

Investigation of the Binding of Animal Peptides to the ACE2 Receptor Using Molecular Docking Studies

Mohammed Adnan Hashim Al-battat¹, Marzieh Gharouni¹, Mohammadreza Nassiri^{1*},
Ali Javadmanesh¹, Ahmad Asoodeh²

1-Department of Animal Science, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2-Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

nassiryr@um.ac.ir

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2025.96038.1276>

Introduction:

The angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor is a key component of the renin–angiotensin system and serves as the primary cellular entry point for SARS-CoV-2 through direct interaction with the viral spike protein. Despite the advances in antiviral therapy and vaccination, viral escape mutations and limited accessibility in low-resource settings continue to challenge global health efforts. Peptide-based therapeutics have emerged as promising alternatives due to their high specificity, low toxicity, and ease of design. Particularly, animal-derived peptides have demonstrated broad antimicrobial, antiviral, and immunomodulatory properties, suggesting their potential as ACE2-targeting agents capable of blocking viral attachment.

Materials and Methods:

Twelve bioactive peptides derived from various animal proteins were selected from literature and subjected to in silico evaluation. An initial screening was conducted using ToxinPred, HemoPI, ProInflam, Antigenic Peptide Predictor, and PEP-Life to assess toxicity, hemolytic potential, inflammatory response, antigenicity, and peptide stability. Seven peptides passed all filters and were selected for docking analysis. The ACE2 receptor structure (PDB ID:) was retrieved from the RCSB Protein Data Bank and refined using MODELLER 10.2 to reconstruct missing residues, followed by energy minimization via the YASARA server. Peptide structures were predicted using the PEP-FOLD3 web server and optimized under the same protocol. Molecular docking was performed using the HPEPDOCK server, and protein–peptide interaction profiles were analyzed through PDBSUM to determine hydrogen bonds, hydrophobic contacts, and key residue engagement.

Results and Discussion:

Among the seven screened peptides, three candidates—ELQACQQVMDR (Peptide 6), AQQLAAQLPAMCR (Peptide 7), and RRWQWRMKKLG (Peptide 12) exhibited the highest binding affinities toward the ACE2 receptor. Peptide 12 achieved the strongest interaction, with a docking score of -246.510, forming stable hydrogen bonds and hydrophobic interactions with residues such as Phe40, Gln98, Tyr202, Asp206, and Arg514, which are known to participate in spike receptor-binding domain interactions. Peptide 7 displayed eleven hydrogen bonds, indicating extensive interface stabilization, while Peptide 6 showed compact yet significant binding at the active interface. All three peptides were predicted as non-toxic and non-hemolytic, with suitable half-life profiles suggesting favorable pharmacokinetics.

The interaction profiles of peptides 6, 7, and 12 are comparable to those of known ACE2-derived peptide inhibitors such as SBP1 and engineered mini-proteins like LCB1, which sterically block viral entry. Notably, the cationic nature of Peptide 12 (+5 charge) facilitates

strong electrostatic attraction toward the negatively charged ACE2 interface without compromising hemocompatibility—a common limitation observed in conventional antimicrobial peptides. The ability of these peptides to engage residues directly implicated in spike protein binding suggests a competitive inhibition mechanism that could effectively prevent viral attachment. Compared to synthetic inhibitors or monoclonal antibodies, animal-derived peptides offer advantages in production scalability, reduced immunogenic burden, and lower manufacturing cost.

Conclusion:

This study provides compelling computational evidence supporting the potential of animal-derived peptides, particularly RRWQWRMKKLG (Peptide 12), as ACE2-targeting therapeutic candidates. Their strong binding affinity, safety profile, and interaction with critical spike-contact residues highlight their suitability for further development as antiviral agents. Future work should involve experimental validation through surface plasmon resonance assays, viral entry inhibition studies, and molecular dynamics simulations to confirm complex stability under physiological conditions. Collectively, these results establish a foundational framework for repurposing natural peptides as next-generation COVID-19 therapeutics and potentially for other ACE2-mediated diseases.

Keywords: ACE2 receptor, SARS-CoV-2, molecular docking, animal-derived peptides, peptide inhibitors, antiviral therapy, computational screening

بررسی نحوه اتصال پپتیدهای حیوانی به گیرنده ACE2 با استفاده از مطالعات داکینگ مولکولی

محمد عدنان هاشم البتات^۱، محمدرضا نصیری^{۱*}، علی جوادمنش^۱، مرضیه قارونی^۱، احمد آسوده^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۲۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۷

^۱ گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

nassiry@um.ac.ir

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2025.96038.1276>

چکیده

گیرنده آنژیوتانسین کانورتینگ آنزیم ۲ (ACE2) به عنوان نقطه ورود اصلی ویروس SARS-CoV-2 به سلول‌های انسانی، یکی از کلیدی‌ترین اهداف دارویی در کنترل عفونت کووید-۱۹ سویه اومیکرون محسوب می‌شود. با وجود توسعه داروها و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، همچنان نیاز به مهارکننده‌های ایمن، پایدار و مقرون به صرفه که بتوانند به طور اختصاصی از اتصال پروتئین اسپایک به ACE2 جلوگیری کنند احساس می‌شود. در پاسخ به این چالش، مجموعه‌ای از دوازده پپتید مشتق شده از منابع حیوانی با بهره‌گیری از ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد غربالگری قرار گرفتند تا از نظر

سمیت، همولیتیک نبودن و پایداری زیستی ارزیابی شوند. نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که سه پپتید ELQACQQVMDR (پپتید ۶)، AQQLAAQLPAMCR (پپتید ۷) و RRWQWRMKKLG (پپتید ۱۲) دارای بیشترین میل اتصال به ناحیه فعال ACE2 هستند. در میان آن‌ها، پپتید ۱۲ با پایین‌ترین امتیاز داکینگ (۵۱۰/۲۴۶-)، قوی‌ترین برهم‌کنش را نشان داده و با باقی‌مانده‌های حیاتی در ناحیه اتصال پروتئین اسپایک، نظیر Phe40، Gln98 و Asp206، پیوندهای هیدروژنی و الکترواستاتیک پایداری برقرار کرد. با توجه به ویژگی‌های غیرسمی، عدم ایجاد همولیز و پایداری ساختاری مناسب، این پپتیدها، به‌ویژه پپتید ۱۲ (RRWQWRMKKLG) به‌عنوان کاندیداهای امیدبخش برای توسعه داروهای مهارکننده ACE2 پیشنهاد می‌شوند. انجام آزمایش‌های مکمل در سطح سلولی و مولکولی می‌تواند مسیر تأیید تجربی و کاربرد درمانی این نتایج را هموار سازد.

واژگان کلیدی: گیرنده ACE2، کووید-۱۹، سویه اومیکرون، داکینگ مولکولی، پپتیدهای ضدویروسی مشتق از حیوانات.

۱. مقدمه

پپتیدهای طبیعی عموماً از پایداری بالاتر و نیمه‌عمر طولانی‌تری در محیط‌های زیستی برخوردار هستند که این امر امکان بروز اثرات درمانی پایدارتر را فراهم می‌سازد (Uwamahoro et al., 2025). افزون بر این، بسیاری از پپتیدهای طبیعی دارای خواص تعدیل‌کننده ایمنی و آنتی‌ژنی هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهد بدون ایجاد واکنش‌های التهابی مضر یا پاسخ‌های خودایمنی، سیستم ایمنی میزبان را به‌طور مؤثر تحریک کنند. این ایمنی‌زایی متعادل، اثرگذاری ضدویروسی آن‌ها را از طریق دو سازوکار هم‌زمان تقویت می‌کند: مهار مستقیم ورود ویروس و تعدیل پاسخ‌های ایمنی مضر که معمولاً با بروز آسیب‌شناسی شدید همراه هستند. مطالعات پیش‌بالینی گسترده تاکنون پتانسیل پپتیدهای مشتق از منابع طبیعی متنوع، شامل موجودات دریایی، گیاهان و جانوران را برجسته ساخته‌اند. با وجود این چشم‌انداز امیدبخش، چالش‌هایی نظیر سامانه‌های انتقال، فراهمی زیستی و تولید در مقیاس انبوه همچنان نیازمند بررسی هستند تا کارایی بالینی آن‌ها بهینه شود (Moroy & Tuffery, 2022).

پپتیدهای زیست‌فعال مشتق از منابع حیوانی به‌عنوان یک گروه مهم از زیست‌مولکول‌ها، اخیراً توجه فزاینده‌ای را در حوزه داروسازی به‌دلیل اندازه کوچک، پایداری، سهولت طراحی و فراهمی زیستی بالا به خود جلب کرده‌اند (Kong et al., 2024). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که برخی از پپتیدهای حاصل از پروتئین‌های حیوانی قادر به اتصال انتخابی به گیرنده ACE2 بوده و از این طریق برهم‌کنش آن با ویروس یا سایر لیگاندها را مختل می‌کنند. این ویژگی، پپتیدهای مشتق از منابع حیوانی را به‌عنوان نامزدهای بالقوه برای داروهای ضدویروسی مطرح ساخته است (Festa et al., 2020). به‌عنوان نمونه، دو پپتید ضد میکروبی جدید با نام‌های تمپورین Ra- و تمپورین Rb- که از ترشحات پوستی قورباغه مردابی جداسازی شده‌اند، دارای فعالیت ضد میکروبی قوی همراه با سمیت پایین نسبت به سلول‌های انسانی هستند. نکته قابل‌توجه اینکه این پپتیدها فعالیت وسیع‌الطیفی را علیه باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی، از جمله سوبه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نشان داده‌اند که ظرفیت درمانی مناسب آن‌ها را برای بیماری‌های عفونی، از جمله عفونت‌های ویروسی، تقویت می‌کند (Asoodeh et al., 2012). همچنین، پپتیدهای مشتق از لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ دارای فعالیت مهارکنندگی آنزیم ACE هستند که این ویژگی در تعدیل مسیرهای التهابی و عملکردهای عروقی، که معمولاً در

عفونت‌های ویروسی درگیر می‌شوند، اهمیت دارد (Memarpoor-Yazdi et al., 2012). علاوه بر این، پپتیدهای مشتق از لاکتوفرین که از طریق هضم با آنزیم‌های دستگاه گوارش انسان تولید می‌شوند، فعالیت ضدویروسی قوی همراه با تقویت عملکرد سیستم ایمنی نشان داده‌اند (Furlund et al., 2013). پپتیدهای استخراج‌شده از منابعی همچون ماهی، شیر و فرآورده‌های گوشتی نشان داده‌اند که این پپتیدها قادرند به‌طور اختصاصی ACE2 یا کمپلکس ACE2-RBD (ناحیه اتصال گیرنده) و ویروس کرونا را هدف قرار دهند و از طریق افزایش پایداری کمپلکس‌های مهاری در سطح مولکولی، کارایی بازدارندگی را تقویت نمایند (Li et al., 2024). پپتید IRW یکی از شناخته‌شده‌ترین نمونه‌های پپتیدهای حیوانی است که با مهار برهم‌کنش اسپایک - ACE2 در مطالعات سلولی، موجب کاهش بیان پروتئین S ویروس و کاهش ورود آن به سلول‌های میزبان شده است. سایر پپتیدهای منشأ حیوانی یا انسانی همچون 4H30 نیز از طریق سازوکارهای مشابه، بار ویروسی را کاهش داده یا از همجوشی غشایی جلوگیری کرده‌اند. این یافته‌ها، پتانسیل پپتیدهای حیوانی را به‌عنوان عناصر کلیدی در توسعه درمان‌های نوین برای عفونت‌های کرونایی برجسته می‌سازد (Zhao et al., 2022). ویژگی‌هایی نظیر فعالیت ضد میکروبی و ضدویروسی قوی، سمیت سلولی پایین، اثرات ایمنی‌ساز و توانایی اتصال اختصاصی به مولکول‌های هدف، که در پپتیدهای حیوانی مشاهده می‌شود، دلیل اصلی برتری آن‌ها در مقایسه با داروهای سنتتیک محسوب می‌گردد. گیرنده آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲ (ACE2) یک پروتئین غشایی کلیدی در بدن انسان است که به‌عنوان دروازه ورود ویروس‌های عامل بیماری کووید-۱۹ شناخته شده است. ویروس کووید-۱۹ سویه اومیکرون با استفاده از پروتئین اسپایک خود به‌طور اختصاصی به ACE2 متصل می‌شود و از این طریق وارد سلول‌های انسانی می‌گردد (Hoffmann et al., 2020). اهمیت ACE2 در دوران همه‌گیری کووید-۱۹ برجسته شد، زیرا تغییر در میزان بیان یا فعالیت آن می‌تواند به‌شدت بر شدت بیماری تأثیر بگذارد (Gheblawi et al., 2020). بر همین اساس، تلاش‌های پژوهشی گسترده‌ای به شناسایی مولکول‌ها، پپتیدها و داروهایی معطوف شده است که قادر به جلوگیری از اتصال پروتئین اسپایک به ACE2 باشند. مسدودسازی ورود ویروس به سلول‌های میزبان، یکی از راهبردهای کلیدی در پیشگیری و درمان کووید-۱۹ به شمار می‌رود (Monteil et al., 2020). در این راستا، پروتئین‌های نو ترکیب ACE2 به‌عنوان طعمه‌های رقابتی طراحی شده‌اند که با اتصال به ویروس، آن را خنثی می‌کنند بدون آنکه به سلول‌های میزبان آسیب برسانند (Chan et al., 2020). بدین ترتیب، ACE2 نه تنها از منظر فیزیولوژیک اهمیت دارد، بلکه به‌عنوان یک هدف دارویی حیاتی در نبرد با بیماری‌های عفونی، به‌ویژه ویروس‌های عامل کووید-۱۹ مطرح شده است. فناوری‌های زیست اطلاعاتی و زیست‌شناسی محاسباتی همچون داکینگ مولکولی، ابزار قدرتمندی را برای بررسی برهم‌کنش‌های بیومولکولی میان پپتیدها و گیرنده‌ها فراهم کرده است (Sadremomtaz et al., 2021). داکینگ مولکولی یک روش محاسباتی است که بر اساس مکمل بودن ساختاری و شیمیایی، جهت‌گیری ترجیحی و میل اتصال مولکول‌های کوچک یا پپتیدها به پروتئین‌های هدف را پیش‌بینی می‌کند. این روش‌ها امکان غربالگری سریع و نسبتاً کم‌هزینه صدها یا حتی هزاران پپتید را بر اساس الگوی اتصال و انرژی پیونددهی آن‌ها به گیرنده ACE2 فراهم می‌کنند. نتایج شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی نشان داده است که برخی از پپتیدها قادر به اتصال پایدار به جیب فعال یا نواحی سطحی ACE2 بوده و در نتیجه می‌توانند به‌عنوان مهارکننده‌های بالقوه این گیرنده عمل کنند (Sharma et al., 2025).

مختلف، به‌ویژه عفونت‌های ناشی از SARS-CoV-2، هموار می‌سازد (Biswas et al., ۲۰۲۲).

استفاده از مجموعه پپتیدهای مشتق‌شده از منابع حیوانی با رویکرد غربالگری زیست‌اطلاعاتی و ارزیابی دقیق ویژگی‌های سمیت، همولیتیک نبودن و پایداری زیستی برای انتخاب پپتیدهای مورد نظر این فرآیند هدفمند و سیستماتیک، پیش از این با این سطح از جامعیت در حوزه مهار ACE2 و سویه اُمیکرون کووید-۱۹ انجام نشده بود. تمرکز عملی بر

داروپپتیدهایی است که می‌توانند به طور اختصاصی و مستقیم از برهم‌کنش پروتئین اسپایک ویروس با گیرنده ACE2 جلوگیری کنند.

از میان پپتیدهای کاندید، پپتید ۱۲ با ویژگی‌های غیرسمی، غیرهمولیتیک، داشتن بار کاتیونی و میل اتصال بسیار قوی به نواحی بحرانی ACE2 به ویژه نقاط کلیدی برهم‌کنش با RBD به عنوان یک مهارکننده رقابتی امیدبخش شناسایی شده است. این یافته در مطالعات قبلی به ویژه با تمرکز بر آمیکرون گزارش نشده بود. از طرفی اغلب پژوهش‌های پیشین بر روی آنتی‌بادی‌ها داروهای سنتتیک یا قطعات مهندسی شده از ACE2 یا پپتیدهای انسانی تمرکز داشته‌اند در حالی که این تحقیق با بهره‌گیری از پپتیدهای مشتق شده از منابع طبیعی حیوانی و غربالگری جامع زیست‌اطلاعاتی امکانات جدیدی را در شناسایی داروهای ارزان ایمن و پایدار ایجاد می‌کند. تأکید ویژه این پژوهش بر سویه آمیکرون و سنجش کارآمدی پپتیدها در مسدودسازی اختصاصی ACE2 از طریق مدل‌سازی ساختاری و داکینگ مولکولی مسیر تجربی جدیدی برای درمان‌های مبتنی بر پپتید طبیعی در برابر کووید-۱۹ باز می‌کند که در مقایسه با مطالعات گذشته نوآوری قابل ملاحظه‌ای دارد.

به‌علاوه تحقیق حاضر با افزودن اطلاعات مربوط به پایداری، سمیت سلولی فعالیت همولیتیک و نیمه‌عمر پپتیدها پیش از بررسی‌های تجربی زیستی، سبدي از نامزدهای دارویی با پتانسیل ترجمه سریع‌تر به بالین معرفی می‌کند. واکاوی دقیق مکانیسم مولکولی اتصال پپتید به بقایای کلیدی ACE2 و پیشنهاد مدل مسدودسازی اختصاصی که از نظر عملکردی مشابه پپتیدهای مهندسی شده اما با منشأ طبیعی حیوانی و مزایای بیوشیمیایی بهتر است رویکردی نوین در رشته داروی ضد ویروس و زیست‌فناوری محسوب می‌شود.

در این پژوهش، ما چندین مهارکننده پپتیدی علیه ACE2 بر اساس ساختار کریستالی منتشر شده برای آن با کد PDB:1R42 بررسی کردیم. این مهارکننده‌ها که وزن مولکولی نسبتاً کمی دارند، از نظر ساختاری پایدار هستند، از نظر ساختاری با پروتئین اسپایک مطابقت دارند و برای عفونت کووید-۱۹ سویه آمیکرون بسیار اختصاصی هستند. این مطالعه می‌تواند راهنمایی بالقوه‌ای در تشخیص آنتی‌ژن و طراحی‌های مبتنی بر ساختار آنتی‌بادی‌هایی با میل ترکیبی بالا ارائه دهد. در این کار، ما یک استراتژی قوی برای طراحی پپتیدهای ضد ویروسی جدید که به طور خاص علیه گونه‌های جدید عفونت کووید-۱۹ سویه آمیکرون عمل می‌کنند، نشان دادیم.

۲. مواد و روش

۲.۱ آماده‌سازی ساختارهای پروتئین و پپتید برای مطالعه بیوانفورماتیکی^۱

برای مطالعه بیوانفورماتیکی، ساختار سه‌بعدی پروتئین آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲ (ACE2) از پایگاه داده RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) با استفاده از کد PDB (1r42, 2.2 Å) بازیابی شد و اسیدهای آمینه غائب در ساختار با استفاده از نرم‌افزار MODELLER نسخه ۱۰.۲ بازسازی گردید تا ساختاری کامل و مناسب برای تحلیل‌های محاسباتی فراهم شود. توالی‌ها و منابع پپتیدهای انتخاب‌شده در جدول ۱ ارائه شده‌اند. ویژگی‌های این پپتیدها با استفاده از سامانه‌های زیست‌اطلاعاتی تحت وب شامل ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/algos.php>) برای پیش‌بینی سمیت، HemoPI (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/hemopi/>) برای ارزیابی فعالیت همولیتیک، ProInflam (<http://metabiosys.iiserb.ac.in/proinflamm/>) برای پیش‌بینی پتانسیل پیش‌التهابی، Predicting Antigenic

¹ In Silico

Peptides (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) برای پیش‌بینی آنتی‌ژنیسیته و PEPlife (<http://crdd.osdd.net/raghava/peplife/>) برای ارزیابی نیمه‌عمر مورد بررسی قرار گرفتند. هفت پپتید (شماره‌های ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۲) معیارهای غربالگری را گذرانده و برای ارزیابی برهم‌کنش با ACE2 انتخاب شدند (جدول ۲). از آنجا که ساختار سه‌بعدی این پپتیدها در پایگاه‌های داده موجود نبود، ساختار آن‌ها با سامانه PEP-FOLD3 (<https://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin>) پیش‌بینی شد.

جدول ۱- توالی و منبع پپتیدهای بررسی شده در این مطالعه.

Table 1- Sequence and source of peptides examined in this study.

Number شماره	Sequences توالی‌ها	Source of peptides منبع پپتیدها	Resources منابع
1	NTDGSTDYGILQINSR	لیزوزیم	(Memarpour-Yazdi et al., 2012)
2	KLKNFAKGVAQSLNKAACKLSGQC	قورباغه	(Ghavami et al., 2008)
3	FLKPLFNAALKLLP	قورباغه	(Asoodeh et al., 2012)
4	ELQER	تخم شترمرغ	(Asoodeh et al., 2014)
5	IPALLKR	تخم شترمرغ	(Asoodeh et al., 2014)
6	ELQACQVMDR	گلوتن گندم	(Asoodeh et al., 2014)
7	AQQLAAQLPAMCR	گلوتن گندم	(Asoodeh et al., 2014)
8	LEGGDALSASQ	تخم شترمرغ	(Asoodeh et al., 2014)
9	FLPVLAVLSRA	تخم شترمرغ	(Asoodeh et al., 2012)
10	LLGTILGLLKGL	تخم شترمرغ	Unpublished data
11	GLFDIIKKIAESF	قورباغه	Unpublished data
12	RRWQWRMKKLG	کازئین شیر	(Furlund et al., 2013)

۲.۲ بهینه‌سازی انرژی ساختارهای پیش‌بینی شده

ساختار پروتئین‌ها و پپتیدها با استفاده از سامانه YASARA (<https://www.yasara.org/minimizationserver.htm>) بهینه‌سازی انرژی شدند تا خطاهای موجود در مدل‌های انتخاب‌شده شناسایی و اصلاح گردد. مختصات ساختارهای سه‌بعدی پس از بهینه‌سازی انرژی در قالب فایل PDB ذخیره شدند. در توضیح عملکرد سرور YASARA باید گفت بهینه‌سازی انرژی ساختار با الگوریتم YASARA2 Force Field انجام می‌شود که ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و شبکه پیوندهای هیدروژنی را در نظر می‌گیرد تا انرژی کل ساختار را کمینه کند. در مرحله آماده‌سازی، حدود ۴۰ عملیات پاک‌سازی (اصلاح نام باقی‌مانده‌ها، حذف خطاها و تصحیح اتم‌ها) انجام می‌شود. سپس چرخش‌های جانبی اسیدهای آمینه با الگوریتم SCWRL پیش‌بینی می‌گردد. بهینه‌سازی اولیه با حلال ضمنی و الگوریتم Steepest Descent انجام می‌شود. پس از آن، شبکه پیوندهای هیدروژنی با ابزار OptHyd و در حضور پوسته‌ای از مولکول‌های آب بازسازی می‌شود. پروتونه‌شدن خودکار برای pH=7.4 تنظیم و سپس با ترکیب روش‌های Steepest Descent و Simulated Annealing، ساختار به حداقل انرژی موضعی می‌رسد. فرآیند زمانی متوقف می‌شود که بهبود انرژی کمتر از ۰.۰۵ kJ/mol per atom در ۲۰۰ گام باشد. خروجی شامل نمره Z و انرژی نهایی است که کیفیت و شباهت ساختار به داده‌های بلوری را نشان می‌دهد و ساختاری بهینه برای مطالعات بعدی فراهم می‌کند.

۲,۳ مطالعه داکینگ پروتئین

برای داکینگ هفت پپتید از ۱۲ پپتید (بر اساس سمیت، همولیتیک، خواص آنتی ژنیسیته) با پروتئین ACE2، از سامانه HPEPDOCK (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/>) استفاده شد. فایل های PDB پپتید و ACE2 برای انجام داکینگ به سامانه آپلود گردید. پس از تحلیل نتایج داکینگ هفت کمپلکس پپتید - ACE2، سه پپتید (شماره های ۶، ۷ و ۱۲) بر اساس اسیدهای آمینه دخیل در نواحی برهمکنش کووید-۱۹ سویه اومیکرون با ACE2 انتخاب شدند (Yin et al., 2022; Han et al., 2022; Lan et al., 2022).

۳. نتایج

تجزیه و تحلیل جامعی از دوازده پپتید از نظر خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی آنها، از جمله پیش بینی سمیت، فعالیت همولیتیک، پتانسیل التهابی، شاخص ناپایداری، آبگریزی، آبدوستی، نیمه عمر، بار خالص، نقطه ایزوالکتریک و پیش بینی آنتی ژنیسیته ارائه می دهد.

پیش‌بینی شد که همه پپتیدهای مورد تجزیه و تحلیل غیررسمی و غیر همولیتیک هستند، به استثنای پپتیدهای ۱۰ (LLGTILGLLKGL) و ۱۱ (GLFDIIKKIAESF) که فعالیت همولیتیک نشان دادند. هیچ یک از پپتیدها پاسخ التهابی مثبت نشان ندادند، که نشان‌دهنده ویژگی‌های غیرالتهابی در کل مجموعه داده‌ها است. مقادیر شاخص ناپایداری در بین پپتیدها به طور قابل توجهی متفاوت بود، از ۵۴- تا ۱۱۱,۷۲، که نشان‌دهنده پروفایل‌های پایداری متفاوت است. پپتیدهایی با مقادیر شاخص ناپایداری زیر ۴۰ عموماً پایدار در نظر گرفته می‌شوند، در حالی که مقادیر بالاتر نشان‌دهنده ناپایداری بالقوه در شرایط فیزیولوژیکی هستند. در مورد آگریزی و آبدوستی، پپتیدها پروفایل‌های متنوعی را نشان دادند که منعکس‌کننده ترکیبات اسید آمینه متغیر آنها است. پپتیدهایی با مقادیر آگریزی بالاتر (به عنوان مثال، پپتیدهای ۹ و ۱۰) احتمالاً برهمکنش‌های غشایی قوی‌تری از خود نشان می‌دهند که ممکن است بر فعالیت بیولوژیکی و پتانسیل نفوذ سلولی آنها تأثیر بگذارد. پیش‌بینی‌های نیمه عمر، که در سلول‌های مخمر تخمین زده شده است، از ۲ دقیقه تا ۲۰ ساعت متغیر است که نشان‌دهنده تنوع قابل توجه در پایداری پپتید در محیط‌های بیولوژیکی است. پپتیدهای ۷ و ۱۱ به طور قابل توجهی نیمه عمر طولانی‌تری (۲۰ ساعت) نشان دادند که نشان‌دهنده مقاومت نسبی آنها در برابر تخریب است. بار خالص پپتیدها از ۲,۰۰- تا ۵,۰۰+ متغیر بود، در حالی که نقاط ایزوالکتریک از ۳,۶۷ تا ۱۲,۳۱ متغیر بود که نشان‌دهنده تفاوت در ترکیب باقیمانده یونیزه شونده و رفتار بالقوه در محیط‌های با pH متغیر است. در نهایت، مقادیر پیش‌بینی آنتی‌ژنیسیته نشان داد که پیش‌بینی می‌شود فقط پپتیدهای ۱ تا ۳ دارای خواص آنتی‌ژنی بالقوه باشند، در حالی که پپتیدهای باقیمانده غیر آنتی‌ژنی بودند. این نشان می‌دهد که بعید است اکثر پپتیدهای مورد تجزیه و تحلیل، پاسخ‌های ایمنی را ایجاد کنند و از زیست‌سازگاری بالقوه آنها پشتیبانی می‌کند. به طور کلی، ارزیابی فیزیوشیمیایی و ایمونولوژیکی ارائه شده در جدول ۲ نشان می‌دهد که اکثر پپتیدها دارای پروفایل‌های ایمنی مطلوبی هستند که با عدم سمیت، ماهیت غیرالتهابی و پایداری معقول، با ویژگی‌های آگریز متغیر و پتانسیل آنتی‌ژنی حداقلی مشخص می‌شوند.

۳,۱ تحلیل داکینگ مولکولی

داکینگ پروتئین-پپتید یک رویکرد مدل‌سازی مولکولی است که با استفاده از الگوریتم‌ها و تکنیک‌های محاسباتی، پیش‌بینی می‌کند دو مولکول چگونه در طول تشکیل کمپلکس با یکدیگر تعامل کرده و جهت‌گیری می‌یابند. نتایج هفت کمپلکس پپتید و ACE2، شامل کمترین انرژی هر مدل و باقی‌مانده‌های آمینواسیدی متناظر، در جدول S1 و شکل S1 فایل اطلاعات تکمیلی ارائه شده است. قابل توجه است که انتخاب سه پپتید از میان هفت نامزد، بر اساس برهم‌کنش‌های محلی آنها صورت گرفته است.

جدول ۲- بررسی پپتیدهای آنالیز شده از نظر سمیت ، فعالیت همولیتیکی ، خاصیت التهابی، شاخص ناپایداری ، هیدروفوبیسیتی ، هیدروفیلیسیتی ، نیمه عمر ، بار PH ایزوالکتریک ، خاصیت آنتی ژنی.

Table 2 -Study of analyzed peptides in terms of toxicity, hemolytic activity, inflammatory properties, instability index, hydrophobicity, hydrophilicity, half-life, isoelectric charge, and antigenic properties.

Antigenicity prediction	Isoelectric pH	Charge بار	Half-life نیمه عمر	Hydrophobicity Hydrophilicity	Instability index شاخص ناپایداری	Inflammatory prediction پیش بینی التهابی	Hemolytic activity فعالیت همولیتیک	Toxicity prediction پیش بینی سمیت	Molecular weight وزن مولکولی	Sequences توالی	Number شماره
1	4.21	-1.00	3دقیقه (مخمر، درون زی)	-0.23 / -0.89	37.91	منفی	غیر همولیتیک	غیر رسمی	1754.08	NTDGSTDYGILQINSR	1
1	9.91	5.00	3دقیقه (مخمر، درون زی)	-0.18 / -0.16	27.08	منفی	غیر همولیتیک	غیر رسمی	2637.53	KLKNFAKGVAQSLLNKASCKLSGQC	2
1	1-02	2.00	3دقیقه (مخمر، درون زی)	0.10 / 0.98	-0.54	منفی	غیر همولیتیک	غیر رسمی	1585.22	FLKPLFNAALKLLP	3
0	4.54	-1.00	30دقیقه (مخمر، درون زی)	-0.63 / -2.24	111.72	منفی	غیر همولیتیک	غیر رسمی	673.79	ELQER	4
0	11.01	2.00	30دقیقه (مخمر، درون زی)	-0.13 / 0.56	66.41	منفی	غیر همولیتیک	غیر رسمی	810.15	IPALLKR	5
0	4.38	-1.00	30دقیقه (مخمر، درون زی)	-0.32 / -0.71	75.62	منفی	غیر همولیتیک	غیر رسمی	1320.66	ELQACQQVMDR	6

Antigenicity prediction	Isoelectric pH	Charge	Half-life	Hydrophobicity	Instability index	Inflammatory prediction	Hemolytic activity	Toxicity prediction	Molecular weight	Sequences	Number
پیش بینی آنتی ژنیسیته	pH ایزوالکتریک	بار	نیمه عمر 20 ساعت (مخمر، درون زی)	هیدروفوبیسیته هیدروفیلیسیته	شاخص ناپایداری	پیش بینی التهابی	فعالیت همولیتیک	پیش بینی سمیت	وزن مولکولی	توالی	شماره
0	8.60	1.00	20 ساعت (مخمر، درون زی)	-0.12 / 0.20	53.68	منفی	غیر همولیتیک	غیر رسمی	1400.86	AQQLAAQLPAMCR	7
0	3.67	-2.00	3 دقیقه (مخمر، درون زی)	-0.06 / -0.15	37.82	منفی	غیر همولیتیک	غیر رسمی	1047.24	LEGGDALSASQ	8
0	10.11	1.00	3 دقیقه (مخمر، درون زی)	0.15 / 1.58	57.32	منفی	غیر همولیتیک	غیر رسمی	1242.70	FLPVLAGVLSRA	9
0	9.11	1.00	3 دقیقه (مخمر، درون زی)	0.26 / 1.79	3.99	منفی	همولیتیک	غیر رسمی	1210.78	LLGTILGLLKGL	10
0	6.42	0.00	20 ساعت (مخمر، درون زی)	0.04 / 0.67	20.48	منفی	همولیتیک	غیر رسمی	1480.96	GLFDIIKKIAESF	11
0	12.31	5.00	2 دقیقه (مخمر، درون زی)	-0.59 / -1.94	105.52	منفی	غیر همولیتیک	غیر رسمی	1545.05	RRWQWRMKKLG	12

۳,۲ نتایج مطالعه داکینگ مولکولی بر روی کمپلکس‌های پپتید (۶، ۷، ۱۲) و پروتئین ACE2

شبیه‌سازی‌های داکینگ مولکولی و تحلیل‌های ساختاری با استفاده از سامانه PDBSUM انجام شد تا الگوی اتصال و ماهیت برهم‌کنش‌های مولکولی بین پپتیدهای نامزد (پپتیدهای ۶، ۷ و ۱۲) و پروتئین ACE2 به‌طور دقیق مشخص شود. نمودارهای برهم‌کنش که شامل باقی‌مانده‌های کلیدی آمینواسیدی و نوع نیروهای بین‌مولکولی هستند، در شکل S1 فایل اطلاعات تکمیلی ارائه شده‌اند و جدول ۳ نتایج سه پپتید انتخاب‌شده را نشان می‌دهد.

تحلیل PDBSUM پپتید ۶ (شکل S1A) اتصال آن به پروتئین هدف را تأیید کرد. نمودار شماتیک نشان می‌دهد که ۱۶ باقی‌مانده آمینواسیدی از ACE2 در برهم‌کنش با پپتید ۶ شرکت دارند. باقی‌مانده‌های کلیدی شامل Bgl1^۲, Tyr50, Met62, Gly66, Trp69, Gln102, Pro346, Thr347, Ala348, Trp349, Hsd378, Asp382, Tyr385, Phe390, Arg393 و Asn394 هستند. این کمپلکس از طریق ۱۰۷ تماس غیرکوالانسی، سه پیوند هیدروژنی و یک برهم‌کنش هیدروفوبیک تثبیت می‌شود.

بر اساس تحلیل PDBSUM پپتید ۷ (شکل S1B)، پروفایل اتصال متمایزی برای ACE2 مشاهده شد. نمودار شماتیک نشان می‌دهد که ۲۲ باقی‌مانده آمینواسیدی از ACE2 با پپتید ۷ در ارتباط هستند. باقی‌مانده‌های کلیدی ACE2 شامل Bgl1, Gln81, Leu85, Gln98, Gln101, Gln102, Asn103, Tyr196, Tyr202, Asp206, Leu370, Thr371, Hsd374, Glu375, Glu398, Glu402, Glu406, Ser409, Asn508, Asp509, Tyr510 و Arg514 بودند. این کمپلکس با ۱۸۲ تماس غیرکوالانسی، ۱۱ پیوند هیدروژنی و یک برهم‌کنش هیدروفوبیک تثبیت شد.

تحلیل PDBSUM پپتید ۱۲ (شکل S1C) نشان داد که این پپتید الگوی برهم‌کنش متمایزی با ACE2 دارد. نمودار شماتیک نشان می‌دهد که ۲۴ باقی‌مانده از ACE2 در رابط اتصال با پپتید ۱۲ دخیل هستند. باقی‌مانده‌های کلیدی شامل Bgl1, Phe40, Ser43, Ser44, Trp69, Ser70, Gln98, Gln101, Gln102, Asn103, Tyr196, Tyr202, Trp203, Asp206, Ala348, Trp349, Asp350, Asp382, Ala386, Arg393, Asn394, Glu398, Arg514 و Asn508 می‌باشند. این برهم‌کنش عمدتاً با ۲۵۳ تماس غیرکوالانسی، سه برهم‌کنش هیدروفوبیک و چهار پیوند هیدروژنی تثبیت می‌شود. علاوه بر این، انرژی اتصال پپتیدهای ۶، ۷ و ۱۲ به‌ترتیب برابر با -162.863، -201.895 و -۲۴۶,۵۱۰- گزارش شد.

² 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose

جدول ۳. انرژی‌های باقی‌مانده‌های آمینواسیدی درگیر در برهم‌کنش سه پپتید انتخاب‌شده با پروتئین ACE2، بر اساس نتایج سرور اتصال و HPEPDOCK

Table 3- Energies of amino acid residues involved in the interaction of three selected peptides with the ACE2 protein, based on the results of the docking server and HPEPDOCK.

Docking score	Amino acid residues of the peptide involved in interaction with ACE2	ACE2 amino acid residues involved in peptide interaction	Sequences	Peptide number
نمره داکینگ	باقی‌مانده‌های آمینواسیدی پپتید درگیر در برهم‌کنش با ACE2	باقی‌مانده‌های آمینواسیدی ACE2 درگیر در برهم‌کنش با پپتید	توالی	شماره پپتید
-162.863	Glu1, Leu2, Ala4, Cys5, Gln6, Gln7, Val8, Met9, Asp10, Arg11	Bgl1, Tyr50, Met62, Gly66, Trp69, Gln102, Pro346, Thr347, Ala348, Trp349, Hsd378, Asp382, Tyr385, Phe390, Arg393, Asn394	ELQACQQVMDR	6
-201.895	Ala1, Gln2, Gln3, Leu4, Ala5, Ala6, Gln7, Leu8, Pro9, Met11, Cys12, Arg13	Bgl1, Gln81, Leu85, Gln98, Gln101, Gln102, Asn103, Tyr196, Tyr202, Asp206, Leu370, Thr371, Hsd374, Glu375, Glu398, Glu402, Glu406, Ser409, Asn508, Asp509, Tyr510, Arg514	AQQLAAQLPAMCR	7
-246.510	Arg1, Arg2, Trp3, Gln4, Trp5, Arg6, Met7, Lys8, Lys9, Leu10, Gly11	Bgl1, Phe40, Ser43, Ser44, Trp69, Ser70, Gln98, Gln101, Gln102, Asn103, Tyr196, Tyr202, Trp203, Asp206, Ala348, Trp349, Asp350, Asp382, Ala386, Arg393, Asn394, Glu398, Arg514, Asn508	RRWQWRMKKLG	12

۴. بحث

نتایج این مطالعه به‌طور موفقیت‌آمیز پتانسیل قابل توجه برخی پپتیدهای مشتق از منابع حیوانی، به ویژه ELQACQQVMDR (پپتید ۶)، AQQLAAQLPAMCR (پپتید ۷) و RRWQWRMKKLG (پپتید ۱۲)، را به‌عنوان لیگاندی با میل اتصال بالا به گیرنده ACE2 نشان می‌دهد. میل اتصال بالای پپتید ۱۲، که با نمره داکینگ بسیار پایین آن (۵۱۰، ۲۴۶-) مشخص می‌شود، آن را به نامزدی قوی برای تحقیقات بیشتر تبدیل کرده است.

فورلوند و همکاران در سال ۲۰۱۳ پپتید ۱۲ را از ناحیه ۱۷ تا ۴۱ لاکتوفرین به دست آوردند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ناحیه-N ترمینال لاکتوفرین، به‌ویژه پپتید حاصل از باقی‌مانده‌های ۱۷ تا ۴۱، دارای بار مثبت بوده و توانایی اتصال به پروتئوگلیکان‌های سولفات هپاران (HSPGs) را دارد. این اتصال موجب مسدود شدن تعامل ویروس SARS-CoV-2 با گیرنده‌های HSPGs و در نتیجه کاهش چسبندگی و ورود ویروس به سلول میزبان می‌شود. در مطالعه ما نیز اثر این پپتید بر روی گونه آمیکرون بررسی شد و نتایج نشان داد که پیش بینی می‌شود که این پپتید بتواند به‌طور قابل توجهی اتصال ویروس آمیکرون را مهار کند (Hu et al., 2019).

آسوده و همکاران در سال ۲۰۱۴ پپتیدهای شماره ۶ و ۷ را از هیدرولیز تریپسین پروتئین گلوتن گندم با استفاده از تکنیک‌های بیوانفورماتیکی بدست آوردند و اثر مهارتی آن را بر علیه ACE۱ مورد بررسی قرار دادند (Asoodeh et al., 2014). آنها گزارش کردند که پپتید شماره ۷ دارای اثر محاری قوی بر علیه ACE۱ است. در مطالعه ما نیز این

پپتیدها با اسیدهای آمینه ای وارد برهمکنش گردیدند که در محدوده ناحیه اتصال ACE2 با RBD سویه اومیکرون قرار داشتند. در مورد پپتید ۶، هیچ گزارشی درباره اثر مهاري آن گزارش نداده اند، اما در مطالعه ما مشخص شد که پپتید شماره ۶ با اسیدهای آمینه ای که با RBD سویه اومیکرون اتصال برقرار میکنند، برهمکنش دارند. این مطالعه تمرکز را از مکانیزم‌های ضد میکروبی گسترده به یک رویکرد هدفمند و مسدودکننده گیرنده^۳ منتقل کرده است که یک استراتژی ضدویروسی خاص‌تر محسوب می‌شود. مکانیزم پیشنهادی این پژوهش، مهار رقابتی محل اتصال پروتئین اسپایک، کووید-۱۹ سویه اومیکرون به مکانیزم مهارکننده‌های پپتیدی شناخته‌شده‌ای مانند پپتید مهندسی‌شده مشتق از ACE2 به نام SBP1 یا مینی پروتئین LCB1 شباهت دارد، که نشان داده شده با پوشاندن رابط دامنه اتصال گیرنده، ویروس را به‌طور مؤثر خنثی می‌کند (L. Cao et al., 2020).

نکته مهمی که باید مورد توجه قرار گیرد، پروفایل برهم‌کنش‌هاست. تحلیل PDBSUM پپتید ۱۲ نشان داد که این پپتید با باقی‌مانده‌های کلیدی ACE2 مانند Asp206, Tyr202, Gln98, Phe40 و Arg514 تعامل دارد. این یافته اهمیت بالایی دارد زیرا این باقی‌مانده‌ها بخشی از خوشه نقاط بحرانی هستند که رابط اتصال با دامنه RBD ویروس کووید-۱۹ سویه اومیکرون را تشکیل می‌دهند. به‌عنوان مثال، Gln98 و Asp206 به‌طور مستقیم در تشکیل پیوند هیدروژنی با پروتئین اسپایک ویروس دخیل هستند. توانایی پپتید ۱۲ در درگیر کردن این باقی‌مانده‌های خاص نشان می‌دهد که مکانیزمی ممکن است به‌طور مستقیم مانع اتصال ویروس شود و عملکرد آن مشابه آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده با میل اتصال بالا یا داروهای مهندسی‌شده است. به‌طور مشابه، شبکه گسترده ۱۱ پیوند هیدروژنی پپتید ۷ نشان‌دهنده یک برهم‌کنش بسیار پایدار است که می‌تواند منجر به زمان ماندگاری طولانی‌تر و مهار مؤثرتر در شرایط درون‌زی شود.

علاوه بر این، طبیعت غیرهمولیتیک و غیرسمی پپتیدهای انتخاب‌شده، همان‌طور که توسط ابزارهای زیست‌اطلاعاتی پیش‌بینی شده، یک چالش کلیدی در درمان‌های پپتیدی را برطرف می‌کند. این ویژگی در مقابل برخی پپتیدهای کاتیونی ضد میکروبی است که اگرچه مؤثرند، اما اغلب به دلیل سمیت سلولی محدودیت دارند. موفقیت پپتید ۱۲، که یک پپتید کاتیونی با بار +۵ است و پیش‌بینی شده غیرهمولیتیک باشد و دارای بیشترین تعداد اتصال با اسیدهای آمینه دخیل در برهم‌کنش با RBD و حاوی قویترین انرژی اتصال ACE2 است، بسیار امیدوارکننده است. این یافته نشان می‌دهد که بار الکترواستاتیک آن برای برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک خاص با سطح ACE2 استفاده می‌شود و نه برای تخریب غیرخاص غشای سلول‌های پستانداران (Fjell et al., 2012; Mahlapuu et al., 2016).

۵. نتیجه‌گیری

در پایان این پژوهش یک بستر محاسباتی مقدماتی برای شناسایی پپتیدهای مشتق از منابع حیوانی با پتانسیل مهارکنندگی نقطه‌ای علیه گیرنده ACE2 ارائه می‌دهد. نتایج داکینگ مولکولی نشان می‌دهند که پپتیدهای منتخب، به‌ویژه پپتید ۱۲ ممکن است با میل اتصال و پایداری مطلوب به بقایای کلیدی ACE2 برهم‌کنش داشته باشند، اما صحت این نتایج وابسته به تأیید آزمایشگاهی و شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی تکمیلی است. با توجه به ماهیت صرفاً محاسباتی مطالعه حاضر و محدودیت‌های روش داکینگ (نظیر دقت حدود ۶۰ تا ۷۵ درصد، مدل‌سازی استاتیک و عدم لحاظ کامل انعطاف ساختاری پروتئین و پپتید)، نمی‌توان با قطعیت اظهار داشت که این پپتیدها قابلیت درمانی دارند و صرفاً می‌توان آن‌ها را به عنوان کاندیداهای امیدبخش برای بررسی‌های تجربی پیشنهاد کرد. انجام مطالعات سلولی و آزمایش‌های عملکردی

³ Receptor

ضروری است تا امکان کاربرد درمانی این پپتیدها برای مقابله با کووید-۱۹ سویه آمیکرون و دیگر بیماری‌های وابسته به ACE2 به طور معتبر روشن شود.

References

1. Asoodeh, A., Haghighi, L., Chamani, J., Ansari-Ogholbeyk, M. A., Mojallal-Tabatabaei, Z., & Lagzian, M. (2014). Potential angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from gluten hydrolysate: Biochemical characterization and molecular docking study. *Journal of Cereal Science*, 60(1), 92–98.
2. Asoodeh, A., Zardini, H. Z., & Chamani, J. (2012). Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (*Rana ridibunda*). *Journal of Peptide Science*, 18(1), 10–16.
3. Biswas, S., Mahmud, S., Mita, M. A., Afrose, S., Hasan, M. R., Sultana Shimu, M. S., Saleh, M. A., Mostafa-Hedeab, G., Alqarni, M., & Obaidullah, A. J. (2022). Molecular docking and dynamics studies to explore effective inhibitory peptides against the spike receptor binding domain of SARS-CoV-2. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 791642.
4. Cao, J.-F., Gong, Y., Wu, M., Xiong, L., Chen, S., Huang, H., Zhou, X., Peng, Y., Shen, X., & Qu, J. (2022). Molecular docking and molecular dynamics study Lianhua Qingwen granules (LHQW) treats COVID-19 by inhibiting inflammatory response and regulating cell survival. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1044770.
5. Cao, L., Goreshnik, I., Coventry, B., Case, J. B., Miller, L., Kozodoy, L., Chen, R. E., Carter, L., Walls, A. C., & Park, Y.-J. (2020). De novo design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors. *Science*, 370(6515), 426–431.
6. Chan, K. K., Dorosky, D., Sharma, P., Abbasi, S. A., Dye, J. M., Kranz, D. M., Herbert, A. S., & Procko, E. (2020). Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. *Science*, 369(6508), 1261–1265.
7. Festa, M., Sansone, C., Brunet, C., Crocetta, F., Di Paola, L., Lombardo, M., Bruno, A., Noonan, D. M., & Albini, A. (2020). Cardiovascular active peptides of marine origin with ACE inhibitory activities: Potential role as anti-hypertensive drugs and in prevention of SARS-CoV-2 infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8364.
8. Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(1), 37–51.
9. Furlund, C. B., Ulleberg, E. K., Devold, T. G., Flengsrud, R., Jacobsen, M., Sekse, C., Holm, H., & Vegarud, G. E. (2013). Identification of lactoferrin peptides generated by digestion with human gastrointestinal enzymes. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 75–88.
10. Ghavami, S., Asoodeh, A., Klonisch, T., Halayko, A. J., Kadkhoda, K., Krocak, T. J., Gibson, S. B., Booy, E. P., Naderi-Manesh, H., & Los, M. (2008). Brevinin-2R1 semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(3), 1005–1022.
11. Gheblawi, M., Wang, K., Viveiros, A., Nguyen, Q., Zhong, J.-C., Turner, A. J., Raizada, M. K., Grant, M. B., & Oudit, G. Y. (2020). Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-12.

- CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2. *Circulation Research*, 126(10), 1456–1474.
13. Han, P., Li, L., Liu, S., Wang, Q., Zhang, D., Xu, Z., Han, P., Li, X., Peng, Q., Su, C., Huang, B., Li, D., Zhang, R., Tian, M., Fu, L., Gao, Y., Zhao, X., Liu, K., Qi, J., Gao, G. F., ... Wang, P. (2022). Receptor binding and complex structures of human ACE2 to spike RBD from omicron and delta SARS-CoV-2. *Cell*, 185(4), 630–640.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.001>
 14. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., & Nitsche, A. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.
 15. Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., & Leong-Poi, H. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, 436(7047), 112–116.
 16. Kong, X., Wang, W., Zhong, Y., Wang, N., Bai, K., Wu, Y., Qi, Q., Zhang, Y., Liu, X., & Xie, J. (2024). Recent advances in the exploration and discovery of SARS-CoV-2 inhibitory peptides from edible animal proteins. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1346510.
 17. Lan, J., He, X., Ren, Y., Wang, Z., Zhou, H., Fan, S., Zhu, C., Liu, D., Shao, B., Liu, T. Y., Wang, Q., Zhang, L., Ge, J., Wang, T., & Wang, X. (2022). Structural insights into the SARS-CoV-2 Omicron RBD-ACE2 interaction. *Cell research*, 32(6), 593–595. <https://doi.org/10.1038/s41422-022-00644-8>
 18. Li, L., Wang, R., He, L., Guo, H., Fu, L., Wang, G., Wang, J., Chen, Z., Peng, X., & Lu, X. (2024). Evaluation of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Expression In Vivo with Novel 68Ga-Labeled Peptides Originated from the Coronavirus Receptor-Binding Domain. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 7(10), 3119–3130.
 19. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 194.
 20. Memarpoor-Yazdi, M., Asoodeh, A., & Chamani, J. (2012). Structure and ACE-inhibitory activity of peptides derived from hen egg white lysozyme. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 18(4), 353–360.
 21. Monteil, V., Kwon, H., Prado, P., Hagelkrüys, A., Wimmer, R. A., Stahl, M., Leopoldi, A., Garreta, E., Del Pozo, C. H., & Prosper, F. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. *Cell*, 181(4), 905–913.
 22. Moroy, G., & Tuffery, P. (2022). Peptide-based strategies against SARS-CoV-2 attack: An updated in silico perspective. *Frontiers in Drug Discovery*, 2, 899477.
 23. Sadremomtaz, A., Al-Dahmani, Z. M., Ruiz-Moreno, A. J., Monti, A., Wang, C., Azad, T., Bell, J. C., Doti, N., Velasco-Velázquez, M. A., & de Jong, D. (2021). Synthetic peptides that antagonize the angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2) interaction with SARS-CoV-2 receptor binding spike protein. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(4), 2836–2847.
 24. Sharma, G., Kumar, N., Sharma, C. S., Alqahtani, T., Tiruneh, Y. K., Sultana, S., Rolim Silva, G. V., de Lima Menezes, G., Zaki, M. E. A., & Nobre Oliveira, J. I. (2025). 25. Identification of promising SARS-CoV-2 main protease inhibitor through molecular

- docking, dynamics simulation, and ADMET analysis. *Scientific Reports*, 15(1), 2830.
26. Uwamahoro, H., Collier, W. E., Nashar, T. O., Jaynes, J. M., Mortley, D. G., Davis, C. G., Kanyairita, G. G., Abdelazim, E. F., Igiramaboko, J. F. R., & Habineza, C. (2025). Natural and Designed Cyclic Peptides as Potential Antiviral Drugs to Combat Future Coronavirus Outbreaks. *Molecules*, 30(8), 1651.
27. Yin, W., Xu, Y., Xu, P., Cao, X., Wu, C., Gu, C., He, X., Wang, X., Huang, S., Yuan, Q., Wu, K., Hu, W., Huang, Z., Liu, J., Wang, Z., Jia, F., Xia, K., Liu, P., Wang, X., Song, B., ... Xu, H. E. (2022). Structures of the Omicron spike trimer with ACE2 and an anti-Omicron antibody. *Science* (New York, N.Y.), 375(6584), 1048–1053. <https://doi.org/10.1126/science.abn8863>
28. Zhao, H., To, K. K.-W., Lam, H., Zhang, C., Peng, Z., Meng, X., Wang, X., Zhang, A. J., Yan, B., & Cai, J. (2022). A trifunctional peptide broadly inhibits SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants in hamsters. *Cell Discovery*, 8(1), 62.