириона, который участвует в процессах транскрипции и сборки вирусных частиц. Этот белок примечателен тем, что он во многом определяет развитие инициированного коронавирусом патологического процесса в организме, индуцируя продукцию провоспалительных цитокинов, блокируя реакции врожденного иммунитета и вызывая апоптоз клеток. При исследовании ряда флавоноидов показано, что катехин и галлокатехин блокируют взаимодействие нуклеокапсидного белка SARS-CoV со специфическими олигонуклеотидами, что может оказаться важным для разработки ингибиторов, блокирующих функциональную активность этого белка (Roh C., 2012).

Интерес могут представлять и другие мишени в репликативно-транскрипционном комплексе коронавируса, такие как РНК-зависимая-РНК полимераза, праймаза, геликаза, экзонуклеаза. На протяжении последних лет проводился скрининг и поиск соединений, активных в отношении каждого из этих вирусспецифических ферментов. Среди ингибиторов геликазы коронавируса выявлены природные флавоноиды мирицетин и скутеллареин (Keum Y.S., Jeong Y.J., 2012). Эффективным ингибитором НТФазы/геликазы оказался кверцетин, причем замена 7-OH-группы на арилметильные остатки существенно повысила такую активность (Lee C. et al., 2009).

Еще одной возможной точкой приложения таргетспецифичных соединений могут быть механизмы окончательной сборки и выхода вирионов. Так, показано, что производные кемпферола, в частности его гликозиды, ингибируют образование катионизбирательных ионных каналов, формируемых при репродукции SARS-CoV и участвующих в высвобождении вирионов из клетки (Schwarz S. et al., 2014).

Следует отметить также и другие аспекты действия флавоноидов, помимо их противовирусных эффектов, опосредуемых вышеуказанными разнообразными механизмами. Так, L. Cheng и соавторы (2020) отмечают, что благодаря противовоспалительным эффектам флавоноидов они могут оказать благотворный эффект в условиях инфекции SARS-CoV-2, предотвращая цитокиновый штурм, который, как полагают, играет немаловажную роль в патогенезе коронавирусной инфекции. В экспериментах *in vivo* нарингин значительно снижал уровень индуцированных липополисахаридом провоспалительных цитокинов.

Нередко, сравнивая эффективность разработанных противовирусных химиопрепаратов с таковой у индивидуальных флавоноидов и их производных, отмечают более высокую специфичность взаимодействия химиотерапевтических средств с мишеними, не учитывая относительно более высокую токсичность и наличие побочных эффектов при применении таких средств. Между тем, потенциал взаимодействия флавоноидов в определенных модельных системах, по данным молекулярного докинга, может быть не ниже, чем у специфических синтезированных веществ, применяемых как противовирусные препараты, как это было показано при сопоставлении энергии связывания флавоно-

идов и озельтамивира с активным центром нейраминидазы ви- руса гриппа (Sadati S.M. et al., 2019). Уже показано, что ряд син- тетических производных на основе флавоноидов обладает более высокой эффективностью на модели коронавирусов по сравне-нию с исходными веществами природного происхождения (Park H.R. et al., 2012).

Вышеизложенное свидетельствует о перспективности и це- лесообразности изучения противовирусной активности флаво- ноидов 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 мишениями, что в еще большей степе- ни позволяет реализовать преимущества полимишеневых механизмов действия этих соединений. Учитывая сложную структуру молекул флавоноидов, можно предположить вклад различных фармакофоров (химических группировок) в реали- зацию 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 ис- следуемых флавоноидных композиций является препарат Про- тефлазид, разработанный в Украине фирмой «Экофарм». Ком- позиция 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 таксо- номических групп, а также выявить *in silico* наиболее перспек- тивные ферментативные мишени и охарактеризовать эффектив- ность взаимодействия отдельных флавоноидных компонентов Протефлазида с соответствующими мишениями (Пальчиковсь- ка Л.Г. та співавт., 2013; Trokhymchuk T. et al., 2017).

В сложившейся ныне ситуации представляло интерес из-учить *in vitro* влияние данного флавоноидного препарата в си- стеме 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 коронавируса- ми 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 из-учения *in silico* взаимодействия активных структур — компонентов Протефлазида с 3C-подобной протеазой коронавируса че- ловека.

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 IgID<sub>50</sub> с индексом селективности 60. В дозах, инги- бирующих репродукцию вируса, препарат не проявляет цитоток- сичности 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 ви- русом ТГС клеток СПЭВ вызывает значительный апoptоз 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 важ- ными 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 3C-подобная про- теаза 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», депо- нированым 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 ли- ганда, в качестве которого применяли базовое флавоноидное соединение препарата Протефлазид.

Методом молекулярного докинга в кристаллическую струк- туру протеазы nCoV2019 было показано, что лиганд хорошо рас- полагается в кристаллическом кармане протеазы, образуя водо- родные связи с остатками Ser 144, Gly 143, и располагается между каталитическими остатками His 163, Asn 142 и Cys 145, и образует двумя гидроксилами катехола водородные связи с остатком Glu 166, что свидетельствует об ингибировании глав- ной 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](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. Virol. J., 8: 460. doi: 10.1186/1743-422X-8-460.
- 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 angioten- sin-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<sup>pro</sup> 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 treat- ment 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 pharmaco- phore space of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) NTPase/helicase by dihydroxychromone 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 its antioxidation. *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](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-aryl methyl quercetin 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.

**Ramalho 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. 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.

**Ziebahr J., Snijder E.J., Gorbaleyna A.E.** (2000) Virus-encoded proteases 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

**O.M. Дерябін, М.П. Завелевич, Д.Б. Старосила, Л.Г. Пальчиковська, 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 інші похідні інгібують *in vitro* репродукцію коронавірусів тварин і людини. Виявлено специфічні мішенні 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 вірусспецифічної протеази, що відіграє важливу роль у процесі репродукції коронавірусів. Розглянуто перспективи використання флавоноїдів та інших 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 іхньої дії. Наведено дані власного пілотного проекту із дослідження впливу флавоноїдів вітчизняного флавоноїднимісного препарату Протефлазід на репродукцію коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней і вивчення *in silico* взаємодії активних структур – компонентів Протефлазіду із ЗС-подібною протеазою коронавірусу людини.

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

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

**O.M. Deriabin, M.P. Zavelych, D.B. Starosyla, L.G. Palchykovska, M.O. 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:

Рыбалко 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