

ARTICOLO DI RICERCA

I composti fenolici interrompono il legame con il recettore mediato dallo spike e l'ingresso di pseudo-virioni di SARS-CoV-2

Anna Goc¹*, Waldemar Sumera, Matthias Rath, Aleksandra Niedzwiecki*

Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto di Ricerca Dr. Rath, San Jose, California, Stati Uniti d'America.

* a.niedz@drath.com (AN); a.goc@drath.com (AG)

Astratto

Nella ricerca di soluzioni adeguate ed efficaci all'infezione da SARS-CoV-2, abbiamo studiato l'efficacia di diversi composti fenolici nel controllare i meccanismi cellulari chiave coinvolti nella sua infettività. Il modo in cui il virus SARS-CoV-2 infetta la cellula è un processo complesso e comprende quattro fasi principali: l'attacco al recettore cognitivo, l'ingresso nella cellula, la replicazione e l'uscita dalla cellula. Poiché si tratta di un processo in più parti, si creano molte opportunità di sviluppare interventi efficaci. Il legame del virus con il recettore dell'ospite è mirato, al fine di prevenire il suo ingresso è stato di particolare interesse. Qui forniamo prove sperimentali di competizione.

ACCESSO APERTO

Citazione: Goc A, Sumera W, Rath M, Niedzwiecki A (2021) I composti fenolici interrompono il legame con i recettori mediato da spike e l'ingresso di pseudo-virioni di SARS-CoV-2. PLoS ONE 16(6): e0253489.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489>

Editore: Victoria Lawson, Università di Melbourne, AUSTRALIA

Ricevuto: 18 febbraio 2021

Accettato: 6 giugno 2021

Pubblicato: 17 giugno 2021

Copyright: © 2021 Goc et al. Questo è un articolo ad accesso libero distribuito secondo i termini della [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), che ne consente l'uso, la distribuzione e la riproduzione illimitata su qualsiasi supporto, a condizione che vengano citati l'autore e la fonte originale.

Dichiarazione di disponibilità dei dati: Tutti i dati rilevanti sono contenuti nell'articolo e nei file di supporto.

Finanziamento: Gli autori non hanno ricevuto finanziamenti specifici per questo lavoro.

Interessi in competizione: Gli autori hanno dichiarato che non esistono interessi in

che, tra i 56 polifenoli testati, compresi gli estratti vegetali, la brasilina, la teaflavina-3,3'-digallato e la curcumina hanno mostrato il più alto legame con il dominio di legame al recettore della proteina spike, inibendo l'attaccamento virale al recettore 2 dell'enzima di conversione dell'angiotensina umano e quindi l'ingresso cellulare dei virioni pseudotipi di SARS-CoV-2. Sia la teaflavina-3,3'-digallato a 25 µg/ml che la curcumina a concentrazioni superiori a 10 µg/ml hanno mostrato di legarsi al recettore 2 dell'enzima di conversione dell'angiotensina, riducendone al contempo l'attività in saggi sia liberi da cellule che basati su cellule. Il nostro studio dimostra inoltre che la brasilina e il teaflavina-3,3'-digallato, e in misura ancora maggiore la curcumina, riducono l'attività della serina proteina transmembrana 2 sia in saggi liberi da cellule sia in saggi basati su cellule. Uno schema simile è stato osservato con la catepsina L, anche se solo l'afflavina-3,3'-digallato ha mostrato una modesta diminuzione dell'espressione della catepsina L a livello proteico. Infine, ciascuno di questi tre composti ha aumentato moderatamente il pH endosomiale/lisosomiale. In conclusione, questo studio dimostra l'efficacia pleiotropica anti-SARS-CoV-2 di specifici polifenoli e le loro prospettive per ulteriori indagini scientifiche e cliniche.

(2019-nCoV), appartiene al genere *Betacoronavirus* della famiglia *Coronaviridae* ed è stato identificato come causa di infezione respiratoria caratteristica della malattia COVID-19, dichiarata pandemia dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 2020 [1]. Secondo gli Istituti Nazionali di Sanità degli Stati Uniti

Introduzione

Il ceppo SARS-CoV-2, noto anche come novel coronavirus 2019

(NIH), questo ceppo è strettamente correlato al ceppo SARS-CoV-1 (SARS-CoV) che è stato responsabile delle epidemie del 2002–2004 in Asia [2–5]. Con un genoma di circa 30 kilobasi, che codifica proteine strutturali come la proteina spike (S), la proteina dell'involucro (E), la proteina della membrana (M) e la proteina del nucleocapside (N), il SARS-CoV-2 è un virus a RNA a singolo filamento con senso positivo che invade le cellule umane attraverso il legame della sua proteina spike di superficie (glicoproteina S) a un recettore specifico presente sulla membrana delle cellule [3–5]. Questo legame media la fusione della membrana cellulare dell'ospite virale e l'ingresso endocitico [5, 6].

La proteina spike è una proteina transmembrana con un dominio N-terminale (NTD) e un dominio C terminale (CTD). Il dominio N-terminale, o subunità S1, contiene il dominio di legame al recettore (RBD), mentre il C-terminale, o subunità S2, è caratterizzato da due regioni a ripetizione eptadica (HR) che, al momento dell'assemblaggio, inducono la fusione della membrana e l'ingresso del virus nella cellula ospite [5–9]. Zhou *et al.* e Hoffman *et al.*, tra gli altri, hanno dimostrato che il SARS-CoV-2 si lega a human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2), una proteina monomeric transmembrana presente in molti tipi di cellule umane [10–13]. Poiché la proteina spike governa l'attaccamento virale e la fusione virus-membrana cellulare, che determina successivamente il destino della replicazione virale e dell'infettività, è stata quindi oggetto di interesse come bersaglio terapeutico [9].

È stato inoltre dimostrato che il legame della proteina spike al recettore ACE2 e l'ingresso virale richiedono il priming della proteina spike sulle unità di superficie S1/S2 e sul sito S2 da parte delle proteasi cellulari dell'ospite. Questa scissione enzimatica bifasica consente la fusione delle membrane virali e cellulari ed è essenziale per la patogenesi virale, attivata da una proteasi di membrana dell'ospite, la furina [8, 14–17]. Inoltre, Liu *et al.* e Glowacka *et al.* hanno dimostrato che la cisteina in proteasi endosomiale cathepsina L e la serina proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2) svolgono un ruolo chiave in nel processo di ingresso [18, 19]. La cathepsina L, membro della famiglia delle proteinasi cisteiniche acide lisosomiali simili alla papaina, è un'endopeptidasi espressa in quasi tutte le cellule eucariotiche umane come proenzima da 43 kDa, che viene ulteriormente convertito nella forma matura, influenzata dal contatto cellula-cellula e da componenti della matrice extracellulare (ECM) come l'eparan solfato, un glicosamino-glicano [20, 21]. È interessante notare che l'aumento dell'attività della cathepsina L nel liquido di rivestimento dell'epitelio polmonare di pazienti affetti da enfisema ha fatto pensare che questo enzima possa essere un fattore determinante anche nella progressione dell'infezione da SARS-CoV-2 [22].

L'altro enzima associato all'infezione da SARS-CoV-2, il TMPRSS2, appartiene, come già detto, alla famiglia delle serina-proteasi. Contiene un dominio transmembrana di tipo II, un dominio recettoriale di classe A, un dominio ricco di cisteina del recettore scavenger e un dominio proteasico [23]. I precedenti rapporti di hanno indicato differenze nell'espressione di TMPRSS2 nelle cellule polmonari di diverse popolazioni. Il genere non è un fattore, secondo diversi altri studi, che hanno suggerito che l'espressione costitutiva di TMPRSS2 nelle cellule polmonari non differisce tra maschi e femmine [24, 25]. Tuttavia, un rapporto di Bertram *et al.* ha suggerito che TMPRSS2 è meno espresso nelle cellule alveolari di tipo II e nei macrofagi alveolari rispetto alle cellule epiteliali bronchiali [26, 27]. Questo studio ha inoltre dimostrato l'assenza di espressione della proteina TMPRSS2 nelle cellule alveolari di tipo I della superficie respiratoria. Questi risultati sono particolarmente interessanti se si considera il ruolo putativo di TMPRSS2 nell'infezione da SARS-CoV-2 [11].

I polifenoli sono uno dei più importanti e certamente il più grande tra i gruppi di sostanze fitochimiche presenti nel regno vegetale, con un ampio spettro di proprietà che influenzano i processi fisiologici e biochimici [28–30]. Questo vasto gruppo di composti bioattivi è suddiviso in sei classi principali: acidi idrossibenzoici, acidi idrossicinnamici, flavonoidi, stilbenici e lignani. I flavonoidi sono ulteriormente suddivisi in sottogruppi, che comprendono flavonoli, flavoni, isoflavoni, flavanoni, antocianidine e flavanoli. Molti polifenoli hanno dimostrato

efficacia terapeutica in vari aspetti della salute umana [31]. È inoltre noto che la loro assunzione adeguata può contribuire a modulare le risposte immunitarie e la resistenza alle infezioni. L'efficacia dei polifenoli come composti antivirali è stata spesso segnalata e vi è

un enorme potenziale nell'esplorazione delle loro proprietà antivirali, dal momento che sono comunemente riconosciuti come sicuri ed efficaci nel sostituire o nel servire come trattamento aggiuntivo alle terapie convenzionali [32-50]. Sebbene esistano già informazioni sostanziali sull'attività dei polifenoli contro il SARS-CoV-2, la maggior parte di questi risultati deriva da modelli e previsioni computazionali e la loro capacità come agenti anti-SARS-CoV-2 deve ancora essere valutata scientificamente e clinicamente.

Qui presentiamo risultati sperimentali che dimostrano il potenziale dei polifenoli rappresentativi nell'inibire il legame e l'ingresso dei virioni di SARS-CoV-2. Utilizzando una metodologia standard e recentemente sviluppata, abbiamo riportato che, tra i 56 composti fenolici testati, compresi gli estratti vegetali, la brasilina, il TF-3 e la curcumina hanno la più alta affinità di legame con la RBD virale della proteina spike della SARS-CoV-2. Inoltre, l'esperimento contemporaneo con particelle pseudo-virali di SARS-CoV-2 ha rivelato che questi tre polifenoli hanno un effetto inibitorio pronunciato sul legame virale e sull'ingresso nelle cellule. Abbiamo anche scoperto che il TF-3 e la curcumina inibiscono l'attività delle proteasi TMPRSS2 e catepsina L che facilitano il legame e l'uscita endosomiale del SARS-CoV-2 e aumentano modestamente il pH lisosomiale, così come la brasilina. In conclusione, questo studio documenta l'attività anti-SARS-CoV-2 di questi tre polifenoli, fornendo una base scientifica per ulteriori indagini in studi clinici e in *vivo*.

Materiali e metodi

Linee cellulari e pseudovirus

La linea cellulare epiteliale alveolare umana A549 è stata ottenuta dall'ATCC (American Type Culture Collection) (Manassas, VA). La linea di cellule epiteliali alveolari umane A549, che sovraesprime in modo stabile il recettore hACE2 (hACE2/A549), e le particelle pseudotipizzate eGFP-luciferasi-SARS-CoV-2 spike glycoprotein sono state ottenute da GenScript (Piscataway, NJ). Le linee cellulari sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) integrato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina. Lo pseudo-tipo ΔG-luciferasi (G* ΔG-luciferasi) rVSV è stato acquistato da Kerafast (Boston, MA). Le particelle pseudovirali calde con eGFP e luciferasi (particelle pseudotipizzate eGFP-luciferasi-SARS-CoV-2) sono state acquistate da BPS Bioscience (San Diego, CA). Le particelle lentivirali che codificano TMPRSS2 umano sono state acquistate da Addgene (Watertown, MA).

Composti di prova, anticorpi, proteine ricombinanti e inibitori

La curcumina, l'estratto di tè standardizzato all'85% di teaflavine, la teaflavina-3,3'-digallato, l'acido gallico, l'acido tannico, l'estratto di *Andrographis paniculata*, l'andrografolide, l'estratto di liquirizia, l'acido glicirizico, l'estratto di broccoli, l'L-sulforafano, l'acido usnico, l'acido malico, il D-limonene e l'ammoniaca cloridrica con una purezza compresa tra il 95 e il 99%, secondo il produttore, sono stati acquistati da Sigma (St. Louis, MO). Tutti gli altri polifenoli e il camostat mesilato, con purezza compresa tra il 95-99% secondo il produttore, sono stati ottenuti da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). Per lo studio di screening, i composti in esame sono stati preparati come soluzione madre di 10 mg/ml (25% DMSO) e per il resto degli esperimenti come 1,0 mg/ml (1% DMSO) e 10 mg/ml (10% DMSO). Tutti gli anticorpi sono stati prodotti da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). La proteina ricombinante TMPRSS2 è stata prodotta da Creative BioMart (Shirley, NY).

Saggi di legame e ingresso del recettore

Legame tra SARS-CoV-2 RBD e hACE2. La reazione di legame è stata eseguita utilizzando un kit per il test di neutralizzazione del virus surrogato della SARS-CoV-2 in

grado di rilevare anticorpi o inibitori che bloccano l'interazione tra la proteina spike RBD-SARS-CoV-2 e hACE2.

(GenScript, Piscataway, NJ). Per lo screening, i composti fenolici o gli estratti vegetali (alla concentrazione di 100 µg/ml) sono stati incubati con il dominio RBD-SARS-CoV-2 spike S1 coniugato con HRP per 30 minuti a 37°C. Successivamente, i campioni incubati con RBD sono stati trasferiti in una piastra a 96 pozzetti con il recettore hACE2 immobilizzato e incubati per altri 15 minuti a 37°C. Successivamente, le piastre sono state lavate quattro volte con il tampone di lavaggio e sviluppate con la soluzione di substrato TMB per un massimo di 5 minuti, seguita dall'aggiunta del tampone di stop. La densità ottica è stata misurata immediatamente a 450 nm con un lettore di piastre (Molecular Devices, San Jose, CA). I controlli positivi e negativi sono stati forniti dal produttore. Il controllo è stato lo 0,25% di DMSO. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 6).

Legame dello pseudo-virus SARS-CoV-2 con hACE2. La reazione di legame è stata eseguita utilizzando un protocollo sviluppato da GenScript con piccole modifiche applicate. In breve, lo pseudo-virus eGFP-luciferasi-SARS-CoV-2 spike S1 è stato pre-incubato a 37°C con polifenoli selezionati (cioè brasilina, TF-3 e curcumina) a concentrazioni comprese tra 0-25 µg/ml per: 1) 1 ora prima dell'aggiunta in piastra con cellule hACE2/A549, 2) aggiunta simultanea in piastra con cellule hACE2/A549 o 3) aggiunta in piastra con cellule hACE2/A549 1 ora dopo il trattamento. È stato eseguito un esperimento parallelo, in cui lo pseudo-virus avvolto dalla proteina spike eGFP-luciferasi-CoV-2 è stato spin-inoculato a 1.200 x g per 45 minuti. I campioni sono stati incubati per altre 1h, 3h e 48h a 37°C. Dopo il periodo di incubazione, le piastre sono state lavate tre volte con il tampone di lavaggio (fornito dal produttore) e si è misurato il segnale HRP o l'attività della luciferasi utilizzando il Luciferase Glo Kit (Promega, Madison, WI). Negli esperimenti di 1h e 3h, i controlli positivi e negativi sono stati gli stessi utilizzati nel saggio del legame tra SARS-CoV-2 RBD e hACE2 e sono stati forniti dal produttore. Negli esperimenti di 48 ore, il controllo positivo è stato costituito da particelle pseudotipizzate di eGFP-luciferasi-SARS-CoV-2 e il controllo negativo da particelle pseudotipizzate di ΔG-luciferasi rVSV. Il controllo è stato lo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 6).

Cellule esperimenti la proteina spike del SARS-CoV-2 che si legano a hACE2 solubile.

Per trasdurre le cellule con il vettore lentivirus eGFP-luciferasi-SARS-CoV-2 spike S1 (GenScript, Piscataway, NJ), le cellule A549, seminate in una piastra a 6 pozzetti in presenza di terreno di crescita completo, sono state trattate con 8 µl/ml di polibrene (Sigma, St. Louis, MO) per 30 minuti, seguita dall'aggiunta di lentivirus eGFP-luciferasi-SARS-CoV-2 spike S1 a MOI = 40 [51] e dalla spin-inoculazione a 1.000 x g. per 1,5 ore. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, le cellule sono state alimentate con terreno di crescita completo fresco. Dopo 48 ore dall'inoculazione, le cellule sono state staccate con 1 mM EDTA, lavate due volte con 1 x PBS (phosphate-buffered saline) integrato con il 3% di FBS e trattate con le concentrazioni indicate di polifenoli per 1 ora, seguite dall'incubazione con 5 µg/ml di hACE2 solubile (Sigma, St. Louis, MO) per 1 ora in ghiaccio. Dopo tre lavaggi con FBS al 3% in 1 x PBS, le cellule sono state trasferite in piastre con anticorpo monoclonale umano anti-ACE2 a 10 µg/ml (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). Dopo 1 ora di incubazione, i pozzetti sono stati lavati tre volte con FBS al 3% in 1 x PBS e la fluorescenza è stata misurata alla lunghezza d'onda Ex/Em = 488/535 nm con un lettore di piastre (Tecan Group Ltd, Svizzera). I controlli positivi e negativi erano gli stessi utilizzati per il test di legame tra SARS-CoV-2 RBD e hACE2 e sono stati forniti dal produttore. Il controllo era lo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 6).

Saggio di fusione cellula-cellula

Il saggio di fusione cellula-cellula è stato eseguito secondo [Ou et al. \[13\]](#). In breve, le cellule

A549 trasdotte con il vettore lentivirus eGFP-luciferasi-SARS-CoV-2 spike S1 (GenScript, Piscataway, NJ) sono state staccate con 1 mM EDTA, trattate con concentrazioni indicate di polifenoli selezionati, per 1h a 37°C, e sovrapposte a cellule epiteliali polmonari umane A549 confluenti all'80-95% che sovraesprimono

hACE2. Dopo 4 ore di incubazione a 37°C, le immagini dei sincizi sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza Zeiss AxioObserver A1 (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA). Il controllo positivo è stato

20 µg/ml di anticorpo anti-ACE2. Il controllo era costituito dallo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi in percentuale rispetto al controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 3).

Saggio di attività TMPRSS2

Il saggio dell'attività TMPRSS2 cellulare è stato eseguito secondo un rapporto pubblicato in precedenza [52]. In breve, le cellule hTMPRSS2/A549 sono state seminate in piastre da 48 pozzetti. 48 ore o 3 ore prima delle misurazioni dell'attività proteica, le cellule sono state trattate con polifenoli selezionati a concentrazioni di 5,0-25 µg/ml. Successivamente, le cellule sono state lavate con DMEM senza rosso fenolo e l'attività proteica è stata valutata incubando le cellule con il substrato fluorogenico Mes-D-Arg-Pro-Arg-AMC da 200 µM in PBS 50 mM (pH = 7,4) per 30 min. a 37°C (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). L'idrolisi del peptide è stata monitorata mediante la misurazione dell'intensità di fluorescenza, utilizzando uno spettrofluorimetro con lunghezza d'onda Ex/Em = 360/440 nm (Tecan Group Ltd, Svizzera). Il controllo positivo è stato 50 µM di camostat mesilato. Il controllo è stato lo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 6).

Il saggio diretto dell'attività di TMPRSS2 con l'enzima ricombinante è stato eseguito secondo un rapporto precedentemente pubblicato [53]. Per determinare l'effetto inibitorio dei polifenoli selezionati sull'attività della proteina TMPRSS2 isolata, ai polifenoli selezionati è stato aggiunto 1 µM di peptide fluorogenico Boc-Gln-Ala-Arg-AMC diluito a concentrazioni di 5,0-25 µg/ml. A questa reazione sono stati aggiunti 10 µM di enzima TMPRSS2 in tampone di dosaggio (50 mM Tris pH = 8, 150 mM NaCl).

Dopo 1 ora di incubazione a RT, la rilevazione del segnale fluorescente è stata effettuata con uno spettrofluorimetro a lunghezza d'onda Ex/Em = 360/440 nm (Tecan Group Ltd, Svizzera). Il controllo positivo è stato 100 µM di camostat mesilato. Il controllo è stato lo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 6).

Saggi di attività della catepsina L

I saggi dell'attività della catepsina L cellulare sono stati eseguiti utilizzando il Cathepsin L Activity Assay Kit (Abcam, Cambridge, MA) secondo il protocollo del produttore. In breve, le cellule A549 sono state seminate in piastre a 6 pozzetti e lasciate aderire per 24 ore o fino a raggiungere il 90-95% della confluenza. Successivamente, le cellule sono state trattate con le concentrazioni indicate di polifenoli selezionati per altre 24 ore, lavate con 1 x PBS freddo e lisate con 100 µl di tampone CL raffreddato in ghiaccio per 5 minuti. I campioni sono stati quindi centrifugati per 2 minuti a 4°C per rimuovere il materiale insolubile. I sovranatanti sono stati raccolti e trasferiti in provette pulite conservate in ghiaccio. La reazione enzimatica è stata allestita mescolando pozzetti di campioni trattati contenenti 50 µl di campione, 50 µl di campione non trattato (controllo), 50 µl di controllo di fondo, un controllo positivo contenente 5 µl di controllo positivo ricostituito in 45 µl di tampone CL e un controllo negativo contenente 5 µl di controllo positivo ricostituito in 45 µl di tampone CL e 2 µl di inibitore CL. Successivamente, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 50 µl di tampone CL e 1 µl di DTT 1 mM. Infine, sono stati aggiunti 2 µl 10 mM di substrato CL Ac-FR-AFC (200 µM di concentrazione finale) a ciascun pozzetto, ad eccezione dei campioni di controllo del fondo. Le piastre sono state incubate a 37°C per 1 ora e il segnale di fluorescenza è stato misurato alla lunghezza d'onda Ex/Em = 400/505 nm con uno spettrofluorimetro (Tecan Group Ltd, Svizzera). Il controllo è stato lo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi come

percentuale del controllo senza polifenoli (media \pm SD, n = 6).

L'effetto inibitorio dei polifenoli selezionati sull'attività dell'enzima catepsina L isolato è stato valutato utilizzando il Cathepsin L Activity Screening Kit (Abcam, Cambridge, MA) secondo il protocollo del produttore. I polifenoli selezionati a concentrazioni di 0,25-2,5 $\mu\text{g/ml}$ sono stati aggiunti alla catepsina L (0,2 mU/ μl) e la miscela di reazione è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente. Il controllo positivo era il campione contenente solo catepsina L e il controllo negativo

era un campione contenente catepsina L e inibitore della catepsina L (FF-FMK) (10 μ M). Il substrato della catepsina L (Ac-FR-AFC) (10 mM) è stato aggiunto a ciascun pozzetto e la piastra è stata incubata per 30 minuti a 37°C. La fluorescenza è stata misurata alla lunghezza d'onda Ex/Em = 405/505 nm con uno spettrofluorimetro (Tecan Group Ltd, Svizzera). Il controllo è stato lo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 6).

Saggi di attività dell'ACE2

Per determinare l'effetto inibitorio dei polifenoli selezionati sull'attività della proteina hACE2 cellulare, le cellule hACE2/A549 sono state seminate in piastre a 48 pozzetti e lasciate aderire per 24 ore o fino a raggiungere il 99-100% della confluenza. Le cellule sono state poi trattate con le concentrazioni indicate di polifenoli selezionati per altre 24 ore, prima di essere lavate con una soluzione fredda 1 x

PBS, e la reazione enzimatica è stata avviata aggiungendo 200 μ M di substrato fluorogenico Mca-

Y-V-A-D-A-P-K(Dnp)-OH. Infine, le piastre sono state incubate a 37°C per 1 ora e il segnale di fluorescenza è stato misurato alla lunghezza d'onda Ex/Em = 320/405 nm con uno spettrofluorimetro (Tecan Group Ltd, Svizzera). Il controllo è stato lo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 6).

Per determinare l'effetto inibitorio dei polifenoli selezionati sull'attività della proteina ricombinante hACE2, è stato utilizzato un ACE2 Activity Screening Assay Kit (BPS Bioscience, San Diego, CA) secondo il protocollo del produttore. In breve, all'enzima ACE2 (0,2 mU/ μ l) sono stati aggiunti i polifenoli selezionati a concentrazioni di 5,0-25 μ g/ml e la miscela di reazione è stata incubata per 15 minuti a RT. Il controllo positivo era un campione contenente solo l'enzima ACE2, mentre il controllo negativo era un campione contenente l'enzima ACE2 e il 10% di DMSO. Il substrato fluorogenico ACE2 (10 μ M) è stato aggiunto a ciascun pozzetto e la piastra è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente. La fluorescenza è stata misurata alla lunghezza d'onda Ex/Em = 535/595 nm utilizzando uno spettrofotometro (Tecan Group Ltd, Svizzera). Il controllo era lo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 6).

Saggio di legame dell'ACE2

Per determinare l'effetto inibitorio dei polifenoli selezionati sul legame con il recettore ACE2, è stato utilizzato un ACE2 Inhibitor Screening Assay Kit (BPS Bioscience, San Diego, CA) secondo il protocollo del produttore. In breve, al recettore ACE2 immobilizzato sulla piastra (1,0 μ g/ml) sono stati aggiunti polifenoli selezionati a concentrazioni di 5,0-25 μ g/ml e la miscela di reazione è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente. Il controllo positivo conteneva 20 μ g/ml di anticorpo anti-ACE2 nel campione, mentre il controllo negativo era un campione senza aggiunta. Successivamente, la piastra è stata lavata tre volte con il tampone di lavaggio e la proteina spike SARS-CoV-2 a 1,0 μ g/ml è stata applicata per 1 ora a temperatura ambiente, seguita da tre lavaggi, blocco con il tampone di blocco e incubazione con l'anticorpo secondario coniugato con HRP per un'ulteriore ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state nuovamente lavate tre volte con il tampone di lavaggio e la chemiluminescenza è stata misurata utilizzando il substrato ECL A e il substrato ECL B miscelati 1:1, utilizzando un lettore di micropiastre (Tecan Group Ltd, Svizzera). Il controllo era costituito dallo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 6).

Test del pH endosomiale/lisosomiale

Il pH endosomiale è stato valutato secondo un protocollo precedentemente riportato [54].

Brevemente, le cellule A549 sono state seminate in camere a 8 pozzetti (MatTek, Ashland, MA) e, al 95-100% di confluenza, sono state trattate con i polifenoli indicati a concentrazioni di 5,0 e 25 µg/ml, seguite da un'incubazione di 3 ore a 37°C in un ambiente al 5% di CO₂. L'arancio di acridina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) è stato aggiunto direttamente a ciascun piatto per raggiungere una concentrazione finale di 6,6 µg/ml. Le cellule sono state

Inoltre, sono stati incubati a 37°C con il 5% di CO₂ per 20 min. e lavati tre volte con 1 x PBS. Nei pozzetti è stata aggiunta la Live Cell Imaging Solution (LCIS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e le immagini sono state scattate con un microscopio a fluorescenza Zeiss Axio Observer A1 con un ingrandimento di 40x. Il controllo era lo 0,025% di DMSO, mentre il controllo positivo era il 20 mM di cloruro di ammoniaca. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 3).

Un esperimento concomitante è stato eseguito utilizzando il pHrodo™ Green AM Intracellular pH Indicator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) secondo il protocollo del produttore.

Brevemente, le cellule A549 sono state seminate al 95-100% di confluenza, trattate con i polifenoli indicati alle concentrazioni di 5 e 25 µg/ml e incubate per 24 ore a 37°C con il 5% di CO₂. Successivamente, 10 µl del colorante pHrodo™ Green AM sono stati aggiunti a 100 µl di PowerLoad™ per facilitare il caricamento cellulare uniforme degli esteri di AM e l'intera soluzione di colorante è stata trasferita in 10 ml di LCIS. Il terreno di crescita delle cellule è stato rimosso, le cellule sono state lavate una volta con LCIS e sostituite con la soluzione di colorazione pHrodo™ Green AM. La piastra è stata incubata per 30 minuti a 37°C, lavata nuovamente con LCIS e la fluorescenza è stata misurata alla lunghezza d'onda Ex/Em = 509/533 nm utilizzando uno spettrofluorimetro (Tecan Group Ltd, Svizzera).

L'identificazione del pH è stata eseguita in base alla curva standard, utilizzando un kit di calibrazione del pH intracellulare secondo il protocollo del produttore (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). In breve, dopo aver eseguito l'esperimento cellulare con pHrodo™ Green AM, le cellule sono state lavate due volte con LCIS, il LCIS è stato sostituito con il tampone di calibrazione del pH cellulare a pH = 4,5, integrato con 10 µM di valinomicina e 10 µM di nigericina, e le cellule sono state incubate a 37°C per 5 minuti. Successivamente, la fluorescenza è stata misurata alla lunghezza d'onda Ex/Em = 509/533 nm. Questi passaggi sono stati ripetuti con i tre tamponi di calibrazione del pH cellulare a pH = 5,5, 6,5 e 7,5, rispettivamente, per ottenere complessivamente quattro punti dati che sono stati tracciati per ottenere la curva standard del pH. Il controllo era lo 0,025% di DMSO, mentre il controllo positivo era il 20 mM di cloruro di ammoniaca. L'esperimento è stato ripetuto tre volte, ciascuna in triplo.

Saggio di vitalità

Per valutare la vitalità cellulare è stato utilizzato il saggio MTT. In breve, le cellule A549 sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti a una densità cellulare di 40.000 per pozzetto e lasciate aderire per 24 ore, quindi trattate con diverse concentrazioni di polifenoli selezionati per un massimo di 48 ore. Successivamente, il terreno di coltura completo è stato sostituito con uno nuovo addizionato di 5 mg/ml di MTT, seguito da un'incubazione di 3 ore a 37°C. Dopo aver rimosso il terreno di coltura, sono stati aggiunti 100 µl di metanolo e l'assorbanza è stata misurata a 570 nm con uno spettrofotometro (Molecular Devices, San Jose, CA). Il controllo è stato effettuato con lo 0,025% di DMSO. I risultati sono espressi come percentuale del controllo senza polifenoli (media +/- SD, n = 10).

Analisi in Western blot

Le cellule A549 sono state trattate con concentrazioni indicate di polifenoli selezionati e lisate utilizzando il tampone di lisi RIPA (Sigma, St. Louis, MO) integrato con inibitori delle proteasi 1X Complete (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). La concentrazione proteica è stata misurata con il Dc protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Le proteine (50 µg/pozzetto) sono state separate su gel SDS-PAGE a gradiente 8-16% e trasferite su una membrana PVDF. Le proteine specifiche sono state rilevate con anticorpi umani anti-cathepsina L, anti-TMPRSS2 e anti-ACE2 monoclonali disponibili in commercio, tutti con diluizione 1:200, e

con l'anticorpo anti- β -actina come controllo di carico con diluizione 1:1000. Le immagini sono state acquisite con il sistema di imaging digitale Azure™ cSeries (Azure Biosystems, Dublin, CA) con impostazioni di esposizione automatica. La densitometria è stata eseguita con il software NIH ImageJ.

Analisi statistica

I dati di tutti gli esperimenti sono presentati come valore medio e deviazione standard di almeno tre esperimenti indipendenti. Il confronto tra i diversi campioni è stato effettuato con un test T a due code utilizzando il programma Microsoft Office Excel. Le differenze tra i campioni sono state ritenute significative con valori di p inferiori a 0,05.

Risultati

Efficacia di composti fenolici ed estratti vegetali nel prevenire il legame della sequenza RBD del SARS-CoV-2 con il recettore hACE2

Abbiamo studiato la capacità di diverse classi di polifenoli di inibire il legame della sequenza RBD della proteina spike del SARS-CoV-2 al recettore hACE2, adottando un approccio in due fasi. Nel primo approccio abbiamo esaminato la capacità di 56 polifenoli ed estratti di piante di inibire il legame della proteina spike RBD-SARS-CoV-2 coniugata con HRP al recettore hACE2 immobilizzato. Come riportato nelle tabelle 1 e 2, tre polifenoli: brasilina, TF-3 e curcumina hanno mostrato il massimo effetto inibitorio alla concentrazione di 100 µg/ml. Inoltre, l'effetto inibitorio di questi polifenoli più efficaci, ossia brasilina, TF-3 e curcumina, era dose-dipendente, variando dal 20% al 100% rispettivamente a 2,5-100 µg/ml (Fig. 1A).

Nel secondo approccio, abbiamo incubato le cellule A549 che esprimono la proteina spike della SARS-CoV-2 con questi tre polifenoli selezionati per 1 ora e poi le abbiamo esposte al recettore solubile hACE2. Anche in questo esperimento abbiamo osservato un'interferenza dose-dipendente che va da 15% al 100% a 2,5-100 µg/ml, rispettivamente, che corrispondono ai risultati ottenuti in precedenza (Fig 1B).

Un test di vitalità cellulare ha rivelato che l'incubazione a breve termine (cioè fino a 3 ore) con questi polifenoli a concentrazioni fino a 100 µg/ml non ha mostrato citotossicità. Tuttavia, con un tempo di incubazione prolungato a 48 ore a dosi di 50 µg/ml e superiori, si è notata una diminuzione della vitalità cellulare (Fig. 1C).

Effetti di brasilina, teaflavina-3,3'-digallato e curcumina sul legame e sull'ingresso cellulare di pseudo-virioni di SARS-CoV-2

In esperimenti successivi, abbiamo verificato se gli effetti inibitori osservati di brasilina, TF-3 e curcumina, sul legame di RBD con hACE2, persistono quando si utilizzano particelle virali SARS-CoV-2. In questi test abbiamo utilizzato pseudo-virioni avvolti con la proteina spike della SARS-CoV-2 e abbiamo applicato tre diversi schemi, come segue: 1) i virioni di SARS-CoV-2 portatori dei geni per la GFP-luciferasi e pseudo-tipizzati con la proteina spike sono stati incubati con polifenoli selezionati per 1h prima di essere aggiunti alle cellule hACE2/A549, 2) i virioni di SARS-CoV-2 portatori dei geni per la GFP-luciferasi e pseudo-tipizzati con la proteina spike sono stati aggiunti contemporaneamente alle cellule hACE2/A549, e 3) virioni di SARS-CoV-2 portatori dei geni per la GFP-luciferasi e pseudo-tipizzati con la proteina spike sono stati aggiunti a cellule hACE2/A549 e 1 ora dopo i polifenoli sono stati applicati alle cellule hACE2/A549. L'efficacia del legame per ogni modello di applicazione è stata valutata dopo 1 ora o 3 ore di incubazione con le cellule hACE2/A549. Inoltre, abbiamo valutato l'efficacia di questi polifenoli dopo 48 ore dall'infezione, con o senza spin-inoculation.

L'esperimento sull'efficacia del legame ha rivelato che la brasilina, il TF-3 e la curcumina inibiscono, in modo dose-dipendente, il legame dei virioni pseudotipizzati della proteina spike del SARS-CoV-2 con hACE2/ A549, indipendentemente dal tempo di esposizione e dal modello di applicazione. Anche questo esperimento ha mostrato un'inibizione significativa da

parte di questi polifenoli, a partire da 5,0 µg/ml, quando è stata consentita un'incubazione di 1 ora (Fig. 2A). Con un'incubazione prolungata a 3 ore, è stata osservata un'inibizione significativa da 2,5 µg/ml quando i virioni di SARS-CoV-2 sono stati incubati con polifenoli selezionati per 1h prima di

Tabella 1. Legame di varie classi di composti fenolici con la RBD del SARS-CoV-2.

| Polifenoli e alcaloidi testati (0,1 mg/ml) | Legame con RBD (% del controllo \pm SD) |
|--|---|
| Acidi fenolici | |
| Acido gallico | 18.3 \pm 4.5 |
| Acido tannico | 79.4 \pm 2.3 |
| Curcumina | 100\pm0.2 |
| Acido clorogenico | 25.5 \pm 2.5 |
| Acido rosmarinico | 22.5 \pm 3.8 |
| Flavonoidi | |
| Fisetina | 22.4 \pm 1.9 |
| Quercetina | 22.4 \pm 6.5 |
| Morin | 30.5 \pm 5.8 |
| Miricetina | 45.5 \pm 5.4 |
| Kaemferol | 15.6 \pm 2.9 |
| Rutina | 20.6 \pm 6.3 |
| Luteolina | 10.4 \pm 4.7 |
| Baicaleina | 22.5 \pm 5.1 |
| Baicalina | 10.3 \pm 2.9 |
| Scutellarina | 8.1 \pm 3.7 |
| Naringina | 23.6 \pm 6.4 |
| Naringenina | 20 \pm 5.1 |
| Esperidina | 90.3 \pm 3.8 |
| Esperetina | 42.5 \pm 4.6 |
| Apigenina | 17.1 \pm 4.1 |
| Genisteina | 22.1 \pm 2.8 |
| Floroglucinolo | 69.5 \pm 3.6 |
| Schizandrin | 22.4 \pm 3.3 |
| Urolitina A | 31.1 \pm 4.6 |
| Punicalagin | 32.3 \pm 5.9 |
| Brasilein | 100\pm0.1 |
| Ispidulina | 20.1 \pm 6.0 |
| Papaverina | 1.6 \pm 0.2 |
| Silimarina | 30.0 \pm 2.6 |
| Procianidina B2 | 31.1 \pm 3.6 |
| Procianidina B3 | 32.3 \pm 3.7 |
| Stilbeni | |
| Trans-resveratrolo | 22.3 \pm 2.9 |
| Pterostillbene | 23.1\pm2.8 |
| Alcaloidi | |
| Palmatina | 40.4 \pm 6.1 |
| Berberina | 17.3 \pm 2.7 |
| Cannabidiolo | 1.4 \pm 0.3 |
| Castanospermina | 8.2 \pm 2.3 |
| Acido Usnico | 22.0 \pm 3.4 |
| Acido malico | 1.2 \pm 3.7 |
| Terpeni | |
| D-limonene | 27.2 \pm 6.4 |
| Acido carnosico | 27.1 \pm 5.1 |

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489.t001>

Tabella 2. Legame di estratti vegetali selezionati e dei loro componenti principali con la RBD del SARS-CoV-2.

| Estratti vegetali testati e loro principali composti attivi (0,1 mg/ml) | Legame con RBD (% del controllo±SD) |
|---|-------------------------------------|
| Estratto di tè (85% catechina standardizzata) | 88.3±3.7 |
| (+)-gallocatechina | 69.5±2.8 |
| (-)-catechina gallato | 37.4±4.7 |
| (-)-gallocatechina gallato | 75.4±5.6 |
| (-)-gallocatechina | 73.5±6.7 |
| (+)-epigallocatechina gallato | 87.5±6.8 |
| Estratto di tè (85% di teaflavine standardizzate) | 100±0.3 |
| Teaflavina | 27.3±1.4 |
| Teaflavina-3,3'-digallato | 100±0.1 |
| Estratto di broccoli | 28.6±2.6 |
| L-sulforafano | 30.2±3.6 |
| Estratto di <i>Andrographis paniculata</i> | 18.4±1.8 |
| Andrografolide | 22.1±2.5 |
| Estratto di liquirizia | 18.3±3.6 |
| Acido glicirrizico | 22.2±2.3 |

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489.t002>

alle cellule hACE2/A549. Quando i virioni di SARS-CoV-2 sono stati aggiunti contemporaneamente a polifenoli selezionati alle cellule hACE2/A549, si è notata una significativa inibizione da parte di 5,0 µg/ml e da 10 µg/ml quando i polifenoli selezionati sono stati applicati alle cellule hACE2/A549 1h dopo l'applicazione dei virioni di SARS-CoV-2 (Fig 2B).

Gli esperimenti, in cui l'incubazione è stata prolungata a 48 ore e con l'applicazione o meno della spin-inoculazione, hanno anche rivelato che la brasilina, il TF-3 e la curcumina inibiscono, in maniera dose-dipendente

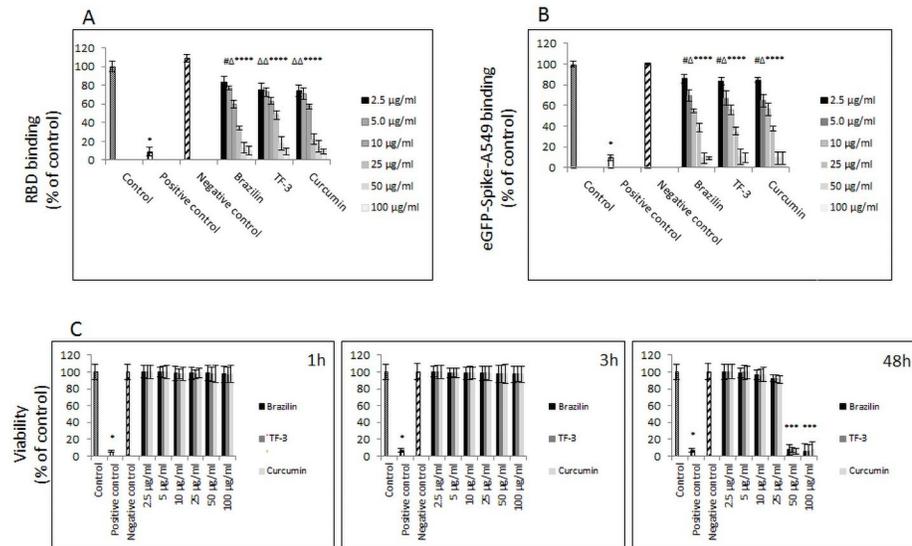


Figura 1. Legame della proteina RBD-spike del SARS-CoV-2 al recettore ACE2 umano. (A) Legame dose-dipendente di RBD-SARS-CoV-2 al recettore hACE2 immobilizzato. Controllo - 0,025% DMSO, controlli positivi e negativi forniti dal produttore; i dati sono presentati come % del controllo ± SD. (B) Legame dose-dipendente delle cellule A546 che esprimono la proteina SARS-CoV-2 eGFP-spike, in presenza dei polifenoli indicati a diverse concentrazioni, al recettore hACE2 solubile. Controllo - 0,25% DMSO; i controlli positivi e negativi sono stati forniti dal produttore; i dati sono presentati come % del controllo ± SD. (C) Vitalità delle cellule A549, controllo positivo-100% di cellule morte, controllo negativo campione senza aggiunta; TF-3-teaflavina-3,3'-digallato; # p < 0,05, Δ p < 0,01, * p < 0,001.

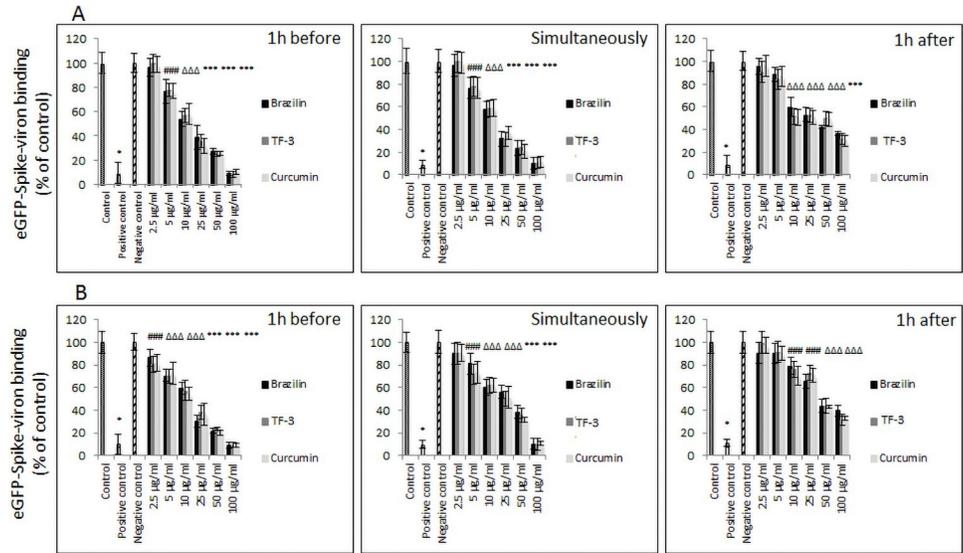


Figura 2. Legame dello pseudo-virione SARS-CoV-2 al recettore ACE2 umano. (A) Legame dose-dipendente degli pseudo-virioni incapsulati con la proteina spike del SARS-CoV-2 alle cellule A549 che sovraesprimono il recettore ACE2 umano, valutato dopo 1 ora di incubazione. (B) Legame dose-dipendenti di pseudo-virioni incapsulati con la proteina spike del SARS-CoV-2 a cellule A549 che sovraesprimono stabilmente il recettore hACE2, valutato dopo 3 ore di incubazione. I dati sono presentati come % del controllo \pm SD; controllo- 0,025% DMSO, i controlli positivi e

negativi sono stati forniti dal produttore; TF-3 -teaflavina-3,3'- digallato # $p < 0,05$, $\Delta p < 0,01$, * $p < 0,001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489.g002>

moda, il legame della proteina spike della SARS-CoV-2 pseudo-tipizzata di virioni A549 con hACE2/A549 a concentrazioni non tossiche (cioè, 5,0-25 $\mu\text{g/ml}$). L'inibizione variava dal 20% all'80% quando non veniva introdotto lo spin-inoculation e dal 20% al 40% quando veniva introdotto lo spin-inoculation (Fig. 3). Quando non è stato applicato lo spin-inoculo, è stata osservata un'inibizione significativa da

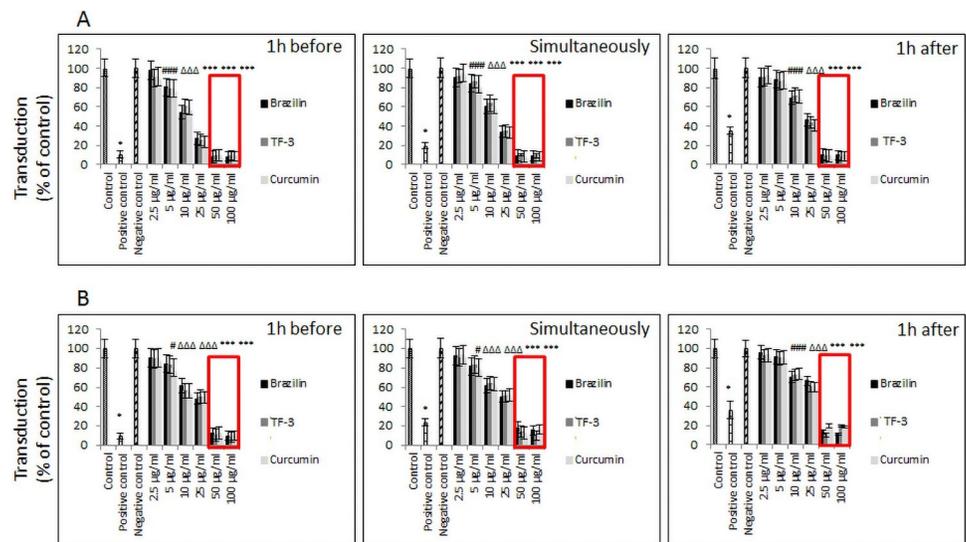


Figura 3. Ingresso cellulare di pseudo-virioni di SARS-CoV-2 eGFP-luciferasi. (A) L'attacco e l'ingresso di pseudo-virioni di SARS-CoV-2 con proteina spike eGFP-luciferasi incapsulata sono stati valutati senza spinfection dopo 48 ore di incubazione. (B) L'attacco e l'ingresso di pseudo-virioni di SARS-CoV-2 con proteina spike eGFP-luciferasi incapsulata sono stati valutati con la spinfezione dopo 48 ore di incubazione. I dati sono presentati come % del controllo \pm SD; TF-3 -teaflavina-3,3'- digallato # $p < 0,05$, $\Delta p < 0,01$, * $p < 0,001$. Controllo- 0,025% DMSO, controllo positivo- SARS-CoV-2 eGFP- luciferasi-pseudo-virioni, controllo negativo- ΔG -luciferasi- particelle pseudo-tipate rVSV; fama rossa-concentrazioni che hanno mostrato 85-100% di citotossicità.



<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489.g003>

5,0 µg/ml di concentrazione quando gli pseudo-virioni di spike SARS-CoV-2 sono stati incubati con i polifenoli selezionati 1 ora prima dell'esposizione delle cellule hACE2/A549 o quando gli pseudo-virioni di spike SARS-CoV-2 sono stati aggiunti contemporaneamente ai polifenoli testati (Fig. 3A). Quando i polifenoli testati sono stati aggiunti 1 ora dopo l'applicazione degli pseudo-virioni di SARS-CoV-2, è stata notata un'inibizione significativa a partire da una concentrazione di 10 µg/ml. Quando il legame virale con le cellule hACE2/A549 è stato forzato mediante l'applicazione di spin-inoculation, è stata osservata un'inibizione significativa a partire da 5,0 µg/ml quando i virioni di SARS-CoV-2 sono stati incubati con la curcumina per 1h prima di essere aggiunti alle cellule hACE2/A549 o quando gli pseudo-virioni di spike di SARS-CoV-2 sono stati aggiunti contemporaneamente alla curcumina. Quando i virioni di SARS-CoV-2 sono stati incubati con brasilina o TF-3, l'effetto inibitorio è stato osservato a partire da una concentrazione di 10 µg/ml. Quando i polifenoli del test sono stati aggiunti 1 ora dopo l'applicazione dei virioni di SARS-CoV-2, è stata osservata un'inibizione significativa a partire dalla concentrazione di 10 µg/ml. 10 µg/ml (Fig. 3B).

Inoltre, in un altro esperimento, in cui le cellule A549 che esprimono virioni pseudo-tipizzati della proteina spike del SARS-CoV-2 sono state pre-incubate con i polifenoli testati e poi stratificate per 4 ore su hACE2/A549, le cellule hanno mostrato un attaccamento significativamente ridotto. L'incubazione con la brasilina a 25 µg/ml ha ridotto la fusione del 40%, con il TF-3 a 10-25 µg/ml dal 40% al 70% e con la curcumina alle stesse concentrazioni, cioè 10-25 µg/ml, dal 70% al 95%. I risultati sono coerenti con le serie di dati ottenuti in precedenza (Fig. 4).

Effetto di brasilina, teaflavina-3,3'-digallato e curcumina sulle proteasi cellulari coinvolte nell'ingresso e nell'uscita endosomiale di pseudo virioni di SARS-CoV-2

La fase cruciale dell'internalizzazione dei virioni SARS-CoV-2 coinvolge il recettore cognato ACE2. Pertanto, abbiamo verificato se la brasilina, il TF-3 e la curcumina influiscono sul legame e sull'attività della molecola ACE2 stessa. I nostri risultati hanno mostrato che la brasilina non si lega direttamente all'ACE2, a differenza del TF-3 e della curcumina, che hanno mostrato un'efficacia di legame rispettivamente a 25 µg/ml e a 10-25 µg/ml. Inoltre, abbiamo osservato un'inibizione minore, pari al 20%-30%, dell'attività dell'ACE2 in entrambi i saggi cell-free e cell-based con TF-3 a 25 µg/ml e curcumina a 10-25 µg/ml, rispettivamente, e nessun effetto con la brasilina (Fig. 5A e 5B).

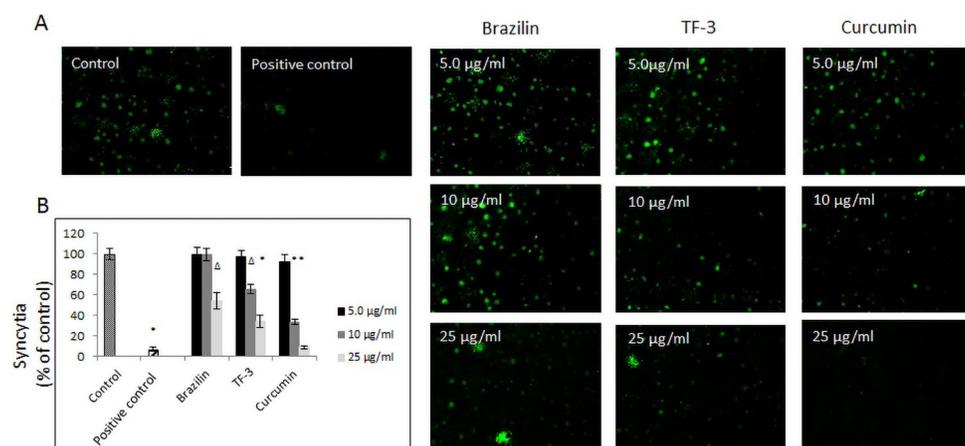


Figura 4. Effetto di polifenoli selezionati sulla fusione con cellule A549 che esprimono il recettore ACE2 umano. (A) Fusione cellula-cellula di cellule A549 che esprimono la proteina spike eGFP con cellule A549 che esprimono stabilmente il recettore ACE2 umano. La barra di scala indica 250 µm. (B) Analisi quantitativa dei sincizi formati. Gli

esperimenti sono stati eseguiti in triplo e ripetuti tre volte. I dati sono presentati come % del controllo \pm SD; TF-3 - teaflavina-3,3'-digallato Δ p 0,01, * p 0,001. Controllo- 0,025% DMSO, controllo positivo \rightarrow 20 μ g/ml anticorpo anti-ACE2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489.g004>

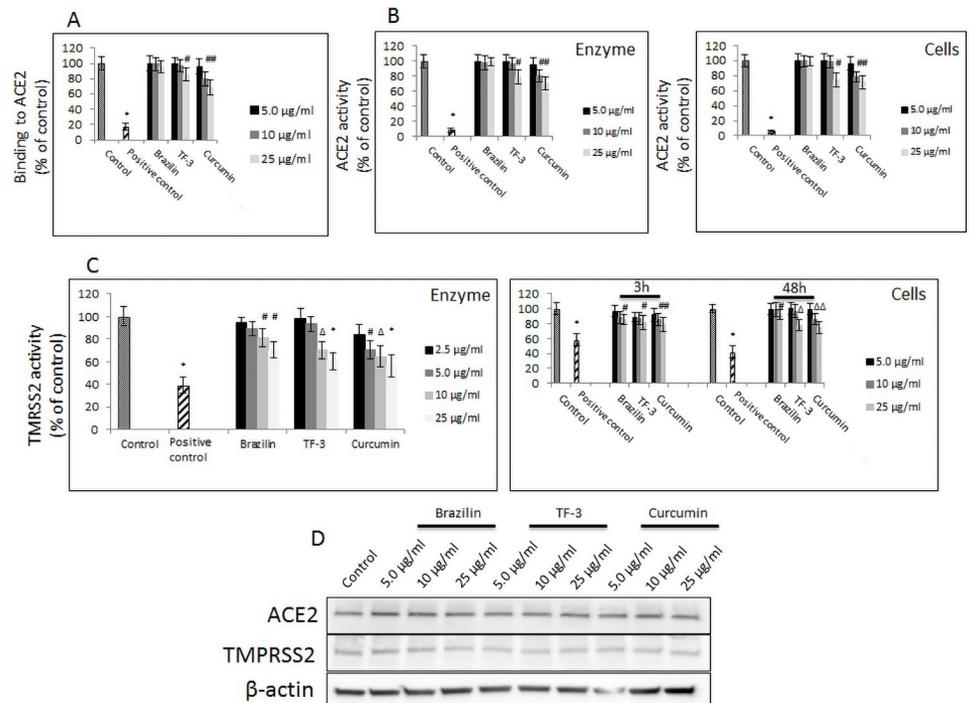


Figura 5. Effetti dei polifenoli selezionati sulle proteasi associate alla membrana cellulare. (A) Legame dei polifenoli indicati a diverse concentrazioni al recettore hACE2. I dati sono presentati come % del controllo \pm SD; controllo - 0,025% DMSO, controllo positivo - 50% DMSO. (B) Attività di hACE2 ricombinante dopo trattamento con i polifenoli indicati a diverse concentrazioni. (pannello di sinistra). Attività di hACE2 cellulare dopo trattamento con i polifenoli indicati a diverse concentrazioni. (pannello di destra). I dati sono presentati come % del controllo \pm SD; * p 0,001. Controllo - 0,025% DMSO, controllo positivo - 10% DMSO. (C) Attività di hTMPRSS2 ricombinante dopo trattamento con i polifenoli indicati a diverse concentrazioni. (pannello di sinistra). Attività della hTMPRSS2 cellulare dopo il trattamento con i polifenoli indicati a diverse concentrazioni (pannello di destra). I dati sono presentati come % del controllo \pm SD; # p 0,05, Δ p 0,01, * p 0,001. Controllo - 0,025% DMSO, controllo positivo - 50-100 μ M camostat mesilato. (D) Analisi in Western blot dell'espressione di hACE2 e hTMPRSS2 in cellule A549 dopo trattamento con i polifenoli indicati a diverse concentrazioni per 48 ore. I dati sono presentati come % del controllo \pm SD; controllo - 0,025% DMSO, TF-3 -teaflavina-3,3'-digallato.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489.g005>

Al fine di approfondire il meccanismo con cui questi tre polifenoli sovrappongono la penetrazione cellulare dei virioni di SARS-CoV-2, e sapendo che i virioni di SARS-CoV-2 si internalizzano attraverso una via endocitica, ma che, allo stesso tempo, sono coinvolte le proteasi cellulari dell'ospite, abbiamo controllato l'attività e l'espressione cellulare di TMPRSS2. Come mostrato nella Fig. 5C, è stata osservata una significativa inibizione dell'attività di hTMPRSS2 ricombinante, dopo un trattamento di 3 ore con brazilina e TF-3 a 10-25 μ g/ml, che varia dal 20 al 30% per la brazilina e dal 30 al 40% per TF-3, mentre il trattamento con curcumina ha ridotto l'attività di TMPRSS2 di circa il 40-50%. Anche l'attività di hTMPRSS2 sovraespresso su cellule A549 è stata influenzata da questi composti dopo 48 ore di trattamento, seguendo lo schema osservato nell'esperimento a breve termine (cioè, 3 ore di trattamento). I nostri risultati hanno anche mostrato che l'espressione di ACE2 e TMPRSS2 a livello proteico non è stata influenzata (Fig. 5D).

Per chiarire ulteriormente se altri componenti noti siano coinvolti nella penetrazione cellulare dei virioni SARS-CoV-2, abbiamo controllato l'attività e l'espressione cellulare della catepsina L, utilizzando l'enzima ricombinante umano e l'enzima derivato da lisati di cellule A549 trattate con i polifenoli testati. Nell'esperimento con gli enzimi ricombinanti, la curcumina ha dimostrato di avere l'effetto inibitorio più profondo, compreso tra il 40% e il 50% a 1,0-2,5 μ g/ml. Il TF-3 è stato seguito e ha mostrato un'inibizione del 20-30% a 1,0-2,5 μ g/ml, mentre la brazilina ha avuto un effetto minore e non significativo.

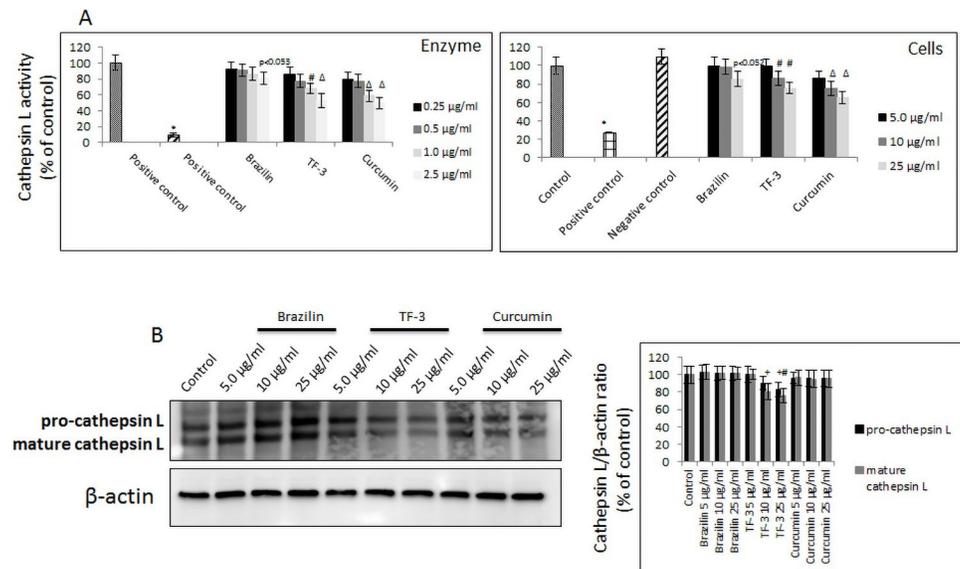


Fig. 6. Effetto di polifenoli selezionati sulla catepsina L. (A) Attività dell'enzima catepsina L purificato dopo il trattamento con i polifenoli indicati a diverse concentrazioni (pannello di sinistra). Attività della catepsina L cellulare dopo trattamento con i polifenoli indicati a diverse concentrazioni (pannello di destra). I dati sono presentati come % del controllo \pm SD; Δ $p < 0,01$, * $p < 0,001$, + $p < 0,054$. Controllo- 0,025% DMSO, controllo positivo- 0,1 μ M E-64. (B) Analisi Western blot dell'espressione della catepsina L in cellule A549 trattate con i polifenoli indicati a diverse concentrazioni per 24 ore. (pannello di sinistra) e quantificata come analisi di densitometria delle bande che indicano i cambiamenti nell'espressione della proteina (pannello di destra). I dati sono presentati come % del controllo \pm SD; controllo- 0,025% DMSO, TF-3 -teaflavina-3,3'-digallato.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489.g006>

effetto. Nei lisati cellulari abbiamo osservato una tendenza simile, sebbene l'inibizione della catepsina L richiedesse concentrazioni 10 volte superiori di curcumina, che ha mostrato un'inibizione del 20%-45% a 5,0-25 μ g/ml, e di TF-3, che ha rivelato un'inibizione del 20-25% a 10-25 μ g/ml. La brasilina ha causato una diminuzione non significativa del 15% a 25 μ g/ml (Fig. 6A). È interessante notare che né la brasilina né la curcumina hanno regolato l'espressione della catepsina L a livello proteico, a differenza del TF-3, che ha ridotto modestamente la sua espressione di circa il 20% a partire da una concentrazione di 10 μ g/ml (Fig. 6B).

Sapendo che la catepsina L è una proteasi sensibile al pH, abbiamo utilizzato la cloro ammoniaca 20 mM come controllo positivo per verificare il pH lisosomiale/endosomiale. I nostri risultati hanno rivelato che la brasilina e la curcumina possono aumentare il pH a circa 6,0-6,5 a 5,0-25 μ g/ml, mentre il TF-3 eleva il pH a circa 5,5-6,0 a 5,0-25 μ g/ml, rispetto a un controllo che, quando misurato, mostrava circa pH = 5,0 (Fig. 7A). Questo schema è stato confermato nell'ulteriore esperimento, in cui è stata osservata una diminuzione della fluorescenza dopo il trattamento con questi polifenoli a 5,0-25 μ g/ml e l'arancio di acridina utilizzato come sensore di pH (Fig. 7B).

Discussione

Studi precedenti basati su modelli computazionali e screening virtuali suggeriscono che i polifenoli mediano la loro attività anti-SARS-CoV-2 attraverso diversi meccanismi [33]. Ad esempio, Wu *et al.* hanno dimostrato che la taflavina 3,3'-*di-O-gallato*, il 14-deossi-L'11,12-dideidroandrographolide, il betulonal e la gnidicina mostrano un'elevata affinità di legame con la RdRp polimerasi virale, mentre il licoflavonolo, la cosmosiina, la neoesperidina e il piceatannolo mirano al legame tra la RBD della proteina spike e l'hACE2, sebbene sia stato previsto che solo l'esperidina si leghi direttamente alla RBD della proteina spike del SARS-

CoV-2 [34].

Uno studio di Rehman *et al.* ha rivelato che il kaempferolo, la quercetina e la rutina sono in grado di legarsi alla SBP (Substrate Binding Pocket) del 3CLpro con un'elevata affinità (cioè 10^5 - 10^6 M)⁻¹

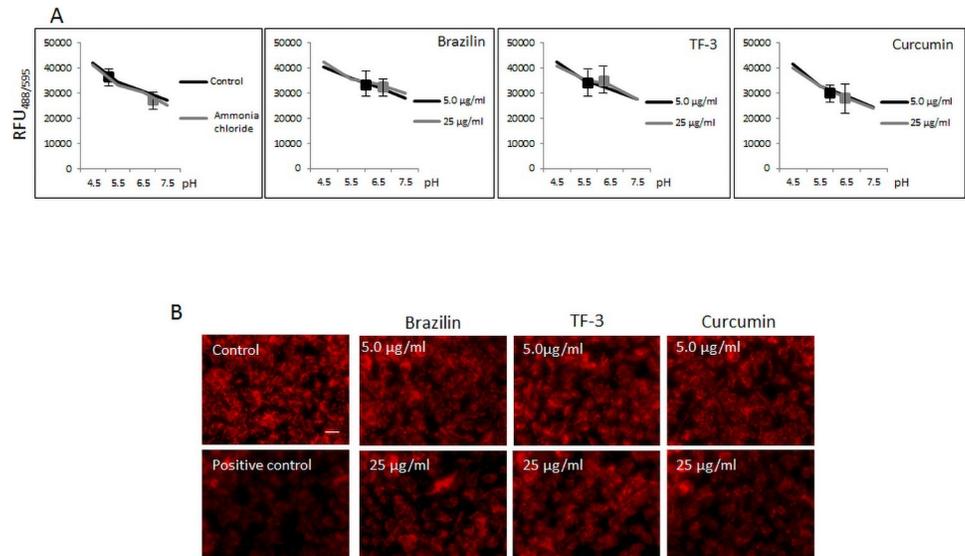


Figura 7. Effetto di polifenoli selezionati sul pH interno e sull'acidificazione dell'endosoma. (A) Misurazione del pH intracellulare/lisosomiale. Colorante pHrodo™ Green AM e ulteriore incubazione per 30 minuti a 37°C. Le cellule sono state poi lavate e la fluorescenza è stata misurata a Ex/Em = 535/595 nm. L'identificazione del pH intracellulare è stata effettuata utilizzando una curva standard preparata misurando la fluorescenza in presenza di tamponi standard con pH indicato, come descritto nella sezione Materiali e metodi. (B) Misura del pH endosomiale in cellule A549 trattate con i polifenoli indicati a diverse concentrazioni per 3 ore a 37°C. La barra di scala indica 50 µm. Le immagini sono rappresentative di tutti i campi osservati. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplo e ripetuti tre volte. I dati sono presentati come % del controllo ± SD. TF-3 -teaflavina-3,3'-digallato; controllo- 0,025% DMSO, controllo positivo- 20 mM cloruro di ammoniaca.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489.g007>

interagendo con i residui del sito attivo della 3CLpro, come His⁴¹ e Cys¹⁴⁵ [35]. Hanno anche affermato che l'affinità di legame della rutina era 1000 volte superiore a quella della cloroquina e 100 volte superiore a quella dell'idrossicloroquina. Sulla base dello studio di docking molecolare condotto da Chen e Du, la baicalina, la scutellarina, l'esperetina, la nicotianamina e la glicirrizina sono state identificate come potenziali inibitori dell'ACE2 che potrebbero essere utilizzati come agenti anti-SARS-CoV-2 per impedirne l'ingresso [36]. Composti come baicalina, (-)-epigallocatechina gallato, sugetriolo-3,9-diace- tato e platycodin D hanno rivelato un'elevata affinità di legame con la molecola PLpro (papain-like protease) che genera le proteine Nsp1, Nsp2 e Nsp3 coinvolte nel processo di replicazione virale [34].

Secondo Patel *et al.*, la curcumina e i suoi derivati hanno mostrato un'elevata affinità di legame con la RBD del SARS-CoV-2, con un ΔG (cioè l'energia di legame) compreso tra -10,01 e -5,33 kcal/mol. Sulla base di un'energia di legame che assomiglia a quella dei farmaci sintetici e dei parametri farmacocinetici, questi ricercatori hanno identificato la curcumina come candidato per l'inibizione della proteina spike della SARS-CoV-2 [37]. Inoltre, Jena *et al.* hanno riportato la catechina e la curcumina, che hanno una doppia affinità di legame, cioè si legano alla proteina spike virale e all'hACE2, sebbene l'affinità di legame della catechina sia maggiore (cioè, catechina: -7,9 kcal/mol e -7,8 kcal/mol; curcumina: -10,5 kcal/mol e -8,9 kcal/mol, rispettivamente) [38]. Mentre questi approcci teorici e di modellazione molecolare hanno permesso di identificare le potenziali applicazioni di varie molecole, le prove sperimentali della loro efficacia rimangono scarse.

In questa sede, abbiamo dimostrato *in vitro* che tra i 56 composti fenolici ed estratti vegetali testati, la brasilina, il TF-3 e la curcumina hanno mostrato il più alto legame con la proteina RBD-spike di SARS-CoV-2. Utilizzando cellule hA549 che esprimono la proteina spike, abbiamo confermato questo risultato. Utilizzando pseudo-virioni sviluppati con la proteina spike e diversi modelli di esposizione, abbiamo osservato nei nostri studi a breve

(cioè, tempo di esposizione di 1 ora o 3 ore) e a lungo termine (cioè, tempo di esposizione di 1 ora o 3 ore),

tempo di esposizione 48 ore), che tutti e tre i composti sono in grado di inibire l'attaccamento virale alla superficie cellulare, indipendentemente dal tempo di esposizione o dallo schema di incubazione. Quando i virioni avvolti di SARS-CoV-2 sono stati pre-incubati con questi composti per 1 ora, aggiunti simultaneamente o quando i composti sono stati aggiunti 1 ora dopo l'infezione al monostrato cellulare, la loro capacità di legarsi al recettore ACE2 e di trasdurre è diminuita in modo dose-dipendente.

È interessante notare che lo stesso effetto, sebbene a concentrazioni più elevate ma comunque non tossiche, è stato osservato quando pseudo-virioni di SARS-CoV-2 sono stati attaccati forzatamente alla superficie cellulare mediante inoculazione a rotazione. Inoltre, abbiamo notato che la brazilina, il TF-3 e la curcumina sono in grado di ridurre la fusione delle cellule che esprimono spike con il monostrato cellulare di hACE2 overexpressing. Ciò ha confermato i nostri risultati precedenti, indicando che tutti e tre i composti hanno proprietà inibitorie dirette soprattutto verso RBD-SARS-CoV-2, e suggerisce anche che potrebbero avere un effetto inibitorio sulle proteasi cellulari coinvolte nelle fasi di infezione della SARS-CoV-2. Il nostro studio non ha chiarito se questi polifenoli distruggano le particelle virali o se agiscono alterando le membrane degli pseudo-virioni sviluppati da spike di SARS-CoV-2 o le cellule A549. Tuttavia, è stato precedentemente dimostrato che la curcumina altera il legame e la fusione del virus dell'epatite C alla superficie cellulare influenzando la fluidità della membrana [39].

Nel frattempo, uno studio di Chen *et al.* ha documentato che la curcumina inibisce l'infettività solo dei virus avvolti, compreso il virus dell'influenza [40]. Poiché la curcumina è una molecola lipofila, può indurre cambiamenti morfologici in una membrana, che si riflettono in un'integrità disturbata e in un aumento della fluidità, che può alterare la conformazione delle proteine virali e dell'ospite [41].

È stato inoltre dimostrato che le teaflavine agiscono come inibitori dell'ingresso virale. Ad esempio, Chowdhury *et al.* hanno scoperto che le teaflavine, incluso il TF-3, inibiscono le prime fasi dell'ingresso cellulare del virus dell'epatite C e hanno suggerito che agiscono direttamente sulle particelle virali piuttosto che sulle cellule ospiti bloccandone la diffusione [42]. Cui *et al.* hanno riportato specificamente la teaflavina 3,3'-digallato come inibitore della serina proteasi NS2B-NS3 del virus Zika [43]. Inoltre, dallo studio *in silico* è emerso che le teaflavine hanno un'elevata affinità di legame (ΔG di -8,53 kcal/mol) con la RBD del SARS-CoV-2 attraverso la formazione di interazioni idrofobiche e legami a idrogeno a livello di ARG454, PHE456, ASN460, CYS480, GLN493, ASN501 e VAL503 del virus Zika. RBD-SARS-CoV-2, in prossimità dell'area di contatto ACE2-proteina spike [44]. Inoltre, Maiti e Banerjee hanno riportato che il gallato di teaflavina impedisce alla proteina spike RBD di legarsi al recettore hACE2 [45].

Sulla base dei nostri risultati, che confermano gli altri dati pubblicati, non possiamo escludere che i polifenoli testati nel nostro studio possano anche indurre, direttamente o indirettamente, interazioni allosteriche che influenzano altre molecole e processi coinvolti nell'infettività del SARS-CoV-2. Pertanto, i nostri ulteriori esperimenti si sono concentrati su molecole che facilitano il legame e l'ingresso del SARS-CoV-2, come ACE2, TMPRSS2 e catepsina L [12, 21, 23]. Gli esperimenti in cui l'attenzione è stata rivolta principalmente all'ACE2 hanno rivelato che il TF-3 e, in misura maggiore, la curcumina (ma non la brazilina) inibiscono l'attività dell'ACE2 a concentrazioni non tossiche sia in saggi liberi da cellule sia in saggi basati su cellule. TF-3 e curcumina hanno dimostrato di legarsi moderatamente al recettore hACE2 a concentrazioni notevolmente basse. È interessante notare che nessuno di questi polifenoli ha regolato l'espressione di hACE2 a livello proteico nelle cellule A549. Questa parte del nostro studio supporta le previsioni computazionali precedentemente pubblicate da Patel *et al.* e Jena *et al.* [37, 38]. Inoltre, Zhang *et al.*, attraverso uno screening di docking, hanno scoperto che TF-3 può legarsi direttamente al recettore ACE2 [46].

Per quanto riguarda il TMPRSS2, i nostri risultati sperimentali hanno mostrato che la

brasilina, il Tf-3 e il curcumin possono diminuire l'attività del TMPRSS2 in saggi liberi da cellule e basati su cellule, ma resta da stabilire con precisione come inibiscano la sua attività enzimatica, che si riflette in un'interferenza con il legame del virus alla superficie cellulare. È interessante notare che, come nel caso di hACE2, il livello di espressione proteica di TMPRSS2 non è stato influenzato. I nostri risultati hanno inoltre dimostrato che il Tf-3 e, in modo ancora più marcato, la curcumina inibiscono l'attività della catepsina L in saggi liberi da cellule e su base cellulare. Inoltre, tutti i farmaci

i polifenoli selezionati, anche se in misura diversa, hanno aumentato il pH lisosomiale/endosomiale da circa pH = 5,0, in accordo con quanto riportato in precedenza [47], a circa pH = 6,0-6,5. Questo potrebbe avere un effetto sull'attività della catepsina L. Tuttavia, per quanto riguarda TF-3 e soprattutto il curcuma-mento, in modo diretto o ravvicinato, potrebbe verificarsi un legame. Questo potrebbe avere un effetto sull'attività della catepsina L. Tuttavia, per quanto riguarda TF-3 e soprattutto la curcumina, il legame potrebbe avvenire in modo diretto o ravvicinato, dal momento che, in seguito al trattamento con TF-3 e curcumina, l'inibizione dell'attività della catepsina L è risultata statisticamente significativa, anche se solo lievemente ridotta in seguito al trattamento con brasilina. Il meccanismo preciso di questa inibizione, che si riflette nell'interferenza con l'uscita endosomiale virale, potrebbe essere ulteriormente chiarito utilizzando uno studio computazionale.

Ravish *et al.* hanno riconosciuto la curcumina come inibitore della catepsina B e H, trovando una correlazione con i risultati ottenuti dall'esperimento di docking computazionale [48]. A differenza delle molecole ACE2 e TMPRSS2, abbiamo osservato che il TF-3, ma non la brasilina o la curcumina, ha ridotto modestamente l'espressione della catepsina L a livello proteico. Zhang *et al.* hanno riportato che la curcumina aumenta l'espressione della catepsina K e L in topi e fibroblasti umani trattati con bleomicina [49], mentre uno studio di Yoo *et al.* ha dimostrato che l'espressione della catepsina L, elevata dal palmitato nel tessuto adiposo, può essere inibita dalla curcumina [50]. Ciò suggerisce che si tratta di un processo specifico di tessuto e cellula.

Complessivamente, i nostri risultati dimostrano che la brasilina, il TF-3 e la curcumina sono in grado di influenzare i meccanismi critici coinvolti nell'ingresso e nell'internalizzazione cellulare del SARS-CoV-2. Questo studio amplia inoltre le nostre conoscenze sul numero di virus sensibili alla curcumina e al TF-3 e identifica un nuovo polifenolo, la brasilina, con proprietà anti-SARS-CoV-2, evidenziando il meccanismo attraverso il quale questi polifenoli possono agire per inibire l'infettività della SARS-CoV-2. Resta da indagare se altre molecole cellulari e virali che contribuiscono all'infezione da SARS-CoV-2 possano essere influenzate da questi polifenoli. L'applicazione di questa classe di composti potrebbe svelare meccanismi precedentemente non identificati ma importanti per espandere la nostra comprensione della biologia della SARS-CoV-2. Particolarmente interessanti sarebbero i dettagli sulla loro efficacia nella fisiopatologia della SARS-CoV-2 durante le fasi successive del processo di infezione. Ci si chiede inoltre se questi polifenoli possano essere dannosi o benefici per le risposte dell'ospite in seguito all'infezione da SARS-CoV-2 e se il loro potenziale antivirale possa supportare o integrare l'attuale trattamento farmacologico. Inoltre, poiché in questo studio sono stati utilizzati lo pseudo-virus SARS-CoV-2 e cellule A549 che esprimono naturalmente bassi livelli di ACE2, è giustificata un'ulteriore validazione utilizzando cellule epiteliali alveolari primarie di tipo II e il virus SARS-CoV-2.

Informazioni di supporto

File S1. Immagini grezze del Western blot.
(PPTX)

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Rose Schweizer per l'eccezionale supporto linguistico.

Contributi degli autori

Concettualizzazione: Anna Goc.

Curatela dei dati: Matthias Rath, Aleksandra Niedzwiecki.

Analisi formale: Anna Goc, Waldemar Sumera.

Acquisizione di fondi: Matthias Rath, Aleksandra Niedzwiecki.

Investigazione: Anna Goc, Waldemar Sumera.

Metodologia: Anna Goc, Waldemar Sumera.

Amministrazione del progetto: Anna Goc, Aleksandra Niedzwiecki.

Risorse: Matthias Rath, Aleksandra Niedzwiecki.

Supervisione: Anna Goc, Aleksandra Niedzwiecki.

Convalida: Anna Goc, Waldemar Sumera, Matthias Rath.

Visualizzazione: Anna Goc, Waldemar Sumera, Aleksandra Niedzwiecki.

Scrittura - bozza originale: Anna Goc, Waldemar Sumera, Matthias Rath, Aleksandra Niedzwiecki.

Scrittura - revisione ed editing: Anna Goc, Waldemar Sumera, Aleksandra Niedzwiecki.

Riferimenti

1. Organizzazione Mondiale della Sanità. Malattia da coronavirus (COVID-19). 2020. [citato il 2021 gennaio 28]. <https://covid19.who.int>.
2. Comitato internazionale sulla tassonomia dei virus. Sindrome respiratoria acuta grave correlata a coronavi- rus. 2020. [citato il 2021 gennaio 28]. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>.
3. Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evoluzione del nuovo coronavirus dell'epidemia in corso Wuhan e modellazione della sua proteina spike per il rischio di trasmissione umana. *Sci China Life Sci.* 2020; 63: 457-460. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5> PMID: 32009228
4. Masters PS, Perlman S. Virologia dei campi. In: Knipe DM, Howley PM, editori. Filadelfia, PA: Lippincott William and Wilkins; 2013. Pp. 825-858.
5. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. La specie di coronavirus correlata alla sindrome respiratoria acuta grave: classificazione del 2019-nCoV e denominazione del SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020; 5: 536-544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z> PMID: 32123347
6. Chen Y, Liu Q, Guo D. I coronavirus emergenti: struttura del genoma, replicazione e patogenesi. *J Med Virol.* 2020; 92: 2249. <https://doi.org/10.1002/jmv.26234> PMID: 32881013
7. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, et al. Isolamento e caratterizzazione di virus correlati al coronavirus della SARS da animali nella Cina meridionale. *Science.* 2003; 302: 276-278. <https://doi.org/10.1126/science.1087139> PMID: 12958366
8. Jaimes JA, Andre' NM, Chappie JS, Jean K, Millet JK, Whittaker GR. L'analisi filogenetica e la modellazione strutturale della proteina spike del SARS-CoV-2 rivelano un anello di attivazione evolutivamente distinto e sensibile alla proteolisi. *J Mol Biol.* 2020; 432: 3309-3325. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.009> PMID: 32320687
9. Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jing S. La proteina spike del SARS-CoV: un bersaglio per lo sviluppo di vaccini e terapie. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7: 226-236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090> PMID: 19198616
10. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. Un focolaio di polmonite associato a un nuovo coronavirus di probabile origine pipistrello. *Nature.* 2020; 579: 270-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> PMID: 32015507
11. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. L'ingresso nella cellula del SARS-CoV-2 dipende da ACE2 e TMPRSS2 ed è bloccato da un inibitore della proteasi clinicamente testato. *Cell.* 2020; 181: 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052> PMID: 32142651
12. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Riconoscimento dei recettori da parte del nuovo coronavirus di Wuhan: un'analisi basata su studi strutturali decennali della SARS. *J Virol* 2020; 94: e00127-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20> PMID: 31996437
13. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Caratterizzazione della glicoproteina spike del SARS-CoV-2 all'ingresso del virus e della sua reattività immunitaria incrociata con il SARS-CoV. *Nat Commun.* 2020; 11: 1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9> PMID: 32221306
14. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Attivazione della proteina spike del coronavirus della SARS attraverso un clivaggio proteolitico sequenziale in due siti distinti. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2009; 106: 5871-5876. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809524106> PMID: 19321428
15. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. La glicoproteina spike del nuovo coronavirus 2019-nCoV contiene un sito di clivaggio furin-like assente nei CoV della stessa clade. *Antiviral Res.* 2020; 176: 104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742> PMID: 32142651

16. Xia S, Lan O, Su S, Wang X, Xu W, Liu Z, et al. Il ruolo del sito di clivaggio della furina nella fusione di membrana mediata dalla SARS-CoV-2 spike protein in presenza o assenza di tripsina. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5: 92. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0184-0> PMID: 32532959
17. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. La proteina spike del coronavirus è una proteina di fusione del virus di classe I : caratterizzazione strutturale e funzionale del complesso del nucleo di fusione. *J Virol* 2003; 77: 8801-8811. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003> PMID: 12885899
18. Liu T, Luo S, Libby P, Shi GP. Inibitori selettivi della catepsina L: Un trattamento potenzialmente promettente per i pazienti COVID-19. *Pharmacol Ther.* 2011; 213: 107587.
19. Glowacka I, Bertram S, Muller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, et al. L'evidenza che TMPRSS2 agisce sulla proteina spike del coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave per la fusione della membrana e riduce il controllo virale da parte della risposta immunitaria umorale. *J Virol.* 2011; 85: 4122-4134. <https://doi.org/10.1128/JVI.02232-10> PMID: 21325420
20. Wolters PJ, Chapman HA. Importanza delle proteasi lisosomiali cisteiniche nelle malattie polmonari. *Respir Res.* 2000; 1: 170-177. <https://doi.org/10.1186/rr29> PMID: 11667982
21. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P, Gli inibitori della catepsina L prevengono l'ingresso del coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2005; 102: 11876-11881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505577102> PMID: 16081529
22. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, Levine RL, et al. Le catepsine B, L e S scindono e inattivano l'inibitore della leucoproteasi secretoria. *J Biol Chem.* 2001; 276: 33345-33352. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103220200> PMID: 11435427
23. Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N. TMPRSS2 contribuisce alla diffusione del virus e all'immunopatologia nelle vie aeree di modelli murini dopo l'infezione da coronavirus. *J Virol.* 2019; 9: 01815-01818. <https://doi.org/10.1128/JVI.01815-18> PMID: 30626688
24. Perrotta F, Matera MG, Cazzola M, Bianco A. Grave infezione respiratoria da SARS-CoV2: Il recettore ACE2 è importante? *Respir Med.* 2020; 168:105996. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105996> PMID: 32364961
25. Mollica V, Rizzo A, Massari F. Il ruolo centrale di TMPRSS2 nella malattia da coronavirus 2019 e nel cancro alla prostata. *Future Oncol.* 2020; 16: 2029-2033. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-0571> PMID: 32658591
26. Bertram S, Dijkman R, Hajan M, Heurich A, Gierer S, Glowacka I, et al. TMPRSS2 attiva il coronavirus umano 229E per l'ingresso nelle cellule ospiti indipendente dalla catepsina ed è espresso nelle cellule bersaglio virali nell'epitelio respiratorio. *J Virol.* 2013; 87: 6150-6160. <https://doi.org/10.1128/JVI.03372-12> PMID: 23536651
27. Bertram S, Glowacka I, Muller MA, Lavender H, Gnirss K, Nehlmeier I, et al. Scissione e attivazione della proteina spike della sindrome respiratoria acuta grave del coronavirus da parte della proteasi simile alla tripsina delle vie aeree umane. *J Virol.* 2011; 85: 13363-13372. <https://doi.org/10.1128/JVI.05300-11> PMID: 21994442
28. Patil UK, Saraogi R. Prodotti naturali come potenziali potenziatori della permeazione dei farmaci nel sistema di somministrazione transdermica. *Arch Dermatol Res.* 2014; 306: 419-426. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1445-y> PMID: 24481830
29. Upadhyay S, Dixit M. Ruolo dei polifenoli e di altre sostanze fitochimiche sulla segnalazione molecolare. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 504253. <https://doi.org/10.1155/2015/504253> PMID: 26180591
30. Pandey KB, Rizvi SI. I polifenoli vegetali come antiossidanti alimentari nella salute e nella malattia umana. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2: 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498> PMID: 20716914
31. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. Il ruolo dei polifenoli nella salute umana e nei sistemi alimentari: A mini-review. *Front Nutr.* 2018; 5:87. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087> PMID: 30298133
32. Paraiso IL, Revel JS, Stevens JF. Potenziale uso dei polifenoli nella lotta contro il COVID-19. *Curr Opin Food Sci.* 2020; 32: 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.08.004> PMID: 32923374
33. Verma S, Twilley D, Esmear T, Oosthuizen CB, Reid AM, Nel M, et al. Prodotti naturali anti-SARS-CoV con il potenziale di inibire il SARS-CoV-2 (COVID-19). *Front Pharmacol.* 2020; 11: 561334. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.561334> PMID: 33101023
34. Wu C, Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, et al. Analisi dei bersagli terapeutici per il SARS-CoV-2 e scoperta di potenziali farmaci con metodi computazionali. *Acta Pharm Sin B* 2020, 10: 766-788. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008> PMID: 32292689
35. Rehman T, Al-Ajmi MF, Hussain A. Composti naturali come inibitori della proteasi principale della

SARS-CoV-2 (3CLpro): Un approccio di docking molecolare e simulazione per combattere il COVID-19. *Curr Pharm Des.* 2020; [Di prossima pubblicazione].

<https://doi.org/10.2174/1381612826999201116195851> PMID: 33200697

36. Chen H, Du Q. Potenziali composti naturali per prevenire l'infezione da 2019-nCoV. 202001.0358.v1 [Pre- print]. 2020 [citato il 28 gennaio 2021]. <https://www.preprints.org/manuscript/202001.0358/v1>.

37. Patel A, Rajendran M, Shah A, Patel H, Pakala SB, Karyala P. Screening virtuale della curcumina e dei suoi analoghi contro la glicoproteina di superficie di SARS-CoV-2 e SARS-CoV. *J Biomol Struct Dyn*. 2021; 5: 1-9. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1868338> PMID: 33397223
38. Jena AB, Kanungo N, Nayak V, Chainy G, Dandapat J. La catechina e la curcumina interagiscono con la proteina S del SARS-CoV2 e con l'ACE2 della membrana cellulare umana: intuizioni da uno studio computazionale. *Sci Rep*. 2021; 11: 2043. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81462-7> PMID: 33479401
39. Anggakusuma, Colpitts CC, Schang LM, Rachmawati H, Frentzen A, Pfaender S, et al. La curcumina inibisce l'ingresso di tutti i genotipi del virus dell'epatite C nelle cellule epatiche umane. *Gut*. 2014; 63: 1137-1149. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304299> PMID: 23903236
40. Chen TY, Chen DY, Wen HW, Ou JL, Chiou SS, Chen JM, et al. Inibizione dell'infettività dei virus avvolti da parte della curcumina. *PLoS One*. 2013; 8: e62482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062482> PMID: 23658730
41. Jaruga E, Bielak-Zmijewska A, Sikora E, Skierski J, Radziszewska E, Piwocka K, et al. Meccanismo indipendente dal glutatone di inibizione dell'apoptosi da parte della curcumina nei timociti di ratto. *Biochem Pharmacol*. 1998; 56: 961-965. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00144-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00144-0) PMID: 9776306
42. Chowdhury P, Sahuc ME, Rouille Y, Rivière C, Bonneau N, Vandeputte A, et al. I polifenoli del tè nero inibiscono l'ingresso del virus dell'epatite C in coltura cellulare. *PLoS One*. 2018; 13: e0198226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198226> PMID: 30485282
43. Cui X, Zhou R, Huang C, Zhang R, Wang J, Zhang Y, et al. Identificazione della teaflavina-3,3'-digallato come nuovo inibitore della proteasi del virus Zika. *Front Pharmacol*. 2020; 11: 514313. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.514313> PMID: 33192499
44. Lung J, Lin YS, Yang YH, Chou YL, Chang GH, Tsai MS, et al. Il potenziale inibitore di ingresso della SARS-CoV-2. 2020.03.26.009803v1. [Preprint]. 2020. [citato il 2021 gennaio 28]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.26.009803v1>.
45. Maiti S, Banerjee A, Interazione epigallocatechina-gallato e teaflavina-gallato nel canale centrale della proteina SARS CoV-2 spike con riferimento all'interazione con l'idrossiclorochina. Studio bioinformatico e di docking molecolare. *Drug Dev Res*. 2020; <https://doi.org/10.1002/ddr.21730> PMID: 32770567
46. Zhang JJ, Shen X, Ming Y, Wang YY, Cheng YX. Scoperta di agenti anti-SARS-CoV-2 da aromi disponibili in commercio tramite screening di docking. 202002.0254v2. [Preprint]. 2020. [citato il 2021 gennaio 28]. <https://osf.io/vjch2>.
47. Ohkuma S, Poole B. Misurazione con sonda a fluorescenza del pH intralisosomiale in cellule vive e perturbazione del pH da parte di vari agenti. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1978; 75: 3327-3331. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.7.3327> PMID: 28524
48. Ravish I, Raghav N. La curcumina come inibitore della catepsina B, della catepsina H, della fosfatasi acida e della fosfatasi alcalina dei mammiferi: una correlazione con le attività farmacologiche. *Med Chem Res*. 2014; 23: 2847-2855.
49. Zhang D, Huang C, Yang C, Liu RJ, Wang J, Niu J, et al. Gli effetti antifibrotici della curcumina sono associati alla sovraespressione delle catepsine K e L in topi e fibroblasti umani trattati con bleomicina. *Respir Res*. 2011; 12: 154. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-154> PMID: 22126332
50. Yoo J, Lee Y, Kim J, Kang S, Nam J, Park J, et al. La curcumina inibisce l'upregulation della catepsina L da parte del palmitato nel grasso. *Endocrine Abstracts*. 2012; 29: P1226.
51. Goc A, Matthias R, Niedzwiecki A. Gli acidi grassi ω -3 polinsaturi inibiscono il legame e l'ingresso cellulare del SARS-CoV-2 controllato dall'ACE2. *Sci. Rep*. 2021; 11:5207. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84850-1> PMID: 33664446
52. Pa'szti-Gere R, Czimmermann R, Ujhelyi G, Balla P, Maiwald A, Maiwald A, et al. Caratterizzazione *in vitro* dell'inibizione di TMPRSS2 in cellule IPEC-J2. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016; 31: 123-129. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1193732> PMID: 27277342
53. Gamberetti JH, Kales SC, Sanderson PE, Simeonov A, Shen M, Hall MD. Un saggio enzimatico TMPRSS2 per la valutazione dei candidati clinici e la scoperta di inibitori come potenziale trattamento di COVID-19. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2020; 3: 997-1007. <https://doi.org/10.1021/acspsci.0c00106> PMID: 33062952
54. Nelson EA, Dyall J, Hoenen T, Barnes AB, Zhou H, Janie Y, et al. L'inibitore della fosfatidilinositolo-3-fosfato 5-chinasi apilimod blocca l'ingresso e l'infezione filovirale. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: e0005540. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005540> PMID: 28403145