



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه برای دریافت درجه دکتری داروسازی

عنوان:

آنالیز کنفورماسیونی و محاسبات تابعی چگالی الکترونی ترکیبات بی فلاونوئیدی به عنوان مهار کننده های پروتئاز SARS-CoV2

استاد راهنما:

دکتر نیما رزاقی اصل

استاد مشاور:

دکتر منصور میران

نگارش:

طاها وهاب زاده آراسته

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تقدیم به :

پدرم که یادش جاودانه در خاطرم خواهد ماند...
مادرم که فداکارانه آرام بخش لحظه هایم بود...
همسر مهربانم که سایه مهربانی اش سایه سار
زندگی ام می باشد...
و خواهر عزیزم که وجودش موجب دلگرمی این
راه است...

از اساتید گرانقدرم جناب آقای دکتر نیما
رزاقی اصل، مشوق همیشگی و بی منت
بنده در تمامی دوران تحصیل و دکتر
منصور میران بسیار سپاسگزارم چرا که
بدون راهنمایی های ایشان تکمیل این
پایان نامه بسیار دشوار می بود؛ برای
ایشان از خداوند سلامت، سعادت و
توفیقات روز افزون خواهانم و لطف و
مهربانی بی شائبه شان همیشه در خاطر
خواهد ماند.

چکیده فارسی

مقدمه: با توجه به موفقیت های محدود در توسعه داروهای ضد ویروس علیه بیماری کووید-۱۹، استفاده از ساختار های گیاهی توجه بیشتری را به خود معطوف کرده است. علی رغم توزیع اندک در قلمرو گیاهی، بی فلاونوئیدها متابولیت های ثانویه ارزشمندی با قابلیت پیشگیری و درمان بیماری های مختلف هستند. با توجه به یافته های علمی، بی فلاونوئیدها نقطه شروع مناسبی در مسیر دستیابی به عوامل ضد کووید-۱۹ می باشند. بر اساس اطلاعات علمی موجود، اهمیت ساختاری آنزیم پروتئاز 3-chemotrypsin-like (3CLpro) در بیوسنتز RNA ویروسی، پتانسیل آن را به عنوان یک هدف مهاری در SARS-CoV-2 افزایش داده است و از این رو توسعه مولکول هایی که قادر باشند تا با قدرت بالا و به طور اختصاصی به سایت مذکور اتصال یابند، مورد توجه محققین است.

روش کار: در این پروژه مجموعه ترکیبات مورد مطالعه شامل ۱۱۵ مشتق مهم بی فلاونوئیدی با فعالیت بیولوژیکی بودند که تحت آنالیز کیفی و کمی از نظر اتصال به باندینگ سایت SARS-CoV-2 3CLpro قرار گرفتند. ویژگی های دارو همانندی ترکیبات منتخب توسط سرور محاسباتی SwissADME مورد بررسی قرار گرفت. مشتقات بی فلاونوئیدی تحت شبیه سازی داکینگ مولکولی با نرم افزار Autodock4.2 قرار گرفتند و ساختارهای برتر از نظر قدرت اتصال به جایگاه لیگاند کو-کریستالوگرافی مشخص گردید. به منظور اعتبارسنجی نتایج داکینگ و بررسی پایداری کمپلکس های برتر، شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) به مدت ۵۰ نانو ثانیه در محیط آبی انجام گردید. پس از حصول به کمپلکس های پایدار لیگاند-آنزیم، در فاز نهایی مطالعه، قدرت برهمکنش مولکولی در سطح لیگاند-اسید آمینه برای کمپلکس های پایدار با استفاده از روش تابعیت چگالی الکترونی (DFT) توسط برنامه Gaussian 09 مورد محاسبه قرار گرفت.

یافته ها: بر اساس انرژی باندینگ، Garciniaflavone C (ΔG_b -۱۲/۶۶ kcal/mol)، 8,8''-biapigenil و 7,7'',4'''-tri-O-methylagathisflavone (ΔG_b -۱۲/۱۶ kcal/mol) به عنوان ترکیبات برتر انتخاب گردیدند. مطالعات دینامیک مولکولی نشان داد که Glu166 تنها اسید آمینه برهمکنش دهنده ای بود که در الگوی اتصال هر ۳ لیگاند برتر با انرژی اتصال جاذبه ای (≤ 0) پایداری نشان داد. ساختارهای برتر بی فلاونوئیدی حداقل با یکی از اسیدهای آمینه کاتالیتیک SARS-CoV-2 3CLpro (His41 و Cys145) برهمکنش دادند. بر اساس شاخص گزینش پذیری 7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone، گزینش پذیری بیشتری نسبت به سایر بی فلاونوئیدها در اتصال به SARS-CoV2 3CLpro در مقایسه با SARS-CoV-1 3CLpro نشان داد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این تحقیق مشخص نمود که Garciniaflavone C، 8,8''-biapigenil و 7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone کمپلکس های پایداری با آنزیم پروتئاز اصلی SARS-CoV2 تشکیل می دهند. همچنین کنفورماسیون های باندینگ ترکیبات بی فلاونوئیدی تحت مطالعه قادر بودند تا به صورت تجمعی حجم قابل توجهی از باندینگ سایت آنزیم پروتئاز اصلی SARS-CoV-2 را اشغال نمایند. این

مسئله پتانسیل مشتقات بی فلاونوئیدی مهم را در طراحی ترکیبات هیبریدی با قابلیت اتصال بهینه و مهار آنزیم پروتئاز اصلی SARS-CoV2 نشان می دهد که می تواند در تحقیقات بعدی مورد توجه قرار گیرد. در حالی که فعالیت بیولوژیکی و مکانیسم آن در اکثر بی فلاونوئیدها نیازمند تحقیق و مطالعات بیشتر است، نتایج حاصل از این مطالعه پتانسیل بالای ترکیبات بی فلاونوئیدی در اتصال و احتمالاً مهار SARS-CoV2 3CLpro را با توجه به ویژگی های مهم ساختاری آنها نشان می دهد.

کلید واژه ها: SARS-CoV-2، 3CLpro، بی فلاونوئید، انرژی آزاد اتصال، دینامیک مولکولی، تابعیت چگالی الکترونی

فهرست مطالب

فصل ۱- مقدمه	۱
۱-۱- بیماری های عفونی	۲
۱-۲- عفونت های ویروسی	۴
۱-۳- کرونا ویروس	۶
۱-۴- SARS و MERS	۹
۱-۵- Covid-19	۱۱
۱-۵-۱- چرخه سلولی SARS-CoV-2	۱۱
۱-۵-۲- پاتوژن SARS-CoV-2	۱۴
۱-۵-۳- واریانت های SARS-CoV-2	۱۶
۱-۵-۳-۱- واریانت آلفا	۱۸
۱-۵-۳-۲- واریانت دلتا	۱۹
۱-۵-۳-۳- واریانت بتا	۱۹
۱-۵-۳-۴- واریانت گاما	۲۰
۱-۵-۳-۵- واریانت اومیکرون	۲۰

----- SARS-CoV-2 از پیشگیری از ۱-۵-۴	۲۱
۲۲ ----- SARS-CoV-2 درمانی های روش های ۱-۵-۵	
----- SARS-CoV-2 دارو های ضد ویروس ۱-۵-۵-۱	۲۳
----- SARS-CoV-2 آنتی بادی های خنثی کننده ۱-۵-۵-۲	۲۷
----- عوامل تعدیل کننده سیستم ایمنی ۱-۵-۵-۳	۲۹
----- SARS-CoV-2 واکسن ۱-۵-۶	۳۳
----- پروتئاز اصلی SARS-CoV-2 (3CLpro) ۱-۶	۳۶
----- ترکیبات بی فلاونوئیدی ۱-۷	۳۸
----- اثر ضد ویروسی بی فلاونوئید ها ۱-۸	۳۹
----- مدل سازی مولکولی و طراحی مجازی دارو ۱-۹	۴۳
----- غربالگری مجازی براساس لیگاند (LBVS) ۱-۹-۱	۴۵
----- غربالگری مجازی براساس ساختار (SBVS) ۱-۹-۲	۴۵
۴۶ ----- داکینگ مولکولی ۱-۹-۳	
۴۷ ----- دینامیک مولکولی ۱-۹-۴	
۴۷ ----- مکانیک کوانتمی ۱-۹-۵	

۱-۱۰-اهداف و فرضیات	۴۸
۱-۱۰-۱-هدف کلی	۴۸
۱-۱۰-۲-اهداف اختصاصی	۴۸
۱-۱۰-۳-اهداف کاربردی	۴۸
۱-۱۰-۴-فرضیات و سوالات تحقیق	۴۹
فصل ۲- مواد و روش ها	۵۰
۲-۱- ساختار های بی فلاونوئیدی	۵۱
۲-۱-۱- آماده سازی ساختار های بی فلاونوئیدی	۵۱
۲-۲- انتخاب هدف پروتئین	۵۲
۲-۳- داکینگ مولکولی	۵۳
۲-۴- دینامیک مولکولی	۵۴
۲-۴-۱- نرم افزار گرومکس و آماده سازی فایل های مورد نیاز	۵۵
۲-۴-۲- آنالیز نتایج دینامیک مولکولی	۵۶
۲-۵- روش تابعیت چگالی الکترونی	۵۶
فصل ۳- نتایج	۵۹

۱-۳- اعتبار سنجی فرایند داکینگ مولکولی	۵۹
۳-۲- داروهمانندی ترکیبات بی فلاونوئیدی	۶۰
۳-۳- نتایج داکینگ مولکولی	۶۲
۳-۴- نتایج دینامیک مولکولی	۷۰
۳-۴-۱- انحراف ریشه مجذور میانگین (RMSD)	۷۱
۳-۴-۲- نوسان ریشه مجذور میانگین (RMSF)	۷۳
۳-۴-۳- شعاع ژیراسیون (R_g)	۷۶
۳-۴-۴- برهمکنش های هیدروژنی	۷۸
۳-۴-۵- رفتار سطح پروتئین (SASA)	۸۰
۳-۴-۶- آنالیز مقایسه ای فرم آپو و هالو آنزیم	۸۵
۳-۴-۷- کنفورماسیون پایدار اتصال ترکیبات بی فلاونوئیدی	۸۶
۳-۵- نتایج تابعیت چگالی الکترونی	۸۹
۳-۶- گزینش پذیری لیگاند ها بر SARS-CoV2 3CLpro	۹۵
فصل ۴- بحث و نتیجه گیری	۹۸

----- ۴-۱- بحث و نتیجه گیری ----- ۹۹

----- ۴-۲- پیشنهادات ----- ۱۰۷

----- ۱۰۸ ----- منابع

----- ۱۱۳ ----- پیوست ها

فهرست علائم، نشانه ها و اختصارات

WHO: World Health Organization

3CLpro: Chymotrypsin Like Protease

SARS-CoV-2: Sevier Acute respiratory Syndrome Corona Virus 2

RMSD: Root Mean Square Deviation

RMSF: Root Mean Square Fluctuation

R_g: Gyration Radius

SASA: Solvent Accessible Surface Area

QM: Quantum Mechanical

MD: Molecular Dynamic

DFT: Density Functional Theory

PLIP: Protein Ligand Interaction Profiler

SBDD: Structure Based Drug Design

PDB: Protein Data Bank

HBA: Hydrogen Bond Acceptor

HBD: Hydrogen Bond Donor

فهرست جدول ها

- جدول ۱-۱. لیست بیماری هایی که در اولویت تحقیق و توسعه دارویی قرار دارند ----- ۳
- جدول ۱-۲. سویه های گزارش شده توسط سازمان جهانی بهداشت -----
۱۷
- جدول ۱-۳. اثرات ترکیبات بی فلاونوئیدی بر ویروس های مختلف ----- ۳۷
- جدول ۳-۱. نتایج حاصل از داکینگ ۱۱۵ ترکیب بی فلاونوئیدی منتخب بر روی پروتئاز اصلی -----
۶۲
- جدول ۳-۲. اسید آمینه هایی که حداکثر تحرک را در کمپلکس های Garciniaflavone C, 8,8''-biapigenil
7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone نشان دادند -----
۷۵
- جدول ۳-۳. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای برهمکنش های هیدروفوب 8,8''-biapigenil
در باندینگ سایت SARS-CoV2 3CLpro -----
۹۱
- جدول ۳-۴. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای پیوند های هیدروژنی 8,8''-biapigenil در باندینگ
سایت SARS-CoV2 3CLpro -----
۹۱ --
- جدول ۳-۵. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای پیوند های π -stacking 8,8''-biapigenil در باندینگ
سایت SARS-CoV2 3CLpro -----
۹۰
- جدول ۳-۶. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای برهمکنش های هیدروفوب Garciniaflavone C در
باندینگ سایت SARS-CoV2 3CLpro -----
۹۱

جدول ۳-۷. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای پیوند های هیدروژنی C Garciniaflavone در باندینگ

سایت SARS-CoV2 3CLpro ----- ۹۳

جدول ۳-۸. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای برهمکنش های هیدروفوب

7,7'',4'''-tri-O-methylagathisflavone در باندینگ سایت SARS-CoV2 3CLpro ----- ۹۴

جدول ۳-۹. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای پیوند های هیدروژنی 7,7'',4'''-tri-O-

methytagathisflavone در باندینگ سایت SARS-CoV2 3CLpro -----

۹۵

جدول ۳-۱۰. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای پیوند های 7,7'',4'''-tri-O- π -stacking

methytagathisflavone در باندینگ سایت SARS-CoV2 3CLpro -----

۹۵

فهرست نمودار ها و شکل ها

- شکل ۱-۱. ساختار گلیکوپروتئین اسپایک SARS-CoV2 3CLpro -----
۱۲
- شکل ۱-۲. ساختار ژنوم SARS-CoV2 3CLpro -----
۱۳
- شکل ۱-۳. ساختار داروی Molmupiravir -----
۲۳
- شکل ۱-۴. (a) ساختار داروی (b) nirmatrelvir (c) ritonavir ساختار داروی -----
۲۴
- شکل ۱-۵. ساختار داروی remdesivir -----
۲۵
- شکل ۱-۶. ساختار داروی هیدروکسی کلروکین -----
۲۵
- شکل ۱-۷. (a) ساختار داروی (b) ritonavir (c) lopinavir ساختار داروی -----
۲۶
- شکل ۱-۸. ساختار داروی ivermectin -----
۲۷
- شکل ۱-۹. ساختار ترکیب amentoflavone -----
۳۹
- شکل ۱-۱۰. (a) ساختار ترکیب (b) robustaflavone (c) ginkgetin ساختار ترکیب -----
۴۰

شکل ۱-۱۱. ساختار ترکیب bilobetin -----

۴۱

شکل ۱-۱۲. (a) ساختار ترکیب dihydroamentoflavone (b) ساختار ترکیب putraflavone -----

۴۱

شکل ۲-۱. فاکتورهای اعمال شده در انتخاب فایل ماکرومولکول -----

۵۲

شکل ۳-۱. کنفورماسیون باندینگ ساختار فلاونوئیدی Biacalein در حالت های داک شده (سبز) و کو-کریستالوگرافی

(خاکستری) در باندینگ سایت آنزیم SARS-CoV-2 3CLpro با RMSD ۱/۸۳۸ آنگستروم (PDB code)

----- (6m2n)

----- ۵۹

شکل ۳-۲. نمودار برخی از پارامترهای فیزیکوشیمیایی برای ساختارهای بی فلاونوئیدی مورد مطالعه (۱-۱۱۵)، Log

----- P_o/W میانگین تفاوت روش های پیش بینی کننده می باشد.

----- ۶۱

شکل ۳-۳. شکل a: کنفورماسیون کریستالوگرافی اتصال Biacalein در اکتیو سایت پروتئاز اصلی SARS-CoV-2. شکل b:

کنفورماسیون تجمعی اتصال ۱۱۵ ترکیب بی فلاونوئیدی در اکتیو سایت پروتئاز اصلی SARS-CoV-2 که حجم قابل توجهی از

باندینگ سایت را پوشانده اند -----

۶۷

شکل ۳-۴. ساختار ترکیبات بی فلاونوئیدی برتر. (a) Garciniaflavone C (b) 7,7'',4'''-tri-O-

----- 8,8''-biapigenil (c methylagathisflavone) ۶۸

شکل ۳-۵. برهمکنش های ترکیبات بی فلاونوئیدی برتر (a) Garciniaflavone C (b) 7,7'',4'''-tri-O-

----- 8,8''- biapigenil (c methylagathisflavone) در باندینگ سایت پروتئاز اصلی SARS-CoV-2 (کد فایل پروتئینی

----- (6M2N) ۶۹

شکل ۳-۶. نمودار RMSD اسکلت اصلی پروتئین SARS-CoV-2 3CLpro برای A) Garciniaflavone C (آبی)، 7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone (نارنجی) و 8,8''-biapigenil (سبز) و B) تمامی اتم های داک گذاشته شده Garciniaflavone C (آبی)، 7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone (نارنجی) و 8,8''-biapigenil (سبز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD-----

۷۳

شکل ۳-۷. نمودار RMSF A) به ازای اتم های کربن آلفا اسید آمینه های SARS-CoV-2 3CLpro برای Garciniaflavone C (آبی)، 7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone (نارنجی) و 8,8''-biapigenil (سبز) و B) تمامی اتم های داک گذاشته شده Garciniaflavone C (آبی)، 7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone (نارنجی) و 8,8''-biapigenil (سبز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD-----

۷۶-----

شکل ۳-۸. نمودار شعاع ژیراسیون وابسته به زمان SARS-CoV-2 3CLpro برای Garciniaflavone C (آبی)، 7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone (نارنجی) و 8,8''-biapigenil (سبز) در طول شبیه سازی MD-----

۷۷

شکل ۳-۹. تعداد پیوند های هیدروژنی بین مولکولی ($R_{D-A} \leq 0.41 \text{ \AA}$) بین SARS-CoV-2 3CLpro و A) Garciniaflavone C (آبی)، B) 7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone (نارنجی) و C) 8,8''-biapigenil (سبز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD-----

۷۸-----

شکل ۳-۱۰. تعداد پیوند های هیدروژنی درون مولکولی ($R_{D-A} \leq 0.41 \text{ \AA}$) SARS-CoV2 3CLpro برای Garciniaflavone C (آبی)، 7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone (نارنجی) و 8,8''-biapigenil (سبز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD-----

۷۹---

شکل ۳-۱۱. مساحت سطح وابسته به زمان در دسترس حلال SARS-CoV2 3CLpro برای Garciniaflavone C (آبی)، 7,7'',4'''-tri-o-methylagathisflavone (نارنجی) و 8,8''-biapigenil (سبز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD -----

۸۱ --

شکل ۳-۱۲. SASA وابسته به زمان برای Garciniaflavone C (آبی)، 7,7'',4'''-tri-O-methylagathisflavone (نارنجی) و 8,8''-biapigenil (سبز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD -----

شکل ۳-۱۳. میزان Δ RMSD (تفاوت بین فرم های آپو و holo) اسکلت اصلی پپتیدی در SARS-CoV2 3CLpro برای Garciniaflavone C (آبی)، 7,7'',4'''-tri-O-methylagathisflavone (نارنجی) و 8,8''-biapigenil (سبز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD، به منظور مقایسه، خط نشان دهنده Δ RMSD برابر صفر به رنگ قرمز به نمایش در آمده است -----

۸۴

شکل ۳-۱۴. نمودار Δ RMSF اتم های کربن آلفا اسید آمینه های SARS-CoV2 3CLpro برای Garciniaflavone C (آبی)، 7,7'',4'''-tri-O-methylagathisflavone (نارنجی) و 8,8''-biapigenil (سبز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD -----

۸۵

شکل ۳-۱۵. تصویر سه بعدی از پایدارترین کنفورماسیون های اتصال برای (a) Garciniaflavone C ، (b) 7,7'',4'''-tri-O-methylagathisflavone و (c) 8,8''-biapigenil درون بایندیگ سایت SARS-CoV2 3CLpro (کد PDB: 6M2N) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD. کمپلکس های Garciniaflavone C، 7,7'',4'''-tri-O-methylagathisflavone و 8,8''-biapigenil به ترتیب ۲۹٪، ۲۲٪ و ۲۳٪ درصد از اسید آمینه های متصل در بایندیگ سایت را نسبت به کنفورماسیون داکینگ حفظ کرده اند -----

۸۸ -----

شکل ۳-۱۶. انرژی اتصال 8,8''-biapigenil با اسید آمینه های باندینگ سایت SARS-CoV2 3CLpro ----

۹۱

شکل ۳-۱۷. انرژی اتصال Garciniaflavone C با اسید آمینه های باندینگ سایت SARS-CoV2 3CLpro --

۹۲

شکل ۳-۱۸. انرژی اتصال 7,7'',4'''-tri-O-methylgathisflavone با اسید آمینه های باندینگ سایت SARS-

----- CoV2 3CLpro

۹۵

شکل ۳-۱۹. مقایسه برهمکنش های Garciniaflavone C در جایگاه فعال SARS-CoV1 3CLpro با SARS-

----- CoV2 3CLpro

۹۶

شکل ۳-۲۰. مقایسه برهمکنش های 7,7'',4'''-tri-O-methylgathisflavone در جایگاه فعال SARS-

----- SARS-CoV2 3CLpro با CoV1 3CLpro

۹۷-----

شکل ۳-۲۱. مقایسه برهمکنش های 8,8''-biapigenil در جایگاه فعال SARS-CoV1 3CLpro با SARS-

----- CoV2 3CLpro

۹۷

شکل ۴-۱. تصویر سه بعدی از مسیر های باندینگ برای (a) Garciniaflavone C ، (b) 7,7'',4'''-tri-O-

methylgathisflavone و (c) 8,8''-biapigenil درون باندینگ سایت SARS-CoV2 3CLpro در زمان های

----- ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ نانو ثانیه از شبیه سازی دینامیک مولکولی

۱۰۱

شکل ۴-۲. برهمکنش ها و انرژی اتصال لیگاند-اسید آمینه برای Garciniaflavone C. نقطه چین های قرمز، سبز

----- و آبی به ترتیب بیانگر برهمکنش های π -stacking، هیدروفوبیک و هیدروژنی هستند

۱۰۳

شکل ۴-۳. برهمکنش ها و انرژی اتصال لیگاند-اسید آمینه برای 7,7'',4'''-tri-O-methylgathisflavone . نقطه

چین های قرمز، سبز و آبی به ترتیب بیانگر برهمکنش های π -stacking، هیدروفوبیک و هیدروژنی هستند -----

۱۰۴

شکل ۴-۴. برهمکنش ها و انرژی اتصال لیگاند-اسید آمینه برای 8,8''-biapigenil نقطه چین های قرمز، سبز و آبی

به ترتیب بیانگر برهمکنش های π -stacking، هیدروفوبیک و هیدروژنی هستند. -----

۱۰۵