

## The Study of the Binding Ability of Antimicrobial Peptides to Spike Protein of the Coronavirus by Docking and Molecular Dynamics Simulation

Mortezaali Sara<sup>1</sup>, Zarrabi Mahboobeh<sup>2\*</sup>

• Received: 25 Dec 2023

• Accepted: 5 Mar 2024

**Introduction:** Since the start of 2020, SARS-CoV-2 has infected a significant number of individuals, prompting extensive research. Antimicrobial peptides can be considered as a promising treatment for emerging viral pathogens due to their safety, efficacy, and specificity.

**Method:** In this study, first, 104 natural antiviral peptides were chosen from APD databases. Then, the third structure of proteins was modeled by PEP-FOLD 3 server. The structures were refined and optimized for docking operation. Subsequently, peptide-protein docking was performed using AutoDock Vina. The most favorable peptide-protein complex, chosen based on binding energy, was employed for molecular simulation using GROMACS. The simulation was carried out for 100 ns at 310° K and pH=7. Gromos54a7 force field was used in this study and the SPC water model was used as solvent.

**Results:** The obtained results from molecular dynamics examine the stability of complex structure and energy calculations. RMSD, RMSF, radius of gyration, and SASA analyses indicate the stability of the peptide-protein complex during the simulation. Additionally, LJ, CL, HBond, and  $\Delta G$  analyses were conducted to calculate the energy interactions between the peptide and the Spike protein.

**Conclusion:** The results indicate that antimicrobial peptides can effectively bind to the SARS-CoV-2 spike protein, acting as inhibitors with a favorable binding energy. Consequently, these peptides can be employed for therapeutic and experimental studies of COVID-19.

**Keywords:** Antimicrobial peptide, Spike protein, Molecular dynamics simulation, Docking, COVID-19

• **Citation:** Mortezaali S, Zarrabi M. The Study of the Binding Ability of Antimicrobial Peptides to Spike Protein of the Coronavirus by Docking and Molecular Dynamics Simulation. Journal of Health and Biomedical Informatics 2024; 10(4): 386-99. [In Persian] doi: 10.34172/jhbmi.2024.07

1. MSc. in Microbial Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

2. Ph.D. in Biophysics, Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

\*Corresponding Author: Mahboobeh Zarrabi

Address: Alzahra University, Tehran, Iran

• Tel: 02185692722

• Email: mzarrabi@alzahra.ac.ir

## بررسی قابلیت اتصال پپتیدهای ضد میکروبی به پروتئین spike ویروس کرونا با روش داکینگ و شبیه سازی دینامیک مولکولی

سارا مرتضی علی<sup>۱</sup>، محبوبه ضرابی<sup>۲\*</sup>

• دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۴ • پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

**مقدمه:** از زمان شروع سال ۲۰۲۰، SARS-CoV-2 به طور قابل توجهی باعث بیماری تعداد زیادی از افراد شده و تحقیقات گسترده‌ای را به سوی خود جلب کرده است. پپتیدهای ضد میکروبی به دلیل ایمنی، کارایی و ویژگی منحصر به فرد خود به عنوان یک راه امیدوارکننده برای درمان پاتوژن‌های ویروسی در حال ظهور شناخته می‌شوند.

**روش:** در این مطالعه ابتدا ۱۰۴ پپتید طبیعی ضد میکروبی از پایگاه‌های داده APD انتخاب شدند. سپس با سرور pefold3 ساختار سوم پپتیدها مدل سازی شد. ساختارها پس از اصلاح و بهینه‌سازی آماده عملیات داکینگ شدند. متعاقباً داکینگ پپتید-پروتئین با نرم‌افزار اتوداک وینا انجام شد. بهترین کمپلکس پپتید-پروتئین که انرژی اتصال مناسبی در خروجی داکینگ داشت برای شبیه‌سازی مولکولی با برنامه گرومکس انتخاب شد. شبیه‌سازی به مدت ۱۰۰ نانوثانیه در دمای ۳۱۰ درجه کلوین و pH: 7 انجام شد. از میدان نیروی gromos54a7 و مدل آب spc به عنوان حلال استفاده گردید.

**نتایج:** نتایج به دست آمده از دینامیک مولکولی، پایداری ساختار کمپلکس‌ها و محاسبات انرژی را بررسی می‌کند. آنالیزهای RMSD، RMSF، شعاع ژیراسیون و SASA نشان داد که کمپلکس پپتید-پروتئین در طی شبیه‌سازی پایدار است و آنالیزهای CL، LJ، HBond و  $\Delta G$  جهت محاسبه انرژی بین پپتید و پروتئین انجام شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند به عنوان مهارکننده و با انرژی اتصال مطلوبی به پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 متصل شوند و در نتیجه، این پپتیدها می‌توانند برای مطالعات درمانی و تجربی Covid-19 استفاده شوند.

**کلیدواژه‌ها:** پپتید ضد میکروبی، پروتئین اسپایک، شبیه سازی دینامیک مولکولی، داکینگ، کووید-۱۹

**ارجاع:** مرتضی علی سارا، ضرابی محبوبه. بررسی قابلیت اتصال پپتیدهای ضد میکروبی به پروتئین spike ویروس کرونا با روش داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۰(۴): ۳۸۸-۳۹۹. doi: 10.34172/jhbmi.2024.07

۱. کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲. دکترای بیوفیزیک، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: محبوبه ضرابی

آدرس: تهران، خیابان ده ونک، دانشگاه الزهراء (س)، دانشکده علوم زیستی

• Email: mzarrabi@alzahra.ac.ir

• شماره تماس: ۰۲۱۸۵۶۹۲۷۲۲

## مقدمه

در پایان سال ۲۰۱۹ و ابتدای سال ۲۰۲۰، موارد انسانی متعددی از ابتلا به عفونت کروناویروس جدید گزارش شد؛ که این اتفاق برای اولین بار در بازار عمده فروشی غذاهای دریایی Hunanan در ووهان چین مشاهده شد [۱]. این کروناویروس ابتدا در ۱۲ ژانویه ۲۰۲۰ به عنوان novel-2019-nCoV یا Coronavirus ۲۰۱۹ توسط سازمان بهداشت جهانی (<https://www.who.int/>) یا WHO نام‌گذاری شد. سپس در ۱۱ فوریه ۲۰۲۰ سازمان WHO رسماً این بیماری جدید را به عنوان بیماری ۲۰۱۹ کروناویروس یا COVID-19 نام‌گذاری کرد و گروه مطالعاتی کروناویروس نیز در همین تاریخ برای کروناویروس جدید نام SARS-CoV-2 را پیشنهاد کرد [۲].

کرونا ویروس‌ها از نظر ژنتیکی و سرولوژیکی به چهار جنس؛  $\alpha$ ،  $\beta$ ،  $\gamma$  و  $\delta$  تقسیم می‌شوند. عفونت کروناویروس انسانی ناشی از  $\alpha$  و  $\beta$  است. عفونت‌های کروناویروسی به طور کلی با عفونت‌های دستگاه تنفسی همراه است؛ که معمولاً دارای علائمی شامل تب، سردرد و سرفه است. همه این ویروس‌ها متعلق به زیرخانواده Coronavirinae در خانواده Coronaviridae هستند [۱]. پیش از SARS-CoV-2، ۶ کروناویروس به عنوان ویروس‌های انسانی شناخته شده بودند که در این میان دو بتاکروناویروس SARS و MERS منجر به عفونت شدید و خطرناک دستگاه تنفسی می‌شدند [۳].

مقایسه بین ژنوم کروناویروس‌های SARS و MERS، نشان می‌دهد که SARS-CoV-2 از نظر کل توالی ژنومی به کروناویروس شبه SARS خفاش، نزدیک‌تر است. بیش‌تر پروتئین‌های رمزگذاری شده ژنومی در SARS-CoV-2 شبیه SARS است؛ اگرچه تفاوت‌هایی نیز دارند [۴].

ژنوم کامل SARS-CoV-2 شامل یک RNA تک رشته‌ای مثبت با طول ۲۶ تا ۳۲ کیلوباز است و شامل یک تعداد متغیر از ۶ تا ۱۱ قالب خوانش باز یا (open reading frame) ORF هستند. دو سوم RNA ویروسی که عمدتاً در ORF اول یعنی ORF1a/b قرار دارد؛ دو پلی پروتئین pp1 و pp1ab را ترجمه می‌کند و ۱۶ پروتئین غیرساختاری (nsp) را کد می‌کند؛ در حالی که بقیه ORFها، پروتئین‌های جانبی و ساختاری را کد می‌کنند. بخش باقی مانده ژنوم ویروس، ۴ پروتئین ساختاری ضروری شامل گلکوپروتئین spike، پروتئین کوچک envelope، پروتئین غشایی (m) و پروتئین نوکلئوکپسید را کد

می‌کنند. از نظر ژنومیک و فیلوژنتیک کرونا ویروس SARS با SARS-CoV-2 شباهت‌هایی به خصوص در ژن S-glycoprotein و دامین (RBD) receptor-binding دارند [۵].

کرونا ویروس‌ها چهار پروتئین ساختاری اصلی دارد؛ که آن‌ها اسپایک (S)، غشایی (M)، پوششی (E) و کپسید هسته‌ای (N) هستند. همه آن‌ها در انتهای ۳ ژنوم ویروس کدگذاری می‌شوند. پروتئین S کروناویروس SARS-CoV-2 با اندازه ۱۸۰-۲۰۰ کیلو دالتون، شامل یک N ترمینال خارج سلولی و یک دمین تراغشایی (TM) بر روی غشای ویروس و یک قطعه C ترمینال داخل سلولی کوتاه است و ساختار خارمانندی را در سطح ویروس ایجاد می‌کند. همان‌طور که پیشتر گفته شد، گلکوپروتئین S تریمر و از پروتئین‌های الحاقی بوده و واسطه اتصال به سلول میزبان است. در بیشتر کرونا ویروس‌ها پروتئین S به وسیله پروتئین‌های سلول میزبان به دو زیرواحد S1 و S2 تقسیم می‌شوند. زیرواحد S1 نسبت به S2 در کروناویروس‌ها محافظت شده‌تر است [۶]. پروتئین Spike روی سطح ویروس قرار داشته و با اتصال به (Angiotensin-converting enzyme 2) ACE2 سلول‌های میزبان انسان، واسطه ورود ویروس به سلول را فراهم می‌کند. به همین دلیل گلکوپروتئین S (Spike) توجه زیادی را به عنوان هدفی برای توسعه واکسن‌ها و داروهای ضد SARS-CoV-2 به خود جلب کرده است. اختلال در برهمکنش‌های بین گلکوپروتئین S و گیرنده ACE2 به طور بالقوه می‌تواند به استراتژی‌های درمانی جدیدی منجر شود [۷].

درمان‌های ضدویروسی از مکانیسم‌های متنوعی برای مهار ویروس و جلوگیری از تکثیر در مراحل ابتدایی بیماری استفاده می‌کنند. در این زمینه، رمدسیویر، هیدروکسی کلروکین و لوپیناویر-ریتوناویر به عنوان سه داروی اصلی ضد ویروسی برای درمان COVID-19 به کار می‌روند [۸]. در ابتدا، هیدروکسی کلروکین برای درمان کووید-۱۹ استفاده شد و نتایج رضایت بخشی نشان داد؛ اما هنوز شواهد کافی و قوی برای تضمین استفاده از این دارو به عنوان یک روش درمانی برای این بیماری وجود ندارد [۹]. رمدسیویر نیز یک داروی ضدابولا با تأیید (Food and Drug Administration) FDA است که برای درمان کروناویروس به کار می‌رود. این دارو نتایج مثبتی در کارآزمایی‌های بالینی ابتدایی نشان داد، اما مطالعات بعدی نتایج مطلوبی نداشته‌اند. با این حال، FDA استفاده اورژانسی از رمدسیویر در درمان بیماران COVID-19-

۲۰۰ پپتید ضد میکروبی علیه پروتئین Mpro کروناویروس بررسی شد که پپتیدهای منتخب داکینگ و شبیه‌سازی در مطالعات تجربی نیز اثر بخشی قابل توجهی نشان دادند [۱۵]. همچنین در مطالعه دیگری، اثر بخشی ۲۳ پپتید طبیعی (به دست آمده از زنبور وحشی) در بازدارندگی SARS-CoV-2 مورد بررسی قرار گرفت. دامین اتصال گیرنده هدف پپتیدها قرار گرفت و در نهایت نتایج قابل قبولی در مطالعه *in silico* به دست آمد [۱۶]. هدف این مطالعه، داکینگ کتابخانه پپتیدی با پروتئین اسپایک و بررسی پایداری ساختار و انرژی پپتید منتخب در بر همکنش با این پروتئین است.

### روش

در ابتدا ساختار سه بعدی پروتئین Spike کروناویروس جدید، از پایگاه داده (Protein Data Bank) PDB به آدرس (<https://www.rcsb.org/>) و با کد 6LZG دریافت شد. این ساختار دمین اتصال به گیرنده (RBD) ویروس بوده که در برهمکنش با ACE2 ساختار آن در آزمایشگاه مطالعه شده است. در فایل این پروتئین جهت آماده‌سازی مولکول برای مطالعات داکینگ، ACE2 حذف شده و بهینه‌سازی روی ساختار نهایی Spike انجام شد. در گام بعدی، کتابخانه پپتیدهای ضد میکروبی تهیه شد و برای انجام عملیات داکینگ از این ساختار پروتئین Spike در مقابل پپتیدها استفاده شد.

### مجموعه داده

برای ساخت کتابخانه پپتیدی از پایگاه داده (Antimicrobial Peptide Database) APD به نشانی (<https://aps.unmc.edu/AP/>) استفاده شد [۱۷]. پایگاه داده پپتید ضد میکروبی (APD) حاوی ۳۳۲۴ پپتید ضد میکروبی از شش سلسله حیات است که برای ترویج تحقیق، آموزش و بازیابی اطلاعات در این زمینه به واژه‌نامه، نام‌گذاری، طبقه‌بندی، جستجوی اطلاعات، پیش‌بینی، طراحی و آمار AMPها و موارد دیگر اختصاص داده شده است. داده‌های پپتیدی ذخیره شده در APD، از مقالات (PubMed، PDB، Google، و Swiss-Prot) به صورت دستی در بیش از یک دهه جمع‌آوری شده است. در مجموع ۱۰۴ پپتید ضد ویروسی طبیعی با طول بین ۵ تا ۵۰ آمینواسید از این پایگاه داده انتخاب شدند. برخی از این پپتیدها دارای ساختار سوم تعیین شده در پایگاه داده PDB بودند و ساختارشان دریافت شد و برخی دیگر فاقد ساختار سوم تجربی بودند که با سرور Pepfold3 مدل‌سازی ساختار این پپتیدها

COVID را تأیید کرده است [۱۰]. همچنین داروی لوپیناویر-ریتوناویر که برای درمان HIV کاربرد دارد، به عنوان یک گزینه در درمان COVID-19 مطرح شده است؛ اما در یک مطالعه که اثر بخشی این دارو بررسی شد، نتایج قابل قبولی در درمان کوید-۱۹ به دنبال نداشت [۱۱].

پپتیدهای ضد میکروبی (Anti Microbial Peptide) AMPs دسته‌ای از پپتیدهای کوچک‌اند (با توالی کوتاهی از ۱۰ تا ۱۰۰ اسید آمینه) که به طور گسترده در طبیعت وجود دارند و بخش مهمی از سیستم ایمنی ذاتی موجودات مختلف هستند. ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و افزایش نگرانی‌ها در مورد استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به توسعه AMPها شد؛ که چشم‌انداز خوبی در پزشکی، غذا، دامداری، کشاورزی و ... دارند [۱۲].

AMPها به عنوان یک راه‌حل امیدوار کننده برای مبارزه با میکروارگانیسم‌های مضر در نظر گرفته می‌شوند و و اثر ضد میکروبی AMPها بر روی غشای میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مختلفی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها گزارش شده است. فعالیت ضد ویروسی AMPها در برابر ویروس‌های پوشش‌دار مشخص شده است و در برخی از ویروس‌های بدون پوشش نیز اثر آن‌ها مشاهده شده است؛ چراکه AMPها برای عملکرد ضد ویروسی روی سطح ویروس قرار گرفته و گاهی وارد ویروس می‌شوند و روی پوشش ویروس به طور مستقیم اثر می‌گذارند [۱۳].

رژیدوهای بار مثبت در AMPها منجر به برهمکنش الکترواستاتیکی بین پپتید و مولکول‌های بار منفی سطح سلولی مانند سولفات‌ها می‌شود. سولفات‌ها هپاران متشکل از مولکول‌های گلیکوزامینوگلیکان است که به شدت با اتصال ویروسی مرتبط هستند؛ بنابراین AMPهایی که هپاران سولفات را مسدود می‌کنند؛ ممکن است عفونت ویروسی را نیز کاهش دهند. همچنین، AMPها می‌توانند با جلوگیری از انتشار ویروس از یک سلول به سلول دیگر (گسترش سلول به سلول) اثر ضد ویروسی خود را اعمال کنند [۱۴]. با توجه به پتانسیل درمانی پپتیدهای ضد میکروبی در عفونت‌های ویروسی، در این پژوهش با روش‌های محاسباتی مکانیسم اتصال و عملکرد این پپتیدها بر روی پروتئین ویروس بررسی شد.

تاکنون تحقیقات متعددی در رابطه با پتانسیل درمانی پپتیدهای ضد میکروبی انجام شده است. در یک مطالعه مشابه، بازدارندگی

تعادل دو مرحله‌ای NVT و NPT و تحت شرایط دمایی ۳۱۰ درجه کلوین و فشار ۱ bar به تعادل رسید. روش کوپلینگ دما، V-rescale انتخاب شد در حالی که روش کوپلینگ فشار Parrinello-Rahman در نظر گرفته شد. در نهایت شبیه‌سازی تمام سیستم در ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد.

آنالیزهای دینامیک مولکولی شامل ریشه میانگین مجذور انحرافها (RMSD) ریشه میانگین مجذور نوسانات اسید آمینه (RMSF)، شعاع ژیراسیون و SASA برای بررسی پایداری ساختار کمپلکس و Hbond، (Lennard Jones) LJ، (coulombic) CL و  $\Delta G$  برای محاسبه انرژی برهمکنش بین پپتید و Spike، مورد بررسی قرار گرفت. محاسبات RMSD، پایداری سیستم و انحراف ساختار در طول شبیه‌سازی را نسبت به ساختار اولیه نشان می‌دهد. برای این منظور تغییرات کربن آلفا ساختار پروتئینی رسپتور به تنهایی و وقتی که با پپتیدهای طبیعی همراه می‌شود، محاسبه شد. همچنین انعطاف‌پذیری ساختار بر اساس RMSF اتم‌های کربن آلفا محاسبه شد. شعاع ژیراسیون نیز که یکی از پارامترهای تعیین کننده در میزان تراکم ساختار می‌باشد، در طول مدت شبیه‌سازی به دست آمد.

#### محاسبه انرژی اتصال MMPBSA

مکانیزم مولکولی روش ناحیه سطحی پواسون - بولتزمن (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann) MM - PBSA (Surface Area) یک روش کارآمد برای محاسبه انرژی‌های آزاد سیستم‌های مولکولی متنوع است. با استفاده از ابزار g-mmpbsa و روش mmpbsa، انرژی آزاد اتصال محاسبه شد. به ترتیب ابتدا انرژی پتانسیل در حلال، حلال قطبی و حلال غیر قطبی محاسبه شد. انرژی کلی اتصال  $\Delta G$  با استفاده از محاسبه  $\Delta G$  قطبی و غیر قطبی مطابق زیر محاسبه شد [۲۲]:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{nonpolar} (\Delta G_{nps} + \Delta G_{vdw}) + \Delta G_{polar} (\Delta G_{ps} + \Delta G_{elec})$$

پس از انجام virtual screening، نتایج داکینگ بر اساس انرژی ( $\Delta H$ ) مرتب شد و بهترین نتیجه از پپتید AP00241 با انرژی اتصال ۱۲/۲ Kcal/mol - حاصل شد. این نتیجه نشان می‌دهد که پپتید AP00241 با یک برهمکنش مطلوب به

انجام شد [۱۸]. ساختار کلیه پپتیدهای کتابخانه با استفاده از نرم‌افزار MODELLER اصلاح شد [۱۹] و در نهایت با AutoDock Vina داکینگ کتابخانه پپتیدی و پروتئین اسپایک انجام شد [۲۰].

#### غربالگری مجازی (virtual screening)

جهت غربالگری مجازی، داکینگ پپتید-پروتئین با نرم‌افزار Pyrx-0.8 و الگوریتم AutoDock Vina انجام شد. کلیه فایل‌های pdb مربوط به پپتیدها و پروتئین Spike در نرم‌افزار بارگذاری شد و سپس به pdbqt تبدیل شدند. کمینه‌سازی انرژی بر روی همه ساختارهای پپتیدها انجام شد و پس از تعیین منطقه اتصال (Grid Box)، عملیات داکینگ کتابخانه پپتیدی-پروتئین S آغاز شد. منطقه اتصال داکینگ مطابق پژوهش‌های گذشته در مختصات ۴۰.۳۴، ۳۰.۸۵ و ۶.۶۱ برای اتم مرکزی در ابعاد جعبه ۳۵Å، ۵۰Å و ۳۰Å در ساختار پروتئین گیرنده تعیین شد [۲۱].

#### دینامیک مولکولی

پس از انجام عملیات داکینگ، بهترین کمپلکس به دست آمده یعنی Spike-AP00241 برای مطالعات دینامیک مولکولی انتخاب شد. معیار انتخاب این پپتید بر اساس انرژی اتصال بهتر صورت گرفت. برای انجام این محاسبات از نرم‌افزار Gromacs-5.1.1 استفاده شد. در ابتدا فایل‌های ساختاری gro رسپتور و پپتید هر کدام به تنهایی ساخته شد و سپس، در یک جعبه شبیه‌سازی واحد در کنار یکدیگر قرار گرفتند. هر کدام از ساختارها لیبل (label) شدند. حجم باکس شبیه‌سازی  $nm^2$  ۶۱۳/۳۷ و مکعبی شکل در نظر گرفته شد. همچنین از میدان نیروی Gromos54a7 و مولکول آب (Simple Point) SPC (Charge Mode) در pH=7 استفاده گردید و به دنبال آن سیستم با مولکول‌های NaCl خنثی شد. سپس کمینه‌سازی انرژی انجام شد تا اطمینان حاصل شود که محیط هیچ برخورد فضایی یا هندسه نامناسبی ندارد و پس آن در یک

#### نتایج

نتایج این مطالعه در سه بخش داکینگ، دینامیک مولکولی و MM-PBSA بررسی شد.

#### داکینگ

همچنین در ادامه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی این پپتیدهای منتخب نیز محاسبه شدند که شامل طول پپتید، شاخص آلیفاتیک، نقطه ایزوالکتریک، چگالی بار، جرم مولکولی، Aromaticity، شاخص Instability و شاخص Boman است که در جدول ۲ قابل مشاهده است.

پروتئین اسپایک از ناحیه گریدباکس متصل شده است. ۴ پپتید AP00408، AP00405، AP01066 و AP00257 به ترتیب جایگاه دوم تا پنجم را به دست آوردند که نتایج  $\Delta H$  آن در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱: نتایج داکینگ ۵ پپتید برتر

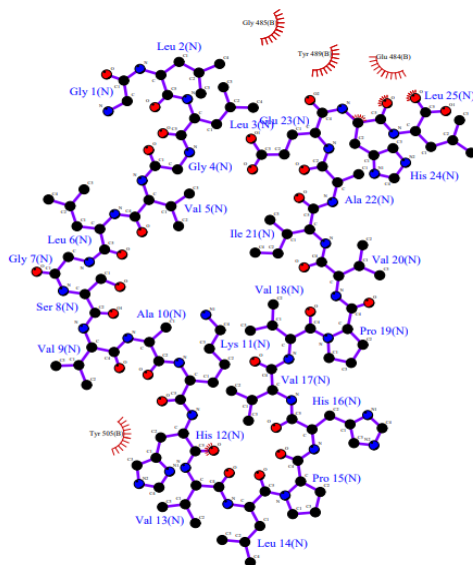
| کد پپتید | نام پپتید         | انرژی اتصال | توالی                          | منشأ پپتید                      |
|----------|-------------------|-------------|--------------------------------|---------------------------------|
| AP00241  | Caerin 1.2        | -۱۲/۲       | GLLGVLGSVAKHVLPHVVPVIAEHL      | قورباغه <i>Litoria caerulea</i> |
| AP00408  | RANATUERIN 9      | -۱۱/۵       | FLFPLITSFLSKVL                 | قورباغه <i>Rana catesbeiana</i> |
| AP00405  | RANATUERIN 6      | -۱۱/۵       | FISAIASMLGKFL                  | قورباغه <i>Rana catesbeiana</i> |
| AP01066  | Cycloviolacin O24 | -۱۱/۳       | GLPTCGETCFGGTCNTPGCTCDPWPVCTHN | گیاه <i>Viola odorata</i>       |
| AP00257  | Caerin 4.1        | -۱۱/۲       | GLWQKIKSAAGDLASGIVEGIKS        | قورباغه <i>Litoria caerulea</i> |

جدول ۲: خصوصیات فیزیکوشیمیایی پپتیدهای منتخب

| نام پپتید | تعداد آمینواسیدها | Hydrophathy index | Aliphatic index | PI    | Charge Density | جرم مولکولی (g/mol) | Aromaticity | InstabilityInd | BomanInd |
|-----------|-------------------|-------------------|-----------------|-------|----------------|---------------------|-------------|----------------|----------|
| AP00241   | ۲۵                | ۱/۲۰۴             | ۱۷۱/۲۰          | ۱۰/۰۲ | ۰/۰۰۰۴         | ۲۵۵۵/۰۷             | ۰           | ۲۹/۶۹۶         | -۱/۲۲    |
| AP00408   | ۱۴                | ۱/۷۵              | ۱۶۰             | ۱۲/۸۴ | ۰/۰۰۱۲         | ۱۶۲۴/۰۳             | -۰/۲۱       | ۱۶/۹۸          | -۱/۶۲    |
| AP00405   | ۱۳                | ۱/۶۸              | ۱۳۵/۳۸          | ۱۲/۸۴ | ۰/۰۰۱۴         | ۱۳۹۶/۷۵             | -۰/۱۵       | ۲/۷            | -۱/۵۵    |
| AP01066   | ۳۰                | -۰/۱۶             | ۲۲/۶۷           | ۵/۱۶  | -۰/۰۰۰۶        | ۳۰۷۱/۴۶             | -۰/۰۶۷      | ۵۳/۵۳          | -۰/۷۴۰   |
| AP00257   | ۲۳                | -۰/۱۶             | ۱۱۰/۴۳          | ۱۰/۴۲ | ۰/۰۰۰۸         | ۲۳۲۷/۶۹             | -۰/۰۴۳      | -۲/۲۹          | -۰/۳۴    |

الکترواستاتیک بوده است. رزیدو GLY 485 و TYR 489 از پروتئین اسپایک و LEU 25 و LEU 24 و HIS 24 از پپتید بیشترین مشارکت در برهمکنشها را دارند.

جزئیات برهمکنش AP00241 و Spike حاصل شده از داکینگ در تصویر ۱ و جدول ۳ قابل مشاهده است. تمام برهمکنشهای بین پپتید و اسپایک از نوع غیرپیوندی و بیشتر



تصویر ۱: نمایش برهمکنش AP00241 و اسپایک در داکینگ

جدول ۳: جزئیات برهمکنش AP00241 و اسپایک

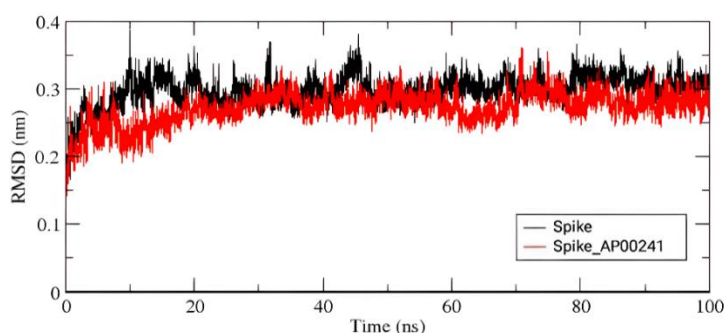
| زنجیره پروتئین رسپتور       |                           | نوع برهمکنش                 |             | زنجیره پپتید                |                           |
|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|---------------------------|
| رزیدو شرکت کننده در برهمکنش | اتم شرکت کننده در برهمکنش | رزیدو شرکت کننده در برهمکنش | نوع برهمکنش | رزیدو شرکت کننده در برهمکنش | اتم شرکت کننده در برهمکنش |
| ARG 403                     | NH1 698                   | HIS 12                      | غیریونی     | O 160                       |                           |
| LYS 417                     | N2 828                    | SER 3                       | غیریونی     | O 93                        |                           |
| GLU 484                     | OE1 1495                  | HIS 24                      | غیریونی     | C 356                       |                           |
| GLY 485                     | CA 1499                   | LEU 25                      | غیریونی     | O 386                       |                           |
| GLY 485                     | C 1500                    | LEU 25                      | غیریونی     | O 386                       |                           |
| GLY 485                     | O 1501                    | HIS 24                      | غیریونی     | O 370                       |                           |
| GLY 485                     | O 1501                    | LEU 25                      | غیریونی     | O 386                       |                           |
| ASN 487                     | OD1 1522                  | LEU 2                       | غیریونی     | N 6                         |                           |
| CYS 488                     | O 1530                    | HIS 24                      | غیریونی     | O 370                       |                           |
| TYR 489                     | CD1 1540                  | HIS 24                      | غیریونی     | O 370                       |                           |
| TYR 489                     | CE1 1542                  | HIS 24                      | غیریونی     | O 370                       |                           |
| TYR 505                     | CE2 1694                  | HIS 12                      | غیریونی     | O 160                       |                           |

### دینامیک مولکولی

RMSD: انحراف ریشه میانگین مربعات (Root Mean Square Deviation) بین ساختارهای ایجاد شده در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در بعد زمان معیاری مناسب و رایج جهت اطمینان از پایداری ساختاری پروتئین می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در ابتدای شبیه‌سازی هر دو نمودار (گیرنده تنها و پپتید-گیرنده) روند

صعودی را نشان داده‌اند. طبق این شکل نمودار RMSD مربوط به اسپایک در هر دو حالت تنها و در کمپلکس تقریباً بر هم منطبق هستند که پایداری اسپایک را در طی شبیه‌سازی تأیید می‌کنند. بعد از ۲۰ نانوثانیه تغییرات RMSD برای هر دو ترکیب به ثبات نسبی در محدوده ۰/۳ نانومتر رسیده و تا انتهای شبیه‌سازی تقریباً ثابت می‌ماند.

RMSD



نمودار ۱: RMSD در طی ۱۰۰ نانوثانیه

خط مشکی نشان دهنده تغییرات پروتئین اسپایک به تنهایی و قرمز تغییرات آن هنگامی که با AP00241 همراه است.

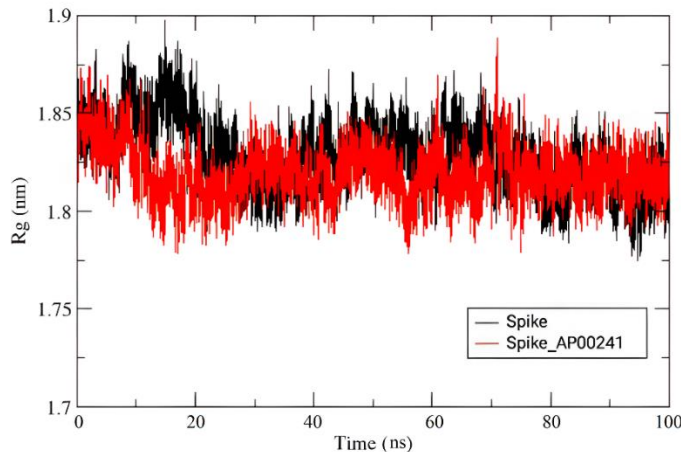
شبیه‌سازی دینامیک مولکولی میزان شعاع ژیراسیون کاهش پیدا کند نشان دهنده فشردگی پروتئین می‌باشد و بالعکس با افزایش میزان شعاع ژیراسیون اندازه پروتئین نیز بیشتر شده و به

Gyration of Radius: شعاع ژیراسیون یکی از پارامترهای مهم در بررسی و مطالعه تغییرات فشردگی پروتئین در طول زمان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌باشد. هر قدر که در طول

در پایان شبیه‌سازی شعاع ژیراسیون کاهش بسیار کمی نسبت به ابتدای زمان شبیه‌سازی داشته و ساختار در طول زمان پایداری خود را حفظ کرده است.

تعبیری پروتئین بازتر می‌باشد. در نمودار ۲ تغییرات شعاع ژیراسیون گیرنده و کمپلکس در طول زمان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان می‌دهد در هر دو ترکیب شعاع مولکول کاهش یافته و بعد از ۷۰ نانوثانیه هر دو نمودار بر هم منطبق می‌شوند.

Radius of gyration (total and around axes)



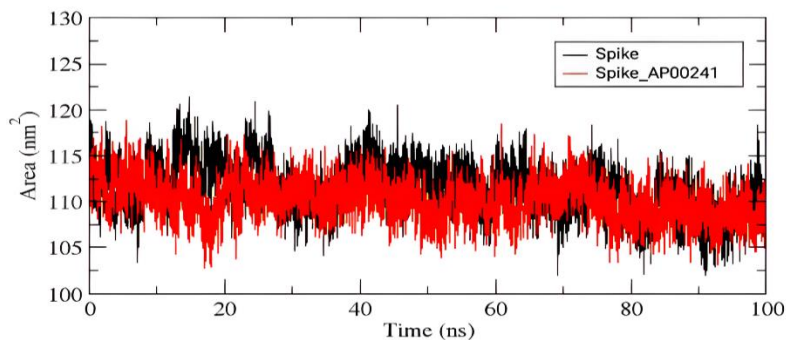
نمودار ۲: شعاع ژیراسیون در طی شبیه‌سازی

این آنالیز نشان دهنده فاصله از مرکز جرم یک جسم است و تغییرات ساختاری زنجیره پروتئینی رسپتور را نمایش می‌دهد.

رسپتور (اسپایک) در دو حالت تنها و در کمپلکس مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در نمودار ۳ مشخص است، نمودار SASA مولکول اسپایک در هر دو حالت تقریباً مشابه است و این نیز تأییدکننده پایداری ساختار رسپتور در برهمکنش با پپتید در طی شبیه‌سازی است.

SASA: نمودارهای سطح در دسترس حلال (Solvent Accessible Surface Area) نشان دهنده سطحی از پروتئین است که در دسترس حلال است و یک آنالیز مناسب برای بررسی پایداری ساختار پروتئین در طی شبیه‌سازی می‌باشد. همچنین در این آنالیز پایداری ساختار زنجیره پروتئینی

Solvent Accessible Surface



نمودار ۳: سطح در دسترس حلال (SASA) و نمایش پایداری پروتئین در طول شبیه‌سازی

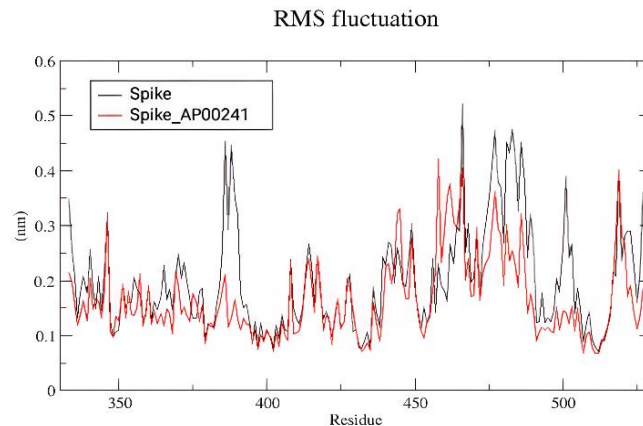
میانگین مربعات نوسان اتم‌های کربن‌های آلفا در هر دو ترکیب محاسبه و در نمودار ۴ نمایش داده شد. به طور کلی

RMSF (Root Mean Square Fluctuation): جهت بررسی حرکت‌ها و انعطاف‌پذیری ساختاری، محاسبات ریشه



۵۰۰ (مشاهده می‌شود که شامل رزیدوهای مهمی از جمله Tyr489 و Tyr505) در ناحیه دامین اتصال گیرنده پروتئین است.

اسید آمینه‌هایی که در C و N ترمینال پروتئین قرار دارند، به دلیل انعطاف‌پذیری بیشتر، نوسانات بیشتری را نیز از خود نشان می‌دهند. همچنین، بیشتر نوسانات در رزیدوهای انتهایی (۴۸۰ تا

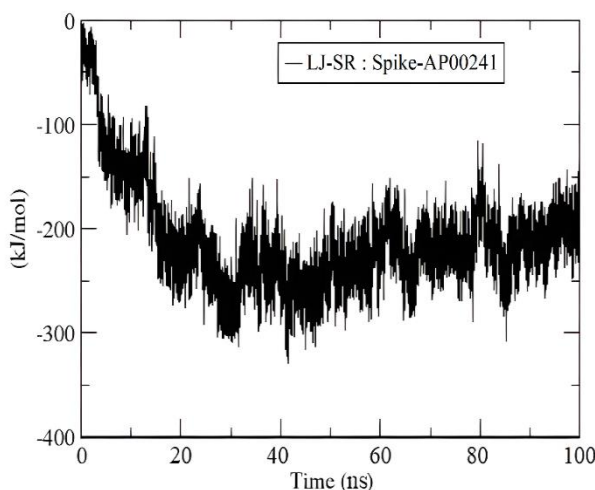


نمودار ۴: نمایش جابه‌جایی رزیدوها در یک لحظه از شبیه‌سازی نسبت به ساختار مرجع

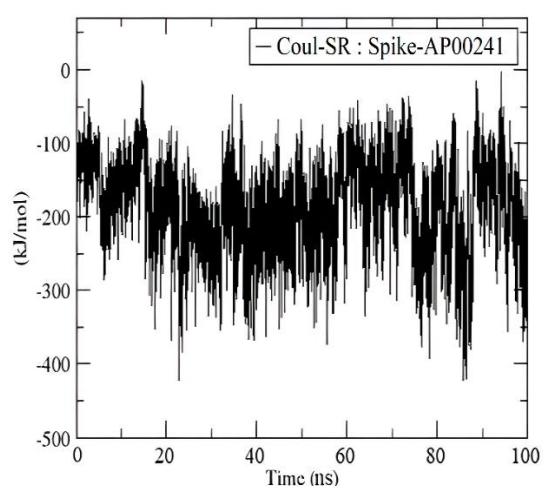
۱۰۰ نانوثانیه این برهمکنش‌ها پایدار باقی ماندند. در نمودار CL نیز برهمکنش‌ها در طول شبیه‌سازی ثابت باقی ماندند (نمودار ۵). در نهایت نمودار Hbond (hydrogen bond) در نمودار ۶ افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پپتید و اسپایک را در طول شبیه‌سازی نشان می‌دهد که پایداری پروتئین و اتصال پپتید به رسپتور را تأیید می‌کند.

محاسبات انرژی: جهت محاسبه برهمکنش‌های واندروالس پتانسیل لئارد-جونز (LJ) و جهت محاسبه برهمکنش‌های الکترواستاتیک (به غیر از هیدروژنی) پتانسیل کولومبیک (CL) محاسبه شد و در نهایت پیوندهای هیدروژنی بین رسپتور و پپتید نیز محاسبه گردید. در نمودار LJ، انرژی برهمکنش واندروالس بین اسپایک و پپتید تا ۲۰ نانوثانیه افت داشته و سپس تا پایان

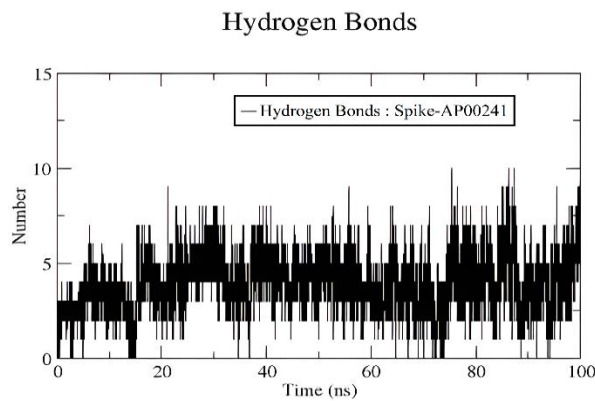
GROMACS Energies



GROMACS Energies



نمودار ۵: سمت راست نمودار انرژی کولومبیک و سمت چپ انرژی لئارد-جونز بین اسپایک و AP00241



نمودار ۶: نمودار پیوند هیدروژنی بین اسپایک و AP00241

داده‌های حاصل از g-mmpbsa نیز تأیید می‌کند که پپتید با انرژی مناسبی به پروتئین رسپتور (یعنی Spike) متصل می‌شود و مجموع انرژی اتصال معادل  $-134/53$  کیلوژول بر مول است.

**g-mmpbsa:** نتایج محاسبه  $\Delta G$  برهمکنش در جدول ۴ قرار گرفته است. در این روش اطلاعات دقیق‌تری در مورد انرژی اتصال آزاد نسبت به روش‌های داکینگ مولکولی حاصل می‌شود.

جدول ۴: محاسبات MM-PBSA کمپلکس Spike-AP00241

| Energy terms                    | Spike-AP00241 |
|---------------------------------|---------------|
| van der Waal energy (kJ/mol)    | -241/066      |
| Electrostatic energy (kJ/mol)   | -283/157      |
| Polar solvation energy (kJ/mol) | 417/860       |
| SASA energy (kJ/mol)            | -28/171       |
| Binding energy (kJ/mol)         | -134/533      |

نتایج این مطالعه در دو بخش داکینگ و دینامیک مولکولی قابل بررسی است. از داکینگ، علاوه بر پیش‌بینی حالت اتصال AMPها به اسپایک، برای مطالعه برهمکنش پروتئین-پپتید نیز استفاده شد. پپتید ضد میکروبی Caerin 1.1 با کد AP00241 و انرژی اتصال  $-12/2$  Kcal/mol بهترین نتیجه اتصال به رسپتور را کسب کرد و به عنوان کاندید داکینگ، برای مطالعات دینامیک مولکولی انتخاب شد. Caerin 1.1، یک پپتید ضد میکروبی است که از ترشحات پوستی یک قورباغه درختی استرالیایی از جنس Litoria به دست آمده است. این پپتید همچنین دارای خاصیت ضد سرطانی و ضد میکروبی در برابر طیف گسترده‌ای از سویه‌های گرم مثبت و منفی در شرایط آزمایشگاهی است. پپتید Caerin 1.1 در برابر حرارت مقاوم

### بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه پتانسیل برهمکنش میان کتابخانه پپتیدهای ضد میکروبی طبیعی با پروتئین اسپایک کروناویروس SARS-CoV-2 بررسی شد. کروناویروس SARS-CoV-2، از طریق پروتئین Spike به گیرنده ACE2 سلول میزبان متصل شده و به این صورت واسطه ورود ویروس به سلول فراهم می‌شود؛ بنابراین اختلال در برهمکنش‌های بین گلیکوپروتئین S و گیرنده ACE2 به طور بالقوه می‌تواند به استراتژی‌های درمانی جدیدی منجر شود [۲۳].

اکثر پپتیدهای ضد ویروسی دارای مهار نانومولار در شرایط آزمایشگاهی هستند؛ بنابراین برای ویریون‌ها انتخابی عمل می‌کنند و عوارض جانبی برای سلول میزبان ایجاد نمی‌کنند [۲۴].

اغلب گرم منفی از جمله پاستورلا همولیتیکا (عامل تب خوکی) را لیز می‌کند [۳۰].

همچنین در این مطالعه خصوصیات فیزیوشیمیایی محاسبه و بررسی شد.

AP00241، با طول ۲۵ آمینواسید و جرم مولکولی ۲/۵۵۵ کیلودالتون است که نقطه ایزوالکتریک ۱۰/۰۲ را دارا است و از آنجایی که از ۷ بیشتر است، یعنی تعداد آمینواسیدهای مثبت آن از منفی بیشتر است و شاخص Instability آن نیز عدد ۲۹/۶۹۶ را نشان دهنده پایداری محلول است [۳۱].

GRAVY یا میانگین کل hydropathicity نشان دهنده میانگین مقادیر آبدوستی و آبرگریزی هر یک از آمینواسیدها است. مقدار مثبت ۱/۲۴ به طور کلی آبرگریزی پپتید را نشان می‌دهد [۳۲]. مقدار شاخص آلیفاتیک نیز ۱۷۱/۲۰ است که پایداری حرارتی پپتید را تأیید می‌کند [۳۳].

چگالی بار، نسبت بار یون به حجم را بیان می‌کند و شاخص Boman پتانسیل اتصال یک پروتئین به پروتئین دیگر را تخمین می‌زند. برای AP00241 این شاخص معادل ۱/۲۲- است که نشان می‌دهد عمل دارویی ضد میکروبی آن با حداقل اثرات منفی است [۳۴]. Aromaticity نیز مقدار اسیدهای آمینه آروماتیک را بررسی می‌کند که در این پپتید مقدار آن برابر صفر است.

با بررسی نتایج داکینگ مشخص شد که اتصال AP00241 به اسپایک از طریق RBD بوده است چرا که در یک مطالعه که بر روی Spike انجام شد، رزیدوهای Tyr489 و Tyr505 در دامین اتصال به رسپتور شناخته شدند که در برهمکنش ویروس و سلول میزبان نقش حیاتی دارند [۳۵]. نتایج داکینگ این مطالعه نیز حضور این دو رزیدو را در برهمکنش با پپتید AP00241 تأیید می‌کند.

شبه‌سازی‌های دینامیک مولکولی برای بررسی پایداری ساختاری Spike-AP00241 انجام شد. نتایج دینامیک مولکولی نیز خود شامل دو بخش است. در بخش اول پایداری ساختار کمپلکس‌ها و در بخش دوم محاسبات انرژی انجام شد. برای بررسی پایداری ساختار کمپلکس‌ها، نمودارهای RMSD، RMSF، شعاع ژیراسیون و SASA مطالعه شدند و برای بررسی محاسبات انرژی، انرژی‌های لنارد-جونز، کولومبیک و پیوندهای هیدروژنی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت محاسبات انرژی آزاد گیبس با افزونه gmmPBSA انجام گرفت.

است و در pH پایین (۵/۵ تا ۷/۴) و در دمای اتاق پایدار است [۲۵].

همچنین در مطالعه انجام شده Rollins-smith و همکاران، مشخص شد که مجموعه‌ای از آنالوگ‌های Caerin 1.1 قادر به مهار انتقال HIV در محیط آزمایشگاهی و در غلظت‌های بسیار پایین بوده و همچنین سمیت سلولی کمی دارد [۲۶].

اکثر پپتیدهایی که در این مطالعه از انرژی مطلوبی در داکینگ برخوردار بودند از منشأ دوزیستان هستند. دوزیستان یکی از غنی‌ترین منابع AMP هستند چرا که پوست دوزیستان به طور مستقیم در معرض انگل‌ها، میکروارگانیسم‌ها، شکارچیان یا عوامل فیزیکی موجود در محیط زندگی آن‌ها قرار دارد و بنابراین یک اندام ایمنی ذاتی مهم برای محافظت از تهاجم پاتوژن‌ها است. AMPها در غدد گرانولار دوزیست ذخیره می‌شوند و بر اثر استرس یا آسیب جسمی آزاد می‌شوند [۲۴].

علاوه بر Caerin 1.1، پپتیدهای RANATUERIN 9، RANATUERIN 6 Cycloviolacin O24 و Caerin 4.1 به ترتیب بهترین انرژی اتصال با اسپایک را در داکینگ نشان دادند.

برای اولین بار در مطالعه Goraya و همکاران، ۹ پپتید به نام RANATUERIN 1-9، با فعالیت ضد میکروبی علیه استافیلوکوکوس ارتوس از عصاره پوست قورباغه Rana catesbeiana گرفته شد. هر دو این پپتیدها، ضد باکتری گرم مثبت هستند و فعالیت همولیتیک نسبت به گلبول‌های قرمز خون انسان نشان نداده‌اند [۲۷].

Cycloviolacin O24 نیز یک سیکلوتید گیاهی است که در مکانیسم دفاعی گیاه Viola odorata شرکت می‌کند و فعالیت همولیتیک دارد. سیکلوتیدها خانواده بزرگی از پپتیدهای گیاهی هستند که فعالیت ضد میکروبی دارند و به دلیل ساختار منحصر به فرد خود که CCK نامیده می‌شود، سبب مقاومت در برابر حرارت، تخریب شیمیایی و آنزیمی می‌شوند. در مطالعه Ireland و همکاران نقش ضد ویروس HIV این پپتید تأیید شده بود [۲۸].

Caerin 4.1 نیز همانند Caerin 1.2 از قورباغه Litoria caerulea گرفته شده و خاصیت آنتی بیوتیک دارد؛ اما بر خلاف Caerin 1.2 طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی ندارد [۲۹]. در مطالعه Boland و همکاران فعالیت ضد باکتری این پپتید بررسی شد که محدوده خاصی از باکتری‌ها شامل میشد و

محاسبه شده است. این موضوع نشان دهنده این است که میل اتصال Spike به پپتید نسبت به گیرنده سلولی بیشتر بوده و می‌تواند به‌طور بالقوه با پپتید مهار گردد [۳۷].

همچنین در یک مطالعه که Kouznetsova و همکاران انجام شد، پتانسیل داروهای FDA-approved در مهار پروتئین اسپایک مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه دو منطقه اتصال اصلی برای برهمکنش میان داروها و پروتئین Spike در نظر گرفته شد که در صورت اتصال دارو به این مناطق، اتصال زیرواحد S1 کروناویروس به ACE2 میزبان مهار می‌شود. دو آمینواسید مهمی که در این نواحی معرفی شدند، Tyr489 و Tyr505 بودند که همچنین در مطالعه حاضر در منطقه اتصال به پپتید نیز نقش مؤثری را ایفا می‌نمودند [۳۸].

به‌طور کلی نتیجه گرفته شد که در این مطالعه پپتید ضد میکروبی AP00241، میل اتصال بالایی به پروتئین کروناویروسی Spike در داکینگ نشان داد و در دینامیک مولکولی نیز تأیید شد. همچنین این برهمکنش در طی شبیه‌سازی پایدار باقی ماند؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، که این AMP ممکن است به‌طور بالقوه برهمکنش بین اسپایک SARS-CoV-2 و گیرنده میزبان سلولی ACE2 را در طول اتصال ویروسی، همجوشی و ورود به سلول‌های میزبان مسدود کند و به‌عنوان یک مهارکننده مناسب عمل کند، اما برای اطمینان از اثربخشی درمانی آن نیاز به تأیید تجربی است.

### تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که در مورد پژوهش حاضر هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد. در این مطالعه از حمایت مالی سازمان خاصی استفاده نشده است.

### References

- Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses J Med Virol 2020;92(4):424-32. doi:10.1002/jmv.25685
- Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. Mil Med Res 2020;7(1):11. doi:10.1186/s40779-020-00240-0
- Yin Y, Wunderink RG. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. Respirology. 2018;23(2):130-7. doi: 10.1111/resp.13196
- Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel

نمودارهای RMSD، پایداری سیستم و انحراف ساختار در طول شبیه‌سازی نسبت به ساختار اولیه را نشان می‌دهد. برای این منظور تغییرات کربن آلفا ساختار پروتئینی رسپتور به تنهایی و وقتی که با AP00241 همراه می‌شود، محاسبه شد.

هر دو حالت شبیه‌سازی، یعنی زمانی که رسپتور بدون پپتید است و زمانی که با پپتید همراه می‌شود تغییرات RMSD تقریباً در یک محدوده است و تا ۲ انگستروم را نشان می‌دهد. این نکته نشان دهنده، پایداری ساختار Spike در طول شبیه‌سازی است و صحت شبیه‌سازی را تأیید می‌کند.

نمودار RMSF، نوسانات رزیدوهای زنجیره جانبی پروتئین رسپتور را در طول شبیه‌سازی نمایش می‌دهد. در این نمودار رزیدوهایی که در برهمکنش‌ها نقش دارند، نوسانات بیشتری خواهند داشت.

همچنین در این جا، تغییرات Rg برای Spike و پپتید در محدوده ۱/۷۸ تا ۱/۸۹ نانومتر گزارش شده است؛ که تغییرات کمتری نسبت به کمپلکس Spike-ACE2 (تا ۲/۲ نانومتر) نشان می‌دهند [۳۶].

نمودار سطح در دسترس حلال (SASA) نشان دهنده سطحی از پروتئین است که در دسترس حلال است. اگر این تغییرات صعودی باشد، یعنی پروتئین unfold شده و اگر تغییرات نزولی باشد یعنی پروتئین جمع‌تر شده است. نمودار SASA برای پروتئین Spike به تنهایی، ۱۱/۱۱۴۰ و برای Spike-AP00241 ۱۱/۱۰۱۸ نانومتر محاسبه شد؛ بنابراین این تغییرات جزئی تأیید کننده ثبات ساختار در طی شبیه‌سازی می‌باشد.

انرژی اتصال کمپلکس اسپایک و AP00241 در g\_mmpbsa معادل ۱۳۴/۵۳۳ KJ/mol - است و این در حالی است که انرژی اتصال اسپایک و گیرنده سلول میزبان (ACE2) معادل ۱۱۰/۵۸ KJ/mol - در یک مطالعه دیگر

- Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. Cell Host Microbe. 2020;27(3):325-8. doi:10.1016/j.chom.2020.02.001
- Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, et al. From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. Viruses 2019;11(1):59. doi:10.3390/v11010059
  - Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Methods Mol Biol 2015;1282:1-23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7\_1
  - Papageorgiou AC, Mohsin I. The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein as a Drug and Vaccine Target: Structural Insights into Its Complexes with ACE2 and Antibodies. Cells 2020;9(11):2343. doi:10.3390/cells9112343

8. Essa RZ, Wu YS, Batumalaie K, Sekar M, Poh CL. Antiviral peptides against SARS-CoV-2: therapeutic targets, mechanistic antiviral activity, and efficient delivery. *Pharmacol Rep* 2022;74(6):1166-81. doi:10.1007/s43440-022-00432-6
9. Younis NK, Zareef RO, Al Hassan SN, Bitar F, Eid AH, Arabi M. Hydroxychloroquine in COVID-19 Patients: Pros and Cons. *Front Pharmacol* 2020;11:597985. doi:10.3389/fphar.2020.597985
10. Gil C, Ginex T, Maestro I, Nozal V, Barrado-Gil L, Cuesta-Geijo MÁ, et al. COVID-19: Drug Targets and Potential Treatments. *J Med Chem* 2020;63(21):12359-86. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00606
11. Patel TK, Patel PB, Barvaliya M, Saurabh MK, Bhalla HL, Khosla PP. Efficacy and safety of lopinavir-ritonavir in COVID-19: A systematic review of randomized controlled trials. *J Infect Public Health* 2021;14(6):740-8. doi:10.1016/j.jiph.2021.03.015
12. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol* 2020;11:582779. doi:10.3389/fmicb.2020.582779
13. Belaid A, Aouni M, Khelifa R, Trabelsi A, Jemmali M, Hani K. In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *J Med Virol* 2002;66(2):229-34. doi:10.1002/jmv.2134
14. Elnagdy S, AlKhazindar M. The Potential of Antimicrobial Peptides as an Antiviral Therapy against COVID-19. *ACS Pharmacol Transl Sci* 2020;3(4):780-2. doi:10.1021/acspsci.0c00059
15. Jan Z, Geethakumari AM, Biswas KH, Jithesh PV. Protegrin-2, a potential inhibitor for targeting SARS-CoV-2 main protease M<sup>pro</sup>. *Comput Struct Biotechnol J* 2023;21:3665-71. doi: 10.1016/j.csbj.2023.07.020.
16. Biswas S, Mahmud S, Mita MA, Afrose S, Hasan MR, Sultana Shimu MS, et al. Molecular Docking and Dynamics Studies to Explore Effective Inhibitory Peptides Against the Spike Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2. *Front Mol Biosci* 2022;8:791642. doi:10.3389/fmolb.2021.791642
17. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* 2016;44(D1):D1087-93. doi: 10.1093/nar/gkv1278.
18. Shen Y, Maupetit J, Derreumaux P, Tufféry P. Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Mini-protein Structure Prediction. *J Chem Theory Comput* 2014;10(10):4745-58. doi:10.1021/ct500592m
19. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993;234(3):779-815. doi:10.1006/jmbi.1993.1626
20. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010;31(2):455-61. doi:10.1002/jcc.21334
21. Wong FC, Ong JH, Chai TT. SARS-CoV-2 spike protein-, main protease- and papain-like-protease-targeting peptides from seed proteins following gastrointestinal digestion: An in silico study. *Phytoed Plus* 2021;1(1):100016. doi:10.1016/j.phyplu.2020.100016
22. Homeyer N, Gohlke H. Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area Method. *Mol Inform* 2012;31(2):114-22. doi:10.1002/minf.201100135
23. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circ Res* 2020;126(10):1456-74. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317015
24. Loffredo MR, Nencioni L, Mangoni ML, Casciaro B. Antimicrobial peptides for novel antiviral strategies in the current post-COVID-19 pandemic. *J Pept Sci* 2024;30(1):e3534. doi:10.1002/psc.3534
25. Chen S, Zhang P, Xiao L, Liu Y, Wu K, Ni G, et al. Caerin 1.1 and 1.9 Peptides from Australian Tree Frog Inhibit Antibiotic-Resistant Bacteria Growth in a Murine Skin Infection Model. *Microbiol Spectr* 2021;9(1):e0005121. doi:10.1128/Spectrum.00051-21
26. Rollins-Smith LA, Smith PB, Ledeczki AM, Rowe JM, Reinert LK. Caerin 1 Antimicrobial Peptides That Inhibit HIV and *Neisseria* May Spare Protective Lactobacilli. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(10):661. doi:10.3390/antibiotics9100661
27. Goraya J, Knoop FC, Conlon JM. Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250(3):589-92. doi:10.1006/bbrc.1998.9362
28. Ireland DC, Colgrave ML, Craik DJ. A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: sequence variation and the implications for structure, function and stability. *Biochem J* 2006;400(1):1-12. doi: 10.1042/BJ20060627
29. Chia BC, Carver JA, Lindner RA, Bowie JH, Wong H, Lie W. Caerin 4.1, an Antibiotic Peptide from the Australian Tree Frog, *Litoria caerulea*. The NMR-Derived Solution Structure. *Australian Journal of Chemistry*. 2000;53(4):257-65. doi:10.1071/CH99108
30. Boland MP, Separovic F. Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian tree frogs. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758(9):1178-83. doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.010
31. Khater I, Nassar A. Potential antiviral peptides targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *BMC Pharmacology and Toxicology* 2022;23, 91. doi: 10.1186/s40360-022-00627-w
32. Bisana S, Kumar S, Rismiller P, Nicol SC, Lefevre C, Nicholas KR, et al. Identification and functional characterization of a novel monotreme-specific antibacterial protein expressed during lactation. *PLoS One* 2013;8(1):e53686. doi:10.1371/journal.pone.0053686
33. Panda S, Chandra G. Physicochemical characterization and functional analysis of some snake venom toxin proteins and related non-toxin proteins of

other chordates. *Bioinformatics* 2012;8(18):891-6. doi:10.6026/97320630008891

**34.** Aruleba RT, Tincho MB, Pretorius A, Kappo AP. In silico prediction of new antimicrobial peptides and proteins as druggable targets towards alternative anti-schistosomal therapy. *Scientific African* 2021;12:e00804. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00804>

**35.** Chowdhury SM, Talukder SA, Khan AM, Afrin N, Ali MA, Islam R, et al. Antiviral Peptides as Promising Therapeutics against SARS-CoV-2. *J Phys Chem B*. 2020;124(44):9785-92. doi:10.1021/acs.jpcc.0c05621

**36.** Basit A, Karim AM, Asif M, Ali T, Lee JH, Jeon JH, et al. Designing Short Peptides to Block the Interaction

of SARS-CoV-2 and Human ACE2 for COVID-19 Therapeutics. *Front Pharmacol* 2021;12:731828. doi:10.3389/fphar.2021.731828

**37.** Cavani M, Riofrío WA, Arciniega M. Molecular Dynamics and MM-PBSA Analysis of the SARS-CoV-2 Gamma Variant in Complex with the hACE-2 Receptor. *Molecules* 2022;27(7):2370. doi:10.3390/molecules27072370

**38.** Kouznetsova VL, Zhang A, Miller MA, Tatineni M, Greenberg JP, Tsigelny IF. Potential SARS-CoV-2 Spike Protein-ACE2 Interface Inhibitors: Repurposing FDA-approved Drugs. *J Explor Res Pharmacol* 2022;7(1):17-29. doi: 10.14218/JERP.2021.00050.

جدول ۵: نتایج داکینگ کتابخانه پپتیدهای ضد میکروبی با پروتئین Spike کروناویروس

| شماره | کد پپتید | طول توالی (aa) | انرژی اتصال با Spike (Kcal/mol) |
|-------|----------|----------------|---------------------------------|
| ۱     | AP00024  | ۱۲             | -۸.۸                            |
| ۲     | AP00025  | ۱۳             | -۹.۸                            |
| ۳     | AP00062  | ۲۷             | -۱۱                             |
| ۴     | AP00099  | ۱۳             | -۱۱.۱                           |
| ۵     | AP00121  | ۲۸             | -۷.۸                            |
| ۶     | AP00157  | ۳۴             | -۶                              |
| ۷     | AP00158  | ۳۴             | -۷                              |
| ۸     | AP00173  | ۳۰             | +۲.۷                            |
| ۹     | AP00174  | ۳۱             | -۷.۸                            |
| ۱۰    | AP00188  | ۳۳             | +۲۲.۲                           |
| ۱۱    | AP00212  | ۱۸             | -۸.۹                            |
| ۱۲    | AP00217  | ۳۴             | +۷.۲                            |
| ۱۳    | AP00222  | ۳۲             | -۶.۹                            |
| ۱۴    | AP00223  | ۳۲             | +۹.۶                            |
| ۱۵    | AP00224  | ۲۹             | +۱.۴                            |
| ۱۶    | AP00225  | ۳۱             | -۸.۹                            |
| ۱۷    | AP00240  | ۲۵             | -۱۰.۷                           |
| ۱۸    | AP00241  | ۲۵             | -۱۲.۲                           |
| ۱۹    | AP00242  | ۲۵             | -۱۰.۵                           |
| ۲۰    | AP00243  | ۲۵             | -۹.۴                            |
| ۲۱    | AP00244  | ۲۵             | -۹.۹                            |
| ۲۲    | AP00245  | ۲۴             | -۹.۸                            |
| ۲۳    | AP00248  | ۲۴             | -۹.۹                            |
| ۲۴    | AP00257  | ۲۳             | -۱۱.۲                           |
| ۲۵    | AP00260  | ۲۲             | -۹.۷                            |
| ۲۶    | AP00272  | ۳۷             | +۹.۸                            |
| ۲۷    | AP00277  | ۲۳             | -۱۰.۲                           |
| ۲۸    | AP00325  | ۱۷             | -۹.۳                            |
| ۲۹    | AP00327  | ۱۳             | -۹.۴                            |
| ۳۰    | AP00345  | ۲۵             | -۱۰.۵                           |
| ۳۱    | AP00355  | ۴۰             | -۷.۷                            |
| ۳۲    | AP00367  | ۲۸             | -۷.۶                            |
| ۳۳    | AP00384  | ۲۴             | -۸.۳                            |
| ۳۴    | AP00405  | ۱۳             | -۱۱.۵                           |
| ۳۵    | AP00408  | ۱۴             | -۱۱.۵                           |
| ۳۶    | AP00446  | ۲۰             | -۱۰.۹                           |
| ۳۷    | AP00449  | ۱۳             | -۹.۷                            |
| ۳۸    | AP00497  | ۲۰             | -۱۰.۵                           |
| ۳۹    | AP00505  | ۲۴             | -۱۰.۵                           |
| ۴۰    | AP00512  | ۳۸             | -۶.۷                            |
| ۴۱    | AP00532  | ۲۰             | -۱۰.۶                           |
| ۴۲    | AP00553  | ۱۰             | -۹                              |
| ۴۳    | AP00590  | ۲۱             | -۸.۶                            |
| ۴۴    | AP00640  | ۲۱             | -۱۰.۲                           |
| ۴۵    | AP00663  | ۳۷             | -۹.۱                            |
| ۴۶    | AP00706  | ۲۱             | -۱۰.۱                           |
| ۴۷    | AP00724  | ۱۸             | -۹.۳                            |
| ۴۸    | AP00725  | ۱۸             | -۹.۸                            |
| ۴۹    | AP00742  | ۴۲             | +۱۰.۸                           |
| ۵۰    | AP00744  | ۴۱             | -۲.۸                            |
| ۵۱    | AP00764  | ۲۴             | -۹.۱                            |
| ۵۲    | AP00771  | ۲۳             | -۱۰.۲                           |
| ۵۳    | AP00809  | ۲۲             | -۱۰.۸                           |

|         |    |         |     |
|---------|----|---------|-----|
| -۹.۲    | ۲۰ | AP00832 | ۵۴  |
| -۹.۱    | ۱۳ | AP00898 | ۵۵  |
| -۱۰.۵   | ۳۱ | AP01022 | ۵۶  |
| -۱۰.۵   | ۲۸ | AP01023 | ۵۷  |
| -۱۰.۲   | ۳۰ | AP01024 | ۵۸  |
| -۶.۴    | ۳۰ | AP01025 | ۵۹  |
| -۱۰.۷   | ۲۹ | AP01030 | ۶۰  |
| -۷.۵    | ۳۰ | AP01060 | ۶۱  |
| -۶.۷    | ۳۱ | AP01061 | ۶۲  |
| -۹.۱    | ۳۰ | AP01062 | ۶۳  |
| -۸.۲    | ۳۰ | AP01064 | ۶۴  |
| -۱۱.۳   | ۳۰ | AP01066 | ۶۵  |
| -۷.۷    | ۳۰ | AP01080 | ۶۶  |
| -۹.۲    | ۳۰ | AP01081 | ۶۷  |
| -۹.۲    | ۲۱ | AP01138 | ۶۸  |
| -۹.۱    | ۱۹ | AP01223 | ۶۹  |
| -۹.۵    | ۱۸ | AP01269 | ۷۰  |
| +۱۱۶.۲  | ۴۶ | AP01273 | ۷۱  |
| -۹.۵    | ۱۷ | AP01327 | ۷۲  |
| -۱۱.۱   | ۲۱ | AP01328 | ۷۳  |
| -۱۰.۷   | ۱۷ | AP01348 | ۷۴  |
| -۶.۹    | ۵  | AP01406 | ۷۵  |
| -۹.۹    | ۱۳ | AP01434 | ۷۶  |
| -۱۱.۲   | ۲۲ | AP01649 | ۷۷  |
| +۸۳.۴   | ۴۰ | AP01675 | ۷۸  |
| -۳.۸    | ۴۲ | AP01676 | ۷۹  |
| +۳۲.۲   | ۴۳ | AP01788 | ۸۰  |
| -۹.۱    | ۱۳ | AP01978 | ۸۱  |
| -۹.۸    | ۱۵ | AP02007 | ۸۲  |
| -۱۰.۳   | ۲۵ | AP02010 | ۸۳  |
| -۱۰.۲   | ۱۰ | AP02034 | ۸۴  |
| -۸.۸    | ۱۳ | AP02218 | ۸۵  |
| -۹.۸    | ۱۳ | AP02334 | ۸۶  |
| -۹.۹    | ۱۳ | AP02335 | ۸۷  |
| +۵۵.۱   | ۴۰ | AP02354 | ۸۸  |
| -۹.۲    | ۱۴ | AP02439 | ۸۹  |
| -۱۰     | ۱۰ | AP02450 | ۹۰  |
| -۸.۴    | ۲۶ | AP02478 | ۹۱  |
| -۸.۹    | ۲۲ | AP02479 | ۹۲  |
| -۸.۸    | ۱۸ | AP02525 | ۹۳  |
| -۱۱.۱   | ۲۰ | AP02526 | ۹۴  |
| -۹.۳    | ۱۰ | AP02556 | ۹۵  |
| -۹.۵    | ۳۱ | AP02571 | ۹۶  |
| -۹.۲    | ۲۷ | AP02846 | ۹۷  |
| +۲۰.۱.۲ | ۳۷ | AP03022 | ۹۸  |
| -۱۰.۱   | ۱۷ | AP03034 | ۹۹  |
| -۸.۴    | ۳۳ | AP03166 | ۱۰۰ |
| -۵.۵    | ۲۸ | AP03174 | ۱۰۱ |
| -۹.۶    | ۲۸ | AP03190 | ۱۰۲ |
| -۸.۷    | ۲۳ | AP03332 | ۱۰۳ |