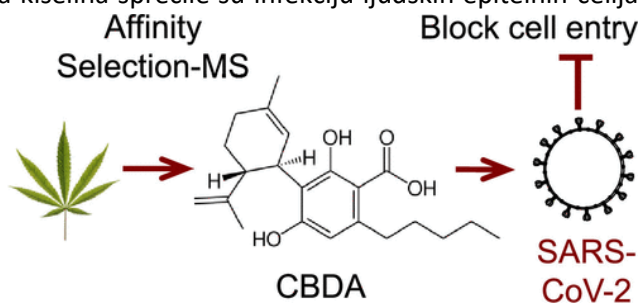


Kanabinoidi blokiraju ulazak virusa SARS-CoV-2 i njegovih novih varijanti u ćelije

Ričard B. van Brimen, Rut N. Muširi, Timoti A. Bejts, Džuls B. Vajnstin, Hans C. Lejer, Skotland Farli i Fikadu G. Tafes

ABSTRAKT: Kao dopuna vakcinama, terapijski agensi malih molekula su potrebni u lečenju i prevenciji infekcija izazvanih teškim akutnim respiratornim sindromom koronavirusa-2 (SARS-CoV-2) i njegovim varijantama koje izazivaju COVID-19. Afinitetna selekcija-masena spektrometrija je korišćena za otkrivanje botaničkih liganada koji se vezuju za šiljasti protein SARS-CoV-2. Utvrđeno je da su kanabinoidne kiseline iz konoplje (*Cannabis sativa*) alosterni, kao i ortosterni ligandi sa mikromolarnim afinitetom za šiljasti protein. U naknadnim ispitivanjima neutralizacije virusa, kanabigerolna kiselina i kanabidiolna kiselina sprečile su infekciju ljudskih epitelnih ćelija pseudovirusom koji eksprimira protein SARS-CoV-2 i sprečile ulazak živog SARS-CoV-2 u ćelije. Značajan podatak je da su kanabigerolna kiselina i kanabidiolna kiselina bile podjednako efikasne protiv alfa varijante SARS-CoV-2, B.1.1.7, i beta varijante B.1.351. Ovi kanabinoidi, oralno biodostupni i kroz istoriju bezbedno korišćeni kod ljudi, imaju potencijal da spreče i izleče infekcije SARS-CoV-2, izolovani ili u ekstraktima konoplje.



Izazvana teškim akutnim respiratornim sindromom koronavirus-2 (SARS-CoV-2), pandemija COVID-19 obuhvata najmanje 272 miliona slučajeva širom sveta, 5,3 miliona smrtnih slučajeva i preko 600 000 novih slučajeva dnevno od decembra 2021. godine.¹ Vakcine su razvijene, ali zbog njihove ograničene dostupnosti i stope mutacije virusa, infekcije SARS-CoV-2 će verovatno potrajati duži niz godina. Sa nastavkom pandemije, pojavilo se nekoliko varijanti SARS-CoV-2 koje kruže širom sveta, kao što su varijanta B.1.1.7 (alfa, prvi put otkrivena u Ujedinjenom Kraljevstvu), B.1.351 (beta, prvi put otkrivena u Južnoj Africi) i B.1.617.2 (delta, prvi put

otkrivena u Indiji).² Navodi se da ove varijante koje stvaraju zabrinutost imaju sposobnost da izbegnu humoralni imunitet proizveden prirodnim infekcijama ili primljenim vakcinama. Štaviše, te varijante su povezane sa povećanjem broja infekcija i hospitalizacija, što ukazuje na njihovu konkurentsku prednost u odnosu na prvobitni soj.³

SARS-CoV-2, član porodice Coronaviridae, je virus omotanog, nesegmentiranog, pozitivno smislenog RNK lanca sa karakterističnim šiljcima nalik kruni na spoljnoj površini.^{4,5} Sadrži RNK lance duge 29,9 kilobaza⁶ koji kodiraju četiri glavna

¹ <https://www.worldometers.info/coronavirus/>, pristupljeno 15. decembra 2021.

² Centri za kontrolu i prevenciju bolesti. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-emerging-variants.html>, pristupljeno 15. decembra 2021.

³ Walensky, R. P.; Walke, H. T.; Fauci, A. S. JAMA 2021, 325, 1037–1038.

⁴ Tahir ul Qamar, M.; Alqahtani, S. M.; Alamri, M. A.; Chen, L. L. J. Pharm. Anal. 2020, 10, 313–319.

⁵ Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; Cheng, Z.; Yu, T.; Xia, J.; Wei, Y.; Wu, W.; Xie, X.; Yin, W.; Li, H.; Liu, M.; Xiao, Y.; Gao, H.; Guo, L.; Xie, J.; Wang, G.; Jiang, R.; Gao, Z.; Jin, Q.; Wang, J.; Cao, B. Lancet 2020, 395, 497–506.

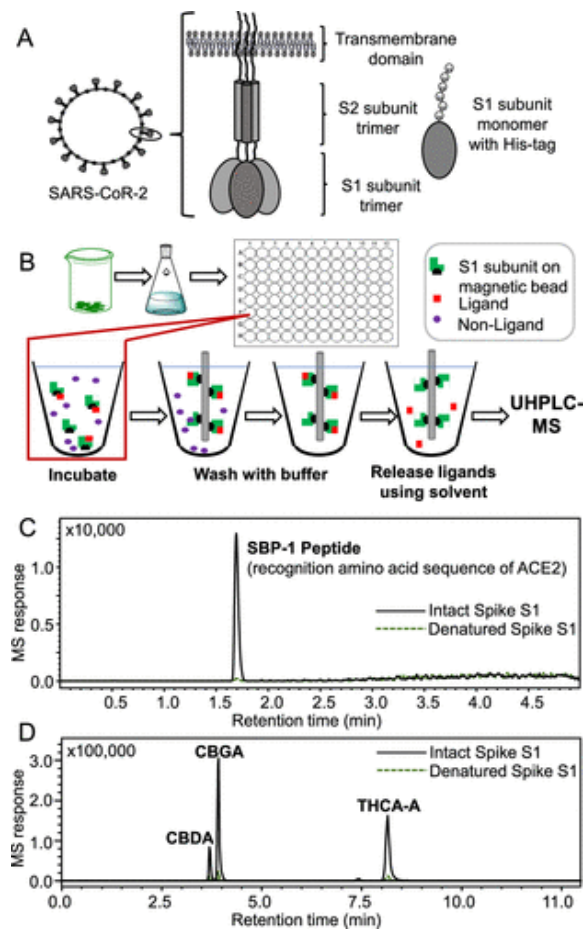
⁶ Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.-M.; Wang, W.; Song, Z.-G.; Hu, Y.; Tao, Z.-W.; Tian, J.-H.; Pei, Y.-Y.; Yuan, M.-L.; Zhang, Y.-L.; Dai, F.-H.; Liu, Y.; Wang, Q.-M.; Zheng, J.-J.; Xu, L.; Holmes, E. C.; Zhang, Y.-Z. Nature 2020, 579, 265–269.

strukturalna proteina, šiljak, omotač, membranu i nukleokapsid, 16 nestrukturalnih proteina i nekoliko pomoćnih proteina.⁷ Bilo koji momenat u okviru procesa infekcije virusom SARS-CoV-2 i ciklusa replikacije potencijalna je meta za antivirusnu intervenciju, uključujući ulazak virusa u ćeliju, replikaciju genoma, sazrevanje virusa i njegovo oslobađanje. Međutim, vezivanje virusnog šiljastog proteina SARS-CoV-2 za angiotenzin-konvertujući enzim-2 (ACE2), receptor na površini ljudske ćelije, ključan je korak u infekciji ljudskih ćelija. Stoga bi se inhibitori ulaska u ćeliju mogli koristiti za sprečavanje infekcije SARS-CoV-2, kao i za skraćivanje toka infekcije COVID-19, tako što bi sprečili čestice virusa da inficiraju ljudske ćelije.

Šiljasti protein, transmembranski protein sa molekulskom masom od ~150 kDa, formira homotrimere koji se pomalaju na površini SARS-CoV-2. Podjedinice trimera šiljastog proteina SARS-CoV-2 sastoje se od podjedinice S1 koja se vezuje za ćelije ACE2 domaćina da bi pokrenula infekciju, podjedinice S2 koja posreduje u fuziji virusa sa ćelijama domaćina, kao i transmembranskog domena (Slika 1A). Infekcija ćelija domaćina virusom SARS-CoV-2 počinje vezivanjem domena koji vezuje receptor (RBD) proteina S1,⁸ koji je identifikovan kao deo ostataka od 331 do 524,⁹ za receptor ćelije domaćina ACE2. ACE2, enzim na spoljašnjoj ćelijskoj membrani ćelija domaćina, eksprimira se u velikoj meri na ljudskim endotelnim ćelijama u plućima, arterijama, srcu, bubrezima i crevima.¹⁰ Proteaza TMPRSS2 na membrani ćelije domaćina aktivira šiljasti protein tako što ga cepa na mestima S1/S2 i S2,¹¹ što dovodi do konformacionih promena koje omogućavaju virusu da se stopi sa membranom

domaćina i uđe u citoplazmu. Podjedinica S1 je prvenstveno odgovorna za određivanje opsega domaćina i ćelijskog tropizma virusa.¹²

Slika 1



Slika 1. Otkriće prirodnih liganada za šiljasti protein SARS-CoV-2 pomoću afinitetne selekcije-masene spektrometrije (AS-MS). (A) Šiljasti protein SARS-CoV-2 sastoji se od trimera proteina koji sadrži podjedinicu S1, podjedinicu S2 i transmembranski domen. Podjedinica S1 se vezuje za humani ACE2 da bi omogućila ulazak u ćeliju.

⁷ Jiang, S.; Hillyer, C.; Du, L. Trends Immunol. 2020, 41, 355–359.

⁸ Rabi, F. A.; Al Zoubi, M. S.; Kasasbeh, G. A.; Salameh, D. M.; Al-Nasser, A. D. Pathogens 2020, 9, 231.

⁹ Tai, W.; He, L.; Zhang, X.; Pu, J.; Voronin, D.; Jiang, S.; Zhou, Y.; Du, L. Cell. Mol. Immunol. 2020, 17, 613–620.

¹⁰ Turner, A. J. In Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS); Unger, T.; Steckelings, U. M.; dos Santos, R. A. S., Eds.; Elsevier: New York, 2015; pp 185–189.

¹¹ Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T. S.; Herrler, G.; Wu, N.-H.; Nitsche, A.; Müller, M. A.; Drosten, C.; Pöhlmann, S. Cell. 2020, 181, 271–280.

¹² Guo, Y.-R.; Cao, Q.-D.; Hong, Z.-S.; Tan, Y.-Y.; Chen, S.-D.; Jin, H.-J.; Tan, K.-S.; Wang, D.-Y.; Yan, Y. Military Med. Res. 2020, 7, 11.

Rekombinantni S1 koji sadrži His oznaku imobilisan je na magnetnim mikrozrnima za afinitetnu selekciju liganada. (B) AS-MS je korišćena za izolaciju i identifikaciju prirodnih liganada na podjedinici S1 šiljastog proteina. Magnetna sonda je zadržala mikrozrnca sa podjedinicom S1 i vezanim ligandima, dok su nevezana jedinjenja isprana. Ligandi su oslobođeni pomoću organskog rastvarača i zatim analizirani korišćenjem UHPLC-MS. (C) Za vreme AS-MS, peptid SBP-1 se vezuje za imobilisani S1 (ekvivalentno 0,17 μ M) (pozitivna kontrola), ali ne i za imobilisani denaturisani S1 (negativna kontrola). (D) MagMASS je korišćen za afinitetnu selekciju i identifikaciju kanabinoidnih kiselina (vrednosti 0,10 μ M za svaku u ovom potvrdnom hromatogramu) kao liganda iz ekstrakata konoplje. Negativne kontrole koje koriste denaturisani S1 nisu pokazale značajno vezivanje kanabinoidnih kiselina.

Ligandi sa visokim afinitetom prema domenu koji vezuje receptor na proteinu S1 imaju potencijal da funkcionišu kao inhibitori ulaska i spreče infekciju ljudskih ćelija virusom SARS-CoV-2.¹³ Na primer, pokazalo se da mali peptidi dobijeni iz regiona heptadnog ponavljanja podjedinice S2 šiljka virusa SARS-CoV-1 inhibiraju infekciju SARS-CoV ometanjem sjedinjavanja sa ciljnim ćelijama.^{14, 15} Pristup korišćenja jedinjenja koja blokiraju interakciju virus-receptor pokazao se korisnim i kod drugih virusa kao što su HIV-1 i virus hepatitisa C.^{16, 17}

Prirodni proizvodi su najuspešniji izvor lekova i vodećih jedinjenja u istoriji farmakologije.^{18, 19} Iako farmaceutska industrija trenutno stavlja veći naglasak na kombinatornoj hemiji u otkrivanju vodećih jedinjenja,²⁰ priroda i dalje ostaje izvor jedinstvenih hemijskih strukturnih raznovrsnosti za otkrivanje novih lekova.²¹ Od 1981. godine, otprilike dve trećine novih lekova malih molekula su bili prirodni proizvodi, derivati prirodnih proizvoda, farmakofori ili imitacije prirodnih proizvoda.²² Kod manje od 10% svetske bioraznovrsnosti je izvršena procena potencijalnog biološkog dejstva, tako da još mnogo korisnih prirodnih vodećih jedinjenja čeka da bude otkriveno. Kao primer prirodnog proizvoda sa dejstvom protiv virusa SARS-CoV-2, nedavno je objavljeno da panduratin iz lekovite biljke *Boesenbergia rotunda* aktivno deluje protiv SARS-CoV-2, kako u fazi pre ulaska u ćeliju, tako i nakon infekcije.²³

Iako je frakcionisanje vođeno biološkim testom metoda u širokoj upotrebi za otkrivanje lekova iz prirodnih proizvoda, afinitetna selekcija-masena spektrometrija (AS-MS) predstavlja efikasniju alternativu.²⁴ AS-MS podrazumeva inkubaciju terapeutski važnog receptora kao što je šiljasti protein virusa SARS-CoV-2 sa mešavinom mogućih liganada kao što je botanički ekstrakt. Kompleksi ligand-receptor se odvajaju od nevezujućih molekula pomoću jedne od nekoliko

¹³ Du, L.; He, Y.; Zhou, Y.; Liu, S.; Zheng, B.-J.; Jiang, S. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, 7, 226–236.

¹⁴ Sainz, B., Jr; Mossel, E. C.; Gallaher, W. R.; Wimley, W. C.; Peters, C. J.; Wilson, R. B.; Garry, R. F. *Virus Res.* 2006, 120, 146–155.

¹⁵ Yuan, K.; Yi, L.; Chen, J.; Qu, X.; Qing, T.; Rao, X.; Jiang, P.; Hu, J.; Xiong, Z.; Nie, Y.; Shi, X.; Wang, W.; Ling, C.; Yin, X.; Fan, K.; Lai, L.; Ding, M.; Deng, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 319, 746–752.

¹⁶ De Clercq, E. *J. Clin. Virol.* 2001, 22, 73–89.

¹⁷ VanCompernelle, S. E.; Wiznycia, A. V.; Rush, J. R.; Dhanasekaran, M.; Baures, P. W.; Todd, S. C. *Virology* 2003, 314, 371–380.

¹⁸ Cragg, G. M.; Newman, D. J. *Pure Appl. Chem.* 2005, 77, 7–24.

¹⁹ Dias, D. A.; Urban, S.; Roessner, U. *Metabolites* 2012, 2, 303–336.

²⁰ von Nussbaum, F.; Brands, M.; Hinzen, B.; Weigand, S.; Habich, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 5072–5129.

²¹ Mishra, B. B.; Tiwari, V. K. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 4769–4807.

²² Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 629–661.

²³ Kanjanasirirat, P.; Suksatu, A.; Manopwisedjaroen, S.; Munyoo, B.; Tuchinda, P.; Jearawuttanakul, K.; Seemakhan, S.; Charoensutthivarakul, S.; Wongtrakongate, P.; Rangkasenee, N.; Pitiporn, S.; Waranuch, N.; Chabang, N.; Khemawoot, P.; Sa-Ngiamsuntorn, K.; Pewkliang, Y.; Thongsri, P.; Chutipongtanate, S.; Hongeng, S.; Borwornpinyo, S.; Thitithanyanont, A. *Sci. Rep.* 2020, 10, 19963.

²⁴ Muchiri, R. N.; van Breemen, R. B. *J. Mass Spectrom.* 2021, 56, e4647.

metoda kao što su ultrafiltracija,²⁵ razdvajanje na osnovu veličine,²⁶ ili magnetna mikroznca,²⁷, a zatim se tečna hromatografija pod visokim pritiskom-masena spektrometrija (UHPLC-MS) koristi za karakterizaciju afinitetno ekstrahovanih liganda. U ovom istraživanju koristili smo AS-MS pristup skrininga afinitetne selekcije magnetnim mikroznecima (MagMASS).^{28, 29}

Konoplja (*Cannabis sativa* L., Cannabaceae) se koristi za vlakna, hranu ljudi i stočnu hranu, a razni ekstrakti i jedinjenja konoplje postali su popularni dodaci kozmetici, losionima za telo, dijetetskim suplementima i hrani. Konoplja proizvodi preko 170 sekundarnih metabolita, uključujući neka jedinstvena jedinjenja,^{30, 31} kao što su flavonoidi, diterpeni, triterpeni, lignani i kanabinoidi. Oralno biodostupnih³² kanabidoida postoji najmanje 70, uključujući kanabidiol, Δ^9 -tetrahidrokanabinole, Δ^8 -tetrahidrokanabinole, kanabigerole, kanabinole, kanabihromene i kanabitriole, a u SAD-u je 2018. godine Uprava za hranu i lekove odobrila izolat kanabidiola (Epidioleks) za lečenje pojedinih vrsta epileptičkih napada.³³

Korišćenjem pristupa MagMASS za ispitivanje ekstrakta konoplje na ligande za šiljasti protein virusa SARS-CoV-2, identifikovano je nekoliko kanabinoidnih liganada i rangirani su prema afinitetu za šiljasti protein. Potvrđeno je da dva kanabinoida sa najvećim afinitetima za šiljasti protein, kanabidiolna kiselina (CBDA) i kanabigerolna

kiselina (CBGA), blokiraju infekciju ljudskih epitelnih ćelija pseudovirusom koji eksprimira šiljasti protein. Što je još važnije, i CBDA i CBGA blokiraju infekciju prvobitnog živog virusa SARS-CoV-2, kao i varijanti koje stvaraju zabrinutost, uključujući B.1.1.7 i B.1.351.

Rezultati i diskusija

Otkriće liganda konoplje koji deluju protiv virusa SARS-CoV-2

Radi otkrivanja prirodnih liganda za šiljasti protein virusa SARS-CoV-2, razvijen je test MagMASS³⁴ korišćenjem podjedinice S1 šiljastog proteina, imobilisane na magnetnim mikroznecima (slika 1). U cilju potvrđivanja da je imobilisana podjedinica S1 zadržala selektivnost za protein površine ljudske ćelije ACE2, magnetna mikroznca koja sadrže podjedinicu S1 su inkubirana sa SBP-1, peptidom koji sadrži aminokiselinsku sekvencu humanog ACE2 za koju se vezuje mesto za prepoznavanje šiljastog proteina virusa SARS-CoV-2 (ostaci aminokiselina 331 do 524). Nakon završenog procesa obrade pomoću MagMASS-a (slika 1B), SBP-1 je pokazao selektivno vezivanje za imobilisanu podjedinicu S1 šiljastog proteina (pozitivna kontrola), dok se SBP-1 nije vezao za denaturisanu podjedinicu S1 koja je imobilisana na identičan način (slika 1C).

²⁵ van Breemen, R. B.; Huang, C. R.; Nikolic, D.; Woodbury, C. P.; Zhao, Y. Z.; Venton, D. L. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2159–2164.

²⁶ Kaur, S.; McGuire, L.; Tang, D.; Dollinger, G.; Huebner, V. J. *Protein Chem.* 1997, 16, 505–511.

²⁷ Choi, Y.; van Breemen, R. B. *Combin. Chem. High Throughput Screen.* 2008, 11, 1–6.

²⁸ Rush, M. D.; Walker, E. M.; Prehna, G.; Burton, T.; van Breemen, R. B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017, 28, 479–448.

²⁹ van Breemen, R. B. *Curr. Trends Mass Spectrom.* 2020, 18, 18–25.

³⁰ Citti, C.; Linciano, P.; Panseri, S.; Vezzalini, F.; Forni, F.; Vandelli, M. A.; Cannazza, G. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 120.

³¹ Hazekamp, A.; Fishedick, J. T.; Díez, M. L.; Lubbe, A.; Ruhaak, R. L. In *Comprehensive Natural Products II*; Mander, L.; Lui, H.-W.; Eds.; Elsevier: Oxford, UK, 2010; pp 1033–1084.

³² Pellesi, L.; Licata, M.; Verri, P.; Vandelli, D.; Palazzoli, F.; Marchesi, F.; Cainazzo, M. M.; Pini, L. A.; Guerzoni, S. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2018, 74, 1427–1436.

³³ <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fdaapproves-first-drug-comprised-active-ingredient-derived-marijuanatreat-rare-severe-forms>.

³⁴ Choi, Y.; van Breemen, R. B. *Combin. Chem. High Throughput Screen.* 2008, 11, 1–6.

Tokom skrininga botaničkih ekstrakata pomoću MagMASS-a, ekstrakti konoplje (*C. sativa* L.) dali su nekoliko pogodaka (Slika 1D). Na osnovu dereplikacije pogodaka i dodatnih testova korišćenjem kanabinoidnih standarda, ligandi šiljastog proteina sa najvećim afinitetima identifikovani su kao CBGA, tetrahidrokanabinolna

kiselina (THCA-A) i CBDA (slike 2-4, dodatne informacije). Kanabinoidi Δ^9 -tetrahidrokanabinol, Δ^8 -tetrahidrokanabinol, kanabihromen, kanabigerol, kanabinol i kanabidiol su pokazali samo slabo ili nikakvo vezivanje na osnovu MagMASS testova kompetitivnog vezivanja korišćenjem ekvimolarnih smeša (Tabela 1).

Tabela 1. MagMASS rangiranje kanabinoida konoplje prema vezivanju za šiljasti protein virusa SARS-CoV-2ⁱ

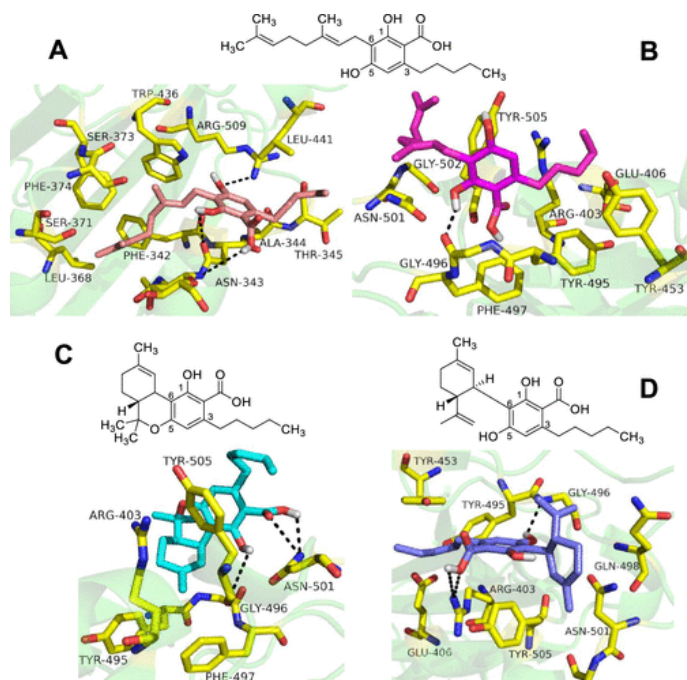
kanabinoid ⁱⁱ	UHPLC vreme zadržavanja (min)	obogaćivanje pri izmeni površine pika ⁱⁱⁱ
kanabigerolna kiselina (CBGA)	3.8	20.5 ± 0.51
tetrahidrokanabinolna kiselina (THCA-A)	8.2	16.7 ± 2.2
kanabidiolna kiselina (CBDA)	3.7	12.2 ± 0.52
kanabinolna kiselina (CBNA)	6.5	5.6 ± 1.4
kanabigerol (CBG)	4.1	3.4 ± 0.82
kanabinol (CBN)	5.7	3.4 ± 0.78
Δ^8 -tetrahidrokanabinol (Δ^8 -THC)	6.8	3.1 ± 0.81
Δ^9 -tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC)	6.8	3.0 ± 0.77
kanabidiol (CBD)	4.2	2.9 ± 0.72
kanabihromen (CBC)	8.1	2.9 ± 0.75
kanabidivarin (CBDV)	3.0	1.6 ± 0.17

^aSrednja vrednost ± SE (n = 3).

^bEkvimolarna smeša kanabinoida (0,10 µM) inkubirana sa podjedinicom S1 šiljastog proteina (0,17 µM).

^cObogaćivanje pri izmeni površine pika = (UHPLC-MS/MS eksperiment sa površinom pika)/(UHPLC-MS/MS negativna kontrola površine pika korišćenjem denaturisane podjedinice S1 šiljastog proteina).

Slika 2.



Slika 2. Računarsko modeliranje vezivanja kanabinoidnih kiselina za C-terminalni domen S1 šiljastog proteina SARS-CoV-2 pomoću programa AutoDock Vina. Aktivni ostaci podjedinice S1 prikazani su žutom bojom. (A) Predviđa se da će se CBGA (prikazana ružičastom) vezati za analosterično mesto (slobodna energija vezivanja od -6,6 kcal/mol). (B) Iako je to manje poželjno (-6,2 kcal/mol), CBGA (magenta) se takođe može vezati za ortosterično mesto na C-terminalnom domenu S1. (C) Predviđa se da će se THCA-A (tirkizno-plava) i (D) CBDA (tirkizno-zelena) vezati na ortosteričnom mestu sa slobodnim energijama vezivanja od -6,5 kcal/mol i -6,3 kcal/mol.

Konstante disocijacije i doking liganda

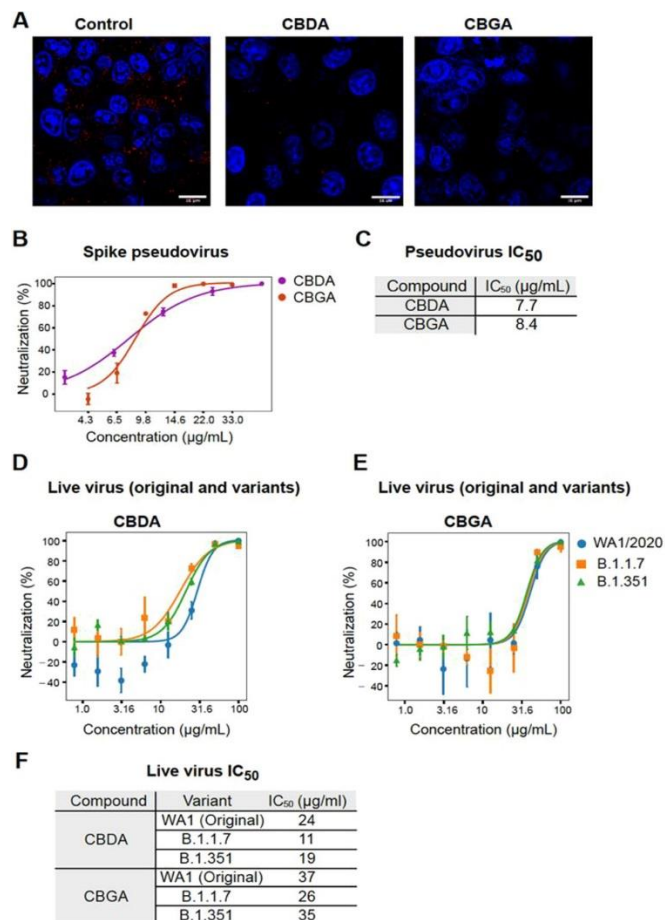
Vrednosti K_d za vezivanje CBGA i CBDA za podjedinicu S1 šiljastog proteina SARS-CoV-2 određene su korišćenjem ravnotežne dijalize. Optimalno vreme za potpuno uravnotežavanje CBGA je iznosilo 5 h, dok je u slučaju CBDA to bilo 4 h. Vrednosti K_d za CBGA i CBDA iznosile su $19,8 \pm 2,7$ i $5,6 \pm 2,2 \mu\text{M}$. Pošto je THCA-A kontrolisana supstanca, nisu bile dostupne dovoljne količine za određivanje njenog afiniteta vezivanja i antivirousno dejstvo.

Interakcije vezivanja CBDA, THCA-A i CBGA sa C-terminalnim domenom S1 šiljastog proteina SARS-CoV-2 modelovane su korišćenjem programa AutoDock Vina (Slika 2). U skladu sa MagMASS rangiranjem liganada (Tabela 1), slobodna energija vezivanja je bila najveća za CBGA (-6,6 kcal/mol), zatim za THCA-A (-6,5 kcal/mol) i CBDA (-6,3 kcal/mol). Optimalni način vezivanja za CBGA bio je na alosteričnom mestu sa džepom za vezivanje kojim dominiraju hidrofobni ostaci unutar van der Valsove udaljenosti od 4 Å, naime, F374, L368, F342, W436, A344 i L441 (Slika 2A). Hidrofobna izoprenil grupa CBGA je interagovala sa hidrofobnim ostacima L368, F342, F374, i W436, dok je pentil grupa interagovala sa A344, L441 i amidom T345. Grupa karboksilne kiseline formirala je vodoničnu vezu sa bočnim lancem amida D343, dok su hidroksi grupe na pozicijama 1 i 5 formirale vodonične veze sa bočnim lancima D343 i R509. Iako je to manje poželjno, takođe je predviđeno da će se CBGA ortosterički vezati za C-terminalni domen S1 šiljastog proteina SARS-CoV-2 sa slobodnom energijom vezivanja od -6,2 kcal/mol (slika 2B).

Za razliku od CBGA, predviđeno je da se CBDA i THCA-A prvenstveno vezuju za ortosterično mesto podjedinice S1 šiljastog proteina. Ključne interakcije kod CBDA podrazumevaju vodoničnu vezu između grupe karboksilne kiseline i bočnog lanca R403 i hidrofobne interakcije između CBDA aromatičnog prstena i bočnog lanca Y495 (slika 2C). Dodatni hidrofobni doprinos dali su Y505, G496 i Y453. Hidroksi grupa na poziciji 5 kod CBDA formirala je vodoničnu vezu sa amidnom grupom G496. Predviđeno je da će se THCA-A vezati na površini ortosteričnog mesta u hidrofobnom regionu koji se

sastoji od Y495, F497, Y505 i G496 (Slika 2D). Interakcije vodonične veze mogu se formirati između karboksilne kiseline i D501, kao i između hidroksi grupe na poziciji 1 i karbonil grupe Y505.

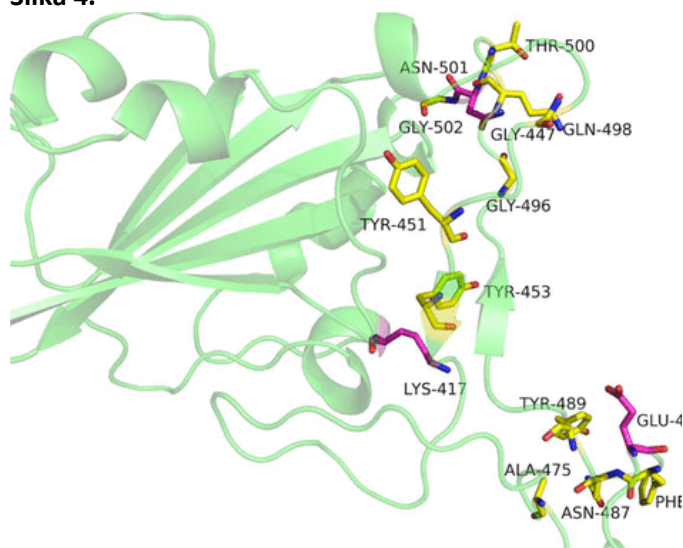
Slika 3.



Slika 3. Jedinjenja CBD blokiraju ulazak virusa SARS-CoV-2 putem vezivanja za šiljak. Neutralizacija pseudotipa lentivirusa sa šiljastim proteinom i više varijanti živog virusa SARS-CoV-2 kanabinoidima CBDA i CBGA. (A) Reprezentativne slike mikroskopije visoke rezolucije ćelija Vero E6 inficiranih virusom SARS-CoV-2 (VA1/2020), tretiranih sa 25 $\mu\text{g/mL}$ CBDA, CBGA ili prenosne supstance (kontrola). Ćelije su obojene anti-ds-RNK antitelima (označeno crvenom) da bi se vizuelizovala mesta replikacije formirana tokom infekcije. DAPI (plava) je korišćen za bojenje jezgara. (B) Infekcija ćelija ACE2 293T šiljkom pseudotipa lentivirusa SARS-CoV-2 u prisustvu CBDA ili CBGA. Procenat neutralizacije je ustanovljen

kvantifikacijom ukupnog GFP signala koji je nastao kao rezultat uspešne pseudovirusne infekcije, normalizovan za kontrolnu prenosnu supstancu ($n = 3$). (C) Tabela vrednosti IC_{50} za eksperimente sa pseudovirusom. (D i E) Infekcija ćelija Vero E6 živim varijantama SARS-CoV-2 (VA1/2020, B.1.1.7 i B.1.351) u prisustvu CBDA (D) i CBGA (E). Procenat neutralizacije je normalizovan za kontrolnu prenosnu supstancu ($n = 3$). (F) Tabela vrednosti IC_{50} za eksperimente sa živim virusom prikazane pod D i E. Vrednosti IC_{50} su određene uklapanjem podataka u model od tri parametra za eksperimente sa infekcijama pseudotipom (C) i živim virusom (F).

Slika 4.



Slika 4. Ostaci ortosteričnog mesta receptor-vezujućeg domena S1 na šiljku. Ostaci magenta boje su mutirani u varijanti B.1.351 (K417N, E484 K, N501Z). Mutacija varijante B.1.1.7 javlja se na N501Y.

Inhibiranje ulaska virusa SARS-CoV-2 u ćelije

Radi utvrđivanja da li CBDA ili CBGA mogu da spreče infekciju blokiranjem ulaska virusa SARS-CoV-2 u ćelije, sprovedeni su testovi infekcije ćelija pseudovirusom i živim virusom SARS-CoV-2. Inkubirali smo živi virus SARS-CoV-2 sa 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CBDA, CBGA ili kontrolne prenosne supstance (DMSO), a zatim inficirali ćelije Vero E6. Dvadeset četiri časa nakon infekcije, ćelije su obojene antitelom protiv dvolančane RNK (dsRNA) za koje se zna da se vezuje isključivo za virusnu RNK. Otkrili smo odsustvo virusne RNK SARS-CoV-2 u ćelijama tretiranim bilo kojim od dva kanabinoida (slika 3A).

Kako bismo kvantifikovali nivo inhibicije, proizveli smo pseudotipske lentivirusne čestice šiljastog proteina sa reporterskim genom GFP, a ćelije HEK 293T koje prekomerno eksprimiraju ACE-2 bile su inficirane u periodu od 48 h ovim lentivirusnim česticama nakon tretmana različitim koncentracijama CBDA, CBGA ili kontrolne prenosne supstance. Broj inficiranih ćelija je kvantifikovan fluorescentnom mikroskopijom, a koncentracija koja je smanjila pseudovirusne infekcije za polovinu (IC_{50}) bila je 7,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za CBDA i 8,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za CBGA (Slika 3B,C). Citotoksičnost ovih jedinjenja je bila beznačajna pri koncentracijama ispod 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za ćelijske linije Caco2, 293T-ACE2 i Vero (slika 4, dodatne informacije).

Da bismo potvrdili sposobnost neutralizacije virusa kod CBDA i CBGA, naš sledeći korak obuhvatao je testove formiranja žarišta uz korišćenje autentičnog virusa SARS-CoV-2 (Isolate USA-WA1/2020). Koristili smo ćelije Vero E6 za ove eksperimente zbog njihove visoke prijemčivosti za virus i uobičajene upotrebe u studijama živih virusa SARS-CoV-2. Testovi formiranja žarišta su izvedeni korišćenjem serijskih rastvora CBDA ili CBGA koji su inkubirani sa infektivnim SARS-CoV-2 u trajanju od 1 h pre infekcije. Kao i u testu neutralizacije pseudovirusa, CBDA i CBGA su sprečili ulazak SARS-CoV-2 u ćelije Vero E6, pri vrednostima IC_{50} od 24 i 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Slika 3D-F).

Pokazalo se da su nove zabrinjavajuće varijante (VOC), poput B.1.1.7 i B.1.351, otporne na neutralizaciju antitelima stvorenim protiv ranijih sojeva virusa SARS-CoV-2. Da bismo procenili da li blokiranje ulaska u ćelije pomoću CBDA i CBGA zavisi od varijante, izvršili smo dodatne testove formiranja žarišta koristeći žive varijante SARS-CoV-2, B.1.1.7, koja je sadržala mutaciju N501Y šiljastog proteina, i B.1.351, sa mutacijama K417N, E484 K i N501Y. Kao i infekcije WA1/2020, CBDA i CBGA su blokirale infekciju B.1.1.7 vrednostima IC_{50} od 11 i 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Varijanta B.1.351 je takođe neutralisana obema jedinjenjima sa vrednostima IC_{50} od 19 i 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Slika 3D-F), što ukazuje da nema značajnog gubitka delotvornosti protiv ovih VOC.

Selektivnost, osetljivost i brzina AS-MS pristupa kao što je MagMASS, prvobitno osmišljenih

u svrhe visokopropusnog skrininga skupova kombinatornih kolekcija,³⁵ takođe su idealni za skrining mešavina prirodnih proizvoda kao što su botanički ekstrakti.³⁶ U poređenju sa konvencionalnim visokopropusnim skriningom koji koristi očitavanja vrednosti fluorescencije ili apsorpcije (kao što je FRET ili fluorescentna polarizacija), AS-MS nudi prednosti kao što je kompatibilnost sa bilo kojom vrstom mešavine liganda, matriksa i pufera za ispitivanje, bez potrebe za fluorescentnim oznakama. Specifičnost pristupa AS-MS je u tome da ga ne ometaju uzorci koji sadrže fluorofore ili hromofore, a koji su učestali u prirodnim proizvodima. Jedna od novijih tehnika AS-MS,³⁷ MagMASS nudi prednosti u poređenju sa drugim pristupima AS-MS koji koriste ultrafiltraciju ili razdvajanje na osnovu veličine, kao što su lakoća automatizacije i brže odvajanje kompleksa receptor-ligand od nevezanih jedinjenja, što minimizira gubitak liganda usled preranog odvajanja od receptora i maksimizira osetljivost. Stoga je MagMASS idealna platforma za otkrivanje prirodnih liganda šiljastog proteina SARS-CoV-2.

Nedavno je rešena kristalna struktura C-terminalnog domena šiljastog proteina virusa SARS-CoV-2 u kompleksu sa ljudskim receptorom ACE2. Među ključnim interakcijama su ostaci duž interfejsa C-terminalnog domena šiljastog proteina koji doprinose mreži vodoničnih veza i interakcijama sonog mosta sa receptorom ACE2. Ostaci na šiljastom proteinu uključeni u vezivanje za ACE2 su A475, N487, E484, Y453, K417, G446, Y449, G496, Q498, T500, G502, Y489 i F486. Interakciji virusa sa

receptorom ACE2 uglavnom doprinose polarne interakcije koje su rezultat hidrofилnih ostataka na površini C-terminalnog domena šiljastog proteina.³⁸

U programu za doking AutoDock Vina, doking liganda na aktivnom mestu je zasnovano na algoritmima koji uzimaju u obzir steričke, hidrofobne veze i interakcije vodonične veze između liganda i ostataka na aktivnom mestu. Najbolje predviđena konformacija vezivanja treba da ima najnižu slobodnu energiju vezivanja (kcal/mol). CBGA je pokazala najnižu slobodnu energiju vezivanja (-6,7 kcal/mol) za alosterično mesto, sa srednjim kvadratnim odstupanjem od 24,3 za ortosterično mesto. S druge strane, THCA-A i CBDA su imale nešto veće energije vezivanja od -6,5 i -6,3 kcal/mol. Sve u svemu, podaci MagMASS-a pokazuju da se CBGA snažno vezuje za podjedinicu S1 šiljastog proteina u smešama kanabinoida, što ukazuje na to da se vezuje alosterično i da nije konkurent vezivanju sa ortosteričnim kanabinoidnim ligandima.

Varijante virusa SARS-CoV-2 kao što su B.1.1.7 i B.1.351 sadrže aminokiseline u podjedinici S1 šiljastog proteina koje stupaju u interakciju sa receptorom ACE2.³⁹ Na primer, mutacija N501Y je ustanovljena bioinformatičkom analizom podataka izvedenih metagenomskim sekvenciranjem uzoraka dobijenih od pacijenta sa upornom infekcijom virusom SARS-CoV-2. Druge identifikovane visokoinfektivne varijante koje obuhvataju mutacije ostataka aktivnog mesta su N501T, K417 i E484 K (Slika 4).⁴⁰ S obzirom na brzo javljanje mutacija, novi inhibitor sa sposobnošću da se veže za ortosterično

³⁵ Zhao, Y. Z.; van Breemen, R. B.; Nikolic, D.; Huang, C. R.; Woodbury, C. P.; Schilling, A.; Venton, D. L. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 4006–4012.

³⁶ Liu, J.; Burdette, J. E.; Xu, H.; Gu, C.; van Breemen, R. B.; Bhat, K. P.; Booth, N.; Constantinou, A. I.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. H.; Farnsworth, N. R.; Bolton, J. L. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2472–2479.

³⁷ Rush, M. D.; Walker, E. M.; Burton, T.; van Breemen, R. B. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 2898–2902.

³⁸ Wang, Q.; Zhang, Y.; Wu, L.; Niu, S.; Song, C.; Zhang, Z.; Lu, G.; Qiao, C.; Hu, Y.; Yuen, K. Y.; Wang, Q.; Zhou, H.; Yan, J.; Qi, J. *Cell* 2020, 181, 894–904.

³⁹ Yi, C.; Sun, X.; Ye, J.; Ding, L.; Liu, M.; Yang, Z.; Lu, X.; Zhang, Y.; Ma, L.; Gu, W.; Qu, A.; Xu, J.; Shi, Z.; Ling, Z.; Sun, B. *Cell Mol. Immunol.* 2020, 17, 621–630.

⁴⁰ Tegally, H.; Wilkinson, E.; Giovanetti, M.; Iranzadeh, A.; Fonseca, V.; Giandhari, J.; Doolabh, D.; Pillay, S.; San, E. J.; Msomi, N.; Mlisana, K.; von Gottberg, A.; Walaza, S.; Allam, M.; Ismail, A.; Mohale, T.; Glass, A. J.; Engelbrecht, S.; Van Zyl, G.; Preiser, W.; Petruccione, F.; Sigal, A.; Hardie, D.; Marais, G.; Hsiao, N. Y.; Korsman, S.; Davies, M. A.; Tyers, L.; Mudau, I.; York, D.; Maslo, C.; Goedhals, D.; Abrahams, S.; Laguda-Akingba, O.; Alisoltani-Dehkordi, A.; Godzik, A.; Wibmer, C. K.; Sewell, B. T.; Lourenço, J.; Alcántara, L. C. J.; Kosakovsky Pond, S. L.; Weaver, S.; Martin, D.; Lessells, R. J.; Bhiman, J. N.; Williamson, C.; de Oliveira, T. *Nature* 2021, 592, 438–443.

mesto bio bi od velikog interesa za intervenciju kod varijanti virusa SARS-CoV-2 koje karakterišu mutacije aktivnog mesta.

Rezultati našeg testa inhibicije infekcije jasno pokazuju da su i CBDA i CBGA u stanju da blokiraju ulazak virusa SARS-CoV-2 u ćelije. Koncentracije potrebne za blokiranje infekcije 50% virusa su visoke, ali mogu biti klinički izvodljive. Na primer, CBDA primenjena oralno kod dobrovoljnih učesnika u dozi od 0,063 mg/kg pokazala je veću bioraspoloživost od CBD-a i proizvela je maksimalnu koncentraciju u plazmi od 0,21 μ M. Kod pasa rase bigl, oralna primena CBDA u dozi od 1 mg/kg bila je dobro tolerisana, dvostruko više biodostupna od CBD-a i proizvela je nivoe u serumu do 1,42 μ M.⁴¹ Mada podaci o bioraspoloživosti CBGA još uvek nisu dostupni, podaci koji se odnose na CBDA ukazuju na to da su koncentracije μ M u plazmi i serumu moguće.

Prethodni izveštaji su ukazali na to da je aktivacija urođenih imunih mehanizama mogući mehanizam inhibicije virusa SARS-CoV-2 dekarboksilovanim kanabidiolom (CBD).⁴² Međutim, naši podaci o živim virusima pokazuju da se inhibicija pomoću CBDA i CBGA dešava na mestu ulaska u ćeliju. Ovi mehanizmi nisu međusobno isključivi i postoji mogućnost da više vrsta kanabinoida u složenim mešavinama iz biljnih ekstrakata može ispoljiti nezavisno dejstvo inhibicije virusa SARS-CoV-2, što potencijalno vodi poboljšanju efikasnosti u odnosu na pojedinačna jedinjenja.

Ono što prvenstveno zabrinjava u aktuelnoj pandemiji je širenje sojeva virusa, kojih je mnogo, a neki od najzabrinjavajućih i najrasprostranjenijih su B.1.1.7 i B.1.351. Kod ovih sojeva je dobro poznato da odolevaju antitelima protiv ranijih varijanti SARS-CoV-2, što posebno zabrinjava zbog činjenice da se trenutne vakcinacione strategije oslanjaju na RBD ranijih varijanti kao antigen. Naši podaci pokazuju minimalan uticaj promene soja na efikasnost CBDA i CBGA, što je trend za koji se nadamo da će se proširiti na druge postojeće i buduće sojeve. Pošto smatramo

da je primarno mesto vezivanja za CBGA alosterično, moguće je čak i smanjivanje evolucionog pritiska da SARS-CoV-2 mutira svoja mesta vezivanja, u odnosu na ortosterična mesta vezivanja koja se uobičajeno favorizuju kod neutrališućih antitela. Uz široku upotrebu kanabinoida, rezistentne varijante bi se i dalje mogle pojavljivati, ali kombinacija vakcinacije i tretmana CBDA/CBGA bi trebalo da stvori nepovoljnije okruženje za SARS-CoV-2.

Eksperimentalni dizajn

Opšte eksperimentalne procedure

Masene spektrometrijske analize su sprovedene pomoću Nexera UHPLC sistema Shimadzu (Kjoto, Japan) koji je povezan sa hibridnim masenim spektrometrom visoke rezolucije LCMS-9030 K-ToF ili trostrukim kvadrupolnim masenim spektrometrom LCMS-8050.

Biljni materijal

Ekstrakti konoplje i izolati specifičnih kanabinoida dobijeni su od Globalnog centra za inovacije konoplje (Univerzitet države Oregon, Korvalis, Oregon, SAD). Taksonomiju biljaka potvrdio je Džej S. Noler iz Globalnog centra za inovacije konoplje. Sertifikovani standardi kanabinoida su kupljeni od kompanije Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, SAD).

Afinitetna selekcija-masena spektrometrija

Rekombinantni šiljasti protein virusa SARS-CoV-2 (RayBiotech; Pičtri Korners, Džordžija, SAD) (~72 kDa) koji sadrži N-terminalnu His-oznaku imobilisan je na magnetnim mikrozrnima derivatima Ni²⁺-nitrilotrisiracetne kiseline (EmerTher; Parsipani, Nju Džersi, SAD) radi korišćenja u pristupu

⁴¹ Wakshlag, J. J.; Schwark, W. S.; Deabold, K. A.; Talsma, B. N.; Cital, S.; Lyubimov, A.; Iqbal, A.; Zakharov, A. *Front. Vet. Sci.* 2020, 7, 505.

⁴² Nguyen, L. C.; Yang, D.; Nicolaescu, V.; Best, T. J.; Ohtsuki, T.; Chen, S.-N.; Friesen, J. B.; Drayman, N.;

Mohamed, A.; Dann, C.; Silva, D.; Gula, H.; Jones, K. A.; Millis, J. M.; Dickinson, B. C.; Tay, S.; Oakes, S. A.; Pauli, G. F.; Meltzer, D. O.; Randall, G.; Rosner, M. R. *bioRxiv* 2021, 2021.03.10.432967.

afinitetne selekcije-masene spektrometrije MagMASS. Kao negativna kontrola, denaturisani šiljasti protein je imobilisan na identičnim magnetnim mikrozrcima. Šiljasti protein korišćen za inkubacije negativne kontrole denaturisan je inkubacijom u vodenom kupatilu na temperaturi od 95 °C u trajanju od 15 minuta. Inkubacije za pozitivnu kontrolu koristile su SBP-1 (RayBiotech), peptid od 23 aminokiseline sa sekvencom IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS, identičnom ACE2 a1 heliks sekvenci koju prepoznaje šiljasti protein SARS-CoV-2. SBP-1 (33 nM) je inkubiran u trajanju od 60 minuta sa magnetnim mikrozrcima koji sadrže 50 pmol imobilizovanog aktivnog ili denaturisanog proteina S1 u 300 µL vezivnog pufera. Nakon dvostrukog ispiranja pomoću 500 µL amonijum acetata od 30 mM da bi se uklonio nevezani ligand dok su zrnca zadržana magnetnim poljem, ligand je oslobođen iz zrnaca korišćenjem 90% metanola u vodi (200 µL) i analiziran pomoću UHPLC-LC/MS. SBP-1 je meren uz pomoć elektrospreja sa pozitivnim jonima uz praćenje odabranih reakcija na trostrukom kvadrupolnom masenom spektrometru pri jediničnoj rezoluciji. Kod SBP-1, tranzicije odabranih praćenih reakcija iznosile su m/z 701,6 ($[M + 4H]^{4+}$) do m/z 136,2 (kvantifikator) i m/z 701,6 ($[M + 4H]^{4+}$) i m/z 120,2 (kvalifikator) pri energijama sudara od -30 i -45 V, sa vremenom zadržavanja od 25 ms po prelazu.

Ekstrakti (10 µg), smeše kanabinoidnih standarda (0,10 µM svaki) ili kanabinoidni standardi (0,10 µM) inkubirani su sa 50 pmol imobilisanog šiljastog proteina SARS-CoV-2 i pregledani pomoću MagMASS-a na gore opisani način. Oslobođeni ligand je analiziran pomoću UHPLC-LC/MS, UHPLC separacijom reverzne faze na koloni Waters (Milford, Masačusets, SAD) Acquity UPLC BEH C18 (1.7 µm, 130 Å, 2,1 mm × 50 mm) petominutnim linearnim gradijentom od 20% do 80% acetonitrila u 0,1% vodenom rastvoru mravlje kiseline pri brzini protoka od 0,3 mL/min za analizu peptida SBP-1. Odvajanja kanabinoida su sprovedena na sličan način, s tim što je korišćena kolona Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ od 100 mm sa jednominutnim gradijentom od 50% do 75% acetonitrila, nakon čega je usledio

jedanaestominutni gradijent do 80% acetonitrila. Kolona je između analiza ekvilibrisana na početno stanje u trajanju od jednog minuta.

Ligandi koji eluiraju iz kolone detektovani su korišćenjem masene spektrometrije pozitivne ili negativne jonizacije elektrosprejom na Q-ToF masenom spektrometru pri moći razdvajanja od 30 000. Temperatura elektrospreja je bila 300 °C, a naponi od 4,5 i -3,5 kV su korišćeni za pozitivnu i negativnu jonizaciju. Brzine protoka gasnog azota za izvor jonizacije elektrosprejom bile su 10 L/min za sušenje, 10 L/min za zagrevanje i 3 L/min za raspršivanje. Korišćena je tandemna masena spektrometrija nastalih jona zavisna od podataka tako da su maseni spektri i tandem maseni spektri nastalih jona dobijeni svakih 100 ms u opsegu skeniranja od m/z 100-1200 i m/z 70-1200. Za nastale jone MS/MS, energija sudara je bila 35 V sa širenjem energije od 17 V.

Nakon afinitetne selekcije, UHPLC-MS hromatogram svakog uzorka i odgovarajuća negativna kontrola su upoređivani pomoću metabolomskog softvera Online XCMS (Scripps Research, La Džola, Kalifornija, SAD) da bi se identifikovali pikovi obogaćeni usled specifičnog vezivanja za protein S1.⁴³ Maseni spektri visoke rezolucije za svaki obogaćeni pik obrađeni su korišćenjem softvera Shimadzu LabSolutions V5.2. Ligandi prirodnih proizvoda čije strukture su opisane u literaturi identifikovani su upoređivanjem sa autentičnim standardima na osnovu njihovog elementarnog sastava utvrđenog korišćenjem tačnih merenja mase visoke rezolucije, tandemna masenog spektra i vremena zadržavanja UHPLC.

Konstante disocijacije ravnoteže

Konstante afiniteta za vezivanje aktivnih jedinjenja za podjedinicu S1 šiljastog proteina određene su brзом ravnotežnom dijalizom. Najpre, optimalno vreme za potpunu ekvilibraciju RED uređaja dobijenog od ThermoFisher-a (Voltam, Masačusets, SAD) određeno je za svako od jedinjenja dodavanjem 1 µM šiljastog proteina u puferu (300

⁴³ Tautenhahn, R.; Patti, G. J.; Rinehart, D.; Siuzdak, G. Anal. Chem. 2012, 84, 5035-5039.

μL) u proteinsku komoru i dodavanjem praznog fiziološkog rastvora puferovanog fosfatom, pH 7,2 (500 μL), u pufer komoru. CBGA ili CBDA su ubačene u proteinsku komoru u konačnoj koncentraciji od 2.5 μM . Tokom inkubacije na temperaturi od 37 °C u orbitalnom šejkeru pri 200 o/min, alikvoti (30 μL) su uzorkovani iz komore za uzorke i pufere u trajanju od 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 sati, pomešani sa jednakim zapreminama pufera, 300 μL ledeno hladnog 90% vodenog rastvora acetonitrila sa 0,1% mravlje kiseline i 500 ng/mL d4-daidzeina (interni standard), mešanih vorteksom i inkubiranih na ledu u trajanju od 1 sata. Nakon centrifugiranja na 18000g u trajanju od 30 minuta, talog je uklonjen i koncentracija liganda je izmerena korišćenjem UHPLC-MS/MS uz praćenje odabranih reakcija MS/MS i negativno jonizovanje elektrosprejom na trostrukom kvadrupolnom masenom spektrometru. Za merenje CBGA, tranzicije odabranih praćenih reakcija iznosile su m/z 359 do m/z 341 (kvantifikator) i m/z 359 do m/z 315 (kvalifikator). Za merenje CBDA, tranzicije odabranih praćenih reakcija iznosile su m/z 357 do m/z 339 (kvantifikator) i m/z 357 do m/z 245 (kvalifikator).

Zatim, konstante ravnoteže disocijacije CBGA i CBDA su određene inkubacijom podjedinice S1 šiljastog proteina sa različitim koncentracijama liganada u rasponu od 0,05 do 500 μM , u tri navrata. Nakon 5 h za CBGA i 4 h za CBDA, koncentracije svakog liganda u komorama uzoraka i pufera merene su korišćenjem UHPLC-MS/MS sa trostrukim četverostrukim masenim spektrometrom na gore opisani način. Analiza i uklapanje podataka sprovedeni su korišćenjem programa Microsoft Excel (Sijetl, Vašington, SAD) i KaleidaGraph v4.1 (Riding, Pensilvanija, SAD).

Doking liganda

Računarsko modeliranje kanabinoida je sprovedeno korišćenjem programa AutoDock Vina (Scripps Research Institute, La Džola, Kalifornija, SAD).⁴⁴ Koordinate kristalne strukture C-terminalnog domena šiljastog proteina SARS-CoV-2 preuzete su iz Proteinske banke podataka (Protein Data Bank, ID broj 6LZG).⁴⁵ ChemDraw strukture liganada su konvertovane u fajlove .pdb korišćenjem programa Pymol. Podaci o proteinima su učitani u program AutoDock Vina, prostor za pretragu je definisan preko poznatog ortosteričnog mesta, a fajl je konvertovan u .pdbkt. Takođe, ligandi su pojedinačno učitani i konvertovani u fajlove .pdbkt.

Pseudotipizovana proizvodnja lentivirusa

Pseudovirus je pripremljen na prethodno opisan način.⁴⁶ Čelije 293T, zasejane 1 dan ranije sa 2 miliona ćelija u posudama sa kulturom tkiva od 6 cm, transfektovane su plazmidima za pakovanje lentivirusa, S plazmidom SARS-CoV-2 i reporter plazmidom IzGreen.⁴⁷ Nakon transfekcije, ćelije su inkubirane na temperaturi od 37 °C u trajanju od 60 sati. Virusni medijumi su filtrirani pomoću špric filtera od 0,45 mm i brzo zamrznuti u tečnom azotu pre skladištenja na temperaturi od -80 °C. Zalihe virusa su titrirane na ćelijama 293T-ACE2 tretiranim sa 50 μL polibrena od 5 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD). Titar je određen fluorescentnom mikroskopijom pomoću fluorescentnog mikroskopa BZ-X700 All-in-One (Keyence, Ajtaska, Ilinoj, USA).

⁴⁴ Trott, O.; Olson, A. J. J. Comput. Chem. 2009, 31, 455–461.

⁴⁵ Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. Nucleic Acids Res. 2000, 28, 235–242.

⁴⁶ Bates, T. A.; Weinstein, J. B.; Farley, S.; Leier, H. C.; Messer, W. B.; Tafesse, F. G. Cell Reports 2021, 34 (7), 108737.

⁴⁷ Crawford, K. H. D.; Eguia, R.; Dingens, A. S.; Loes, A. N.; Malone, K. D.; Wolf, C. R.; Chu, H. Y.; Tortorici, M. A.; Veessler, D.; Murphy, M.; Pettie, D.; King, N. P.; Balazs, A. B.; Bloom, J. D. Viruses 2020, 12, 513.

Širenje virusa SARS-CoV-2

Izolati virusa SARS-CoV-2 USA/CA_CDC_5574/2020 [soj B.1.1.7] (NR-54011), hCoV-19/South Africa/KRISP-K005325/2020 [soj B.1.351] (NR-54009), i USA-WA1/2020 1 [soj A] (NR-52281) dobijeni su preko BEI Resources-a, razblaženi u razmeri 1:10 i dodati u 70% konfluentnih ćelija Vero E6. Ćelije su inkubirane u trajanju od 1 h na temperaturi od 37 ° C uz protresanje na svakih 15 minuta. Dodati su dodatni medijumi prema preporučenoj zapremini kulture proizvođača, a ćelije su inkubirane u trajanju od 72 h u inkubatoru za kulturu tkiva. Talog je centrifugiran na 3000g u trajanju od 5 minuta pre alikvotiranja i zamrzavanja na -80 °C.

Test neutralizacije pseudovirusa

Neutralizacija pseudovirusa je sprovedena na prethodno opisan način. Ukratko, ćelije 293T-ACE2 su zasejane sa 10 000 ćelija po bunariću na pločama sa 96 bunarića tretiranim kulturom tkiva, polilizinom. Ćelije su uzgajane preko noći na temperaturi od 37 °C. Pseudotipizovani lentivirus LzGreen SARS-COV-2 S kombinovan je sa dvostrukim serijskim rastvorima CBDA i CBGA u DMSO ili kontrolnoj prenosnoj supstanci. Mešavina virus-lek je inkubirana na temperaturi od 37 °C u trajanju od 1 h, nakon čega je virus dodat u ćelije 293T-ACE2 tretirane sa 5 µg/mL polibrena. Ćelije su inkubirane sa neutralizovanim virusom na period od 44 h, zatim fiksirane sa 4% formaldehida u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi, inkubirane sa DAPI u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi i snimljene fluorescentnim mikroskopom BZ-X700 All-in-one (Keience, Ajtaska, Ilinoj, SAD). Ukupne površine DAPI i GFP fluorescentnog signala su izračunate korišćenjem mikroskopskog softvera (Keyence). Da bi se uzela u obzir varijabilnost u broju ćelija, zeleni fluorescentni signal je normalizovan za DAPI signal. U situaciji sa manje žarišta DAPI, modalna vrednost DAPI signala za svaki skup replika korišćena je za normalizaciju u tom stanju. U svim ostalim

situacijama, za normalizaciju su korišćene kontrolne vrednosti DMSO da bi se kontrolisala nedoslednost obojenja DAPI u replikama. Vrednosti IC₅₀ su izračunate pomoću kombinovanih repliciranih podataka u Pajtonu korišćenjem troparametarskog logističkog modela i nacrtan je njihov grafikon pomoću kolekcije za vizuelizaciju podataka Matplotlib.

Test formiranja žarišta za živi virus SARS-CoV-2

Testovi formiranja žarišta su sprovedeni na prethodno opisani način.⁴⁸ Ukratko, pločice sa 96 bunarića sa subkonfluentnim ćelijama Vero E6 bile su inficirane sa 50-100 titra virusa po bunariću originalnog soja SARS-CoV-2 (WA-1/2020) ili njegovih varijanti (B.1.1.7 ili B.1.351) u puferu koji je sadržao CBDA ili CBGA u rasponu od 100 do 0,625 µg/mL. DMSO je korišćen kao prenosna supstanca. Mešavine virusa i lekova su inkubirane u trajanju od 1 h na temperaturi od 37 °C pre dodavanja ćelijama. Smeša je inkubirana sa ćelijama u periodu od 1 h na temperaturi od 37 °C pre dodavanja medijuma za pokrivanje (Opti-MEM, 2% FBS, 2% metilceluloza). Infekcija je ostavljena da se odvija u periodu od 48 h; zatim su pločice fiksirane u periodu od 1 h u 4% formaldehidu u fiziološkom rastvoru puferovanom fosfatom (PBS). Ćelije su permeabilizovane (PBS, 0,1% saponin, 0,1% albumin goveđeg seruma) u trajanju od 30 min. Imuni serum antigena šiljastog proteina SARS-CoV-2 dobijen iz alpake razblažen je u razmeri 1:5000 u puferu za permeabilizaciju i inkubiran na pločicama preko noći na temperaturi od 4 °C. Pločice su isprane tri puta fiziološkim rastvorom puferovanim fosfatom sa 0,1% Tween-20 (pufer za pranje) i inkubirane sa laminim antitelima u razmeri od 1:20 000 u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon još tri ispiranja u puferu za pranje, pločice su razvijene pomoću supstrata TrueBlue (Seracare) u trajanju od 30 minuta pre nego što su snimljene (CTL imunospot) i prebrojane (Viridot).⁴⁹ Za svaki eksperiment su pripremljene tri zasebne serije rastvora, od kojih je svaka korišćena za pripremu tri tehničke replike. Vrednosti IC₅₀ su izračunate

⁴⁸ Case, J. B.; Bailey, A. L.; Kim, A. S.; Chen, R. E.; Diamond, M. S. *Virology* 2020, 548, 39–48.

⁴⁹ Katzelnick, L. C.; Coello Escoto, A.; McElvany, B. D.; Chávez, C.; Salje, H.; Luo, W.; Rodriguez-Barraquer, I.; Jarman, R.; Durbin, A.

pomoću kombinovanih repliciranih podataka u Pajtonu korišćenjem troparametarskog logističkog modela i nacrtan je njihov grafikon pomoću kolekcije za vizuelizaciju podataka Matplotlib.

Imunofluorescencija

Ćelije Vero E6 su zasejane na optičkim pločicama sa staklenim dnom sa 96 bunarića, obloženim rastvorom poli-lizina; 20 000 ćelija je zasejano po svakom bunariću. Ćelije su inficirane virusom SARS-CoV-2 na gore opisani način. Nakon 24 h od infekcije, ćelije su fiksirane sa 4% paraformaldehida u PBS u trajanju od 1 h. Pločice sa 96 bunarića sa ćelijama Vero E6 inficiranim virusom SARS-CoV-2 permeabilizovane su sa 2% goveđeg serumskog albumina i 0,1% Triton-X-100 u PBS. Transfektovane ćelije su inkubirane u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi sa mišjim anti-dsRNA antitelom (Millipore Sigma) da bi se obojila mesta replikacije SARS-CoV-2 u inficiranim ćelijama. Konjugovana anti-mišja IgG AF555 sekundarna antitela dodata su u rastvor u razmeri od 1:500 u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD). Konfokalno snimanje je sprovedeno pomoću Zeiss LSM 980 korišćenjem 63× Plan-Achromatic 1.4 NA uljanog imersionog objektiva. Slike su obrađene softverom Zeiss Zen Blue. Z-projekcije maksimalnog intenziteta pripremljene su na Fidžiju.

Dodatne informacije

Dodatne informacije su dostupne besplatno na <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.1c00946>.