

SCREENING VIRTUAL DE DROGAS APROVADAS PELA FDA FRENTE A PROTEASE PRINCIPAL MPRO DA COVID-19

Bernardino Joaquim Caluaco¹
Aluisio Marques Da Fonseca²

RESUMO

A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) causada pelo coronavírus (SARS-CoV-2) é uma infecção viral recente com demanda de pesquisas. Mesmo não tendo havido muitas evidências científicas e ensaios clínicos que indicassem possíveis terapias com resultados em pacientes suspeitos ou confirmados, algumas drogas (antimaláricos, antimicrobianos, corticosteroides antivirais, anticoagulantes e soro convalescente) foram usadas e estudadas durante a pandemia do Covid-19 para conter a propagação do vírus e sintomas. Neste sentido, estabeleceu-se esse projeto objetivando a realização de uma triagem virtual de 2108 medicamentos essenciais conhecidos amplamente e utilizados pela população a fim de avaliar a sua possível capacidade inibitória frente à protease principal (Mpro) do Covid-19. Os ligantes usados no screening virtual por acoplamento molecular foram todas as drogas (até a data da seleção) registradas pela FDA (Food and Drug Administration), disponíveis no repositório da biblioteca virtual (ZINC15). O screening foi realizado em associação do pacote computacional AutoDock tools, aplicando uma sequência de diferentes filtros, como da similaridade, regra de 5 de Lipinski, farmacofóricos e acoplamento, por meio do Raccoon e AutoDock Vina, com seu algoritmo de modelo genético lamarkiano (GA), combinado com a estimativa de energia baseada em grade, em conformação rígida e flexível. Cumprida a metodologia proposta, chegou-se aos resultados de energias de interação (Energia Livre de Gibbs) e aos valores de desvio médio quadrado de rotação (RMSD, "Root Mean Square Deviation") das 2108 drogas. Dentre todas, cinco drogas se mostraram promissoras para os objetivos deste projeto: Ergotamina (-9,9 Kcal.mol⁻¹/RMSD de 2,00Å), diidroergotamina (-9,8 Kcal.mol⁻¹/RMSD de 1,46Å), olisio (-9,5 Kcal.mol⁻¹/RMSD de 1,50Å), tripano blue (-9,3 Kcal.mol⁻¹/RMSD de 1,40Å), irinotecano (-9,2 Kcal.mol⁻¹/RMSD de 2,00Å). Com base nestes resultados, se pode afirmar que a Ergotamina apresentou as melhores interações com a Mpro protease da Covid-19 pelo estudo in-silico, sendo uma candidata promissora no tratamento da Covid-19.

Palavras-chave: receptor; ligante; acoplamento molecular; triagem virtual; coronavírus; covid-19.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza - ICEN, Discente, bernardinocaluaco@aluno.unilab.edu.br¹

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidades e Tecnologias Sustentáveis - MASTS, Docente, aluisiomf@unilab.edu.br²

INTRODUÇÃO

O coronavírus é um vírus zoonótico pertencente à família Coronaviridae que causa infecções respiratórias em diversos animais, incluindo aves e mamíferos. Em humanos, o novo Coronavírus, denominado SARS-CoV-2, é o agente etiológico responsável pelo surto de pneumonia viral e um patógeno essencial por atacar principalmente o sistema respiratório humano causando a Síndrome Respiratória Aguda (SARS)-CoV e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS)-CoV, que caracterizam situações de saúde pública de grande preocupação devido ao potencial de surto da doença (BOGOCH et al., 2020; LU; STRATTON; TANG, 2020; ROTHAN; BYRAREDDY, 2020; ZHOU et al., 2020).

Até o início da pesquisa, apesar da urgência, ainda não havia vacina ou antiviral para tratar o novo coronavírus (WU et al., 2020), por isso havia demanda por tratamentos à base de retrovirais já conhecidos de forma eficiente contra vírus do mesmo gênero que o SARS-CoV-2 (WANG et al., 2020). Entre as classes terapêuticas empregadas, sob orientação médica ou não médica, estão antimicrobianos, antivirais, corticosteróides, anticoagulantes, soro convalescente e antimaláricos (LEDFOORD, 2020). O uso dos antimaláricos como a cloroquina e hidroxicloroquina tem causado muitas discussões no meio científico. Ainda não há estudos que comprovem sua eficácia, e seu uso pode estar associado a complicações cardiovasculares graves. Sem comprovação científica para seu uso rotineiro, esses medicamentos ainda carecem de mais investigação (MENEZES; SANCHES; CHEQUER, 2020; WANG et al., 2020).

Visando formulações únicas, novas indicações e a "redescoberta" de medicamentos já aprovados, surgiu a ideia de redefinir ou resgatar medicamentos antigos com reconhecidos recordes de eficácia e segurança pelo FDA. Esse movimento tem crescido ultimamente e tem sido chamado de: "Velhas drogas são novas de novo" ou "velhas drogas, novos usos" (ARONSON, 2007; HAHN, 2011).

Os métodos de desenvolvimento de medicamentos auxiliados por computador têm se mostrado úteis nos estágios iniciais da pesquisa de novas terapias farmacológicas. Seja como ferramenta de prospecção de novos ligantes ou mesmo de novos usos para os já conhecidos ligantes. O uso de técnicas de docking molecular (MD), aplicadas a imensas bibliotecas de ligantes (como ZINC15 e ChEMBL, entre outras), permite a triagem ou screening virtual (VS) de ligantes e, assim, reduz a necessidade de síntese química e análise in vitro de cada análogo de um protótipo-composto de forma automatizada (HTS), o que implica em significativa redução de tempo e custos aos centros de pesquisa (SLIWOSKI ET AL, 2014).

Para descobrir rapidamente a eficácia de novos medicamentos e levá-los para uso clínico, começou uma corrida contra o tempo em todo o mundo para descobrir inibidores eficazes contra a principal proteína do coronavírus, a protease (Mpro). A Mpro é uma enzima crucial para o SARS-CoV-2, pois desempenha um papel fundamental na mediação da replicação e transcrição viral, tornando-a um alvo atraente para esse vírus (CHEN et al., 2020; CUI; LI; SHI, 2019).

O MolAICalD é um código derivado do Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010) e está no pacote computacional do MolAICal (BAI et al., 2021). Utiliza a mesma licença do Autodock Vina, pode realizar o docking molecular e é considerado um software de acoplamento molecular de código aberto estudado e aplicado na área de descoberta de fármacos. Diversos dockings realizados pelo MolAICalD, entre outros softwares, estão sendo utilizados na pesquisa de inibidores de doenças negligenciadas como Dengue, doença de Chagas, leishmaniose, entre outras, na busca de novos candidatos a fármacos baseado no conhecimento da química dos produtos naturais, no entendimento da estrutura do protótipo (DIAS et al., 2013).

A triagem virtual (VS) é um método computacional usado na descoberta de drogas para encontrar pequenas moléculas potenciais com probabilidade de se ligarem ao alvo da droga, tipicamente uma proteína ou receptor de DNA, etc. A VS contém triagem virtual baseada em ligantes e estrutura (RESTER, 2008). O rastreamento virtual baseado em estrutura envolve acoplamento molecular que busca boas poses de ligação

de ligantes na proteína-alvo, seguido por uma função de pontuação para estimar a capacidade de afinidade entre ligantes e receptores. O acoplamento molecular é provavelmente a teoria do modelo de chave e fechadura (ASHUTOSH; VYTAS, 2018).

METODOLOGIA

Obtenção e preparo dos ligantes

Os 2108 medicamentos da base de dados da FDA usados como ligantes na triagem virtual por docking molecular performance, foram obtidas na biblioteca virtual do ZINC15 (<https://zinc15.docking.org/>). Foram submetidos aos filtros de medicamentos com base na regra de Lipinski de 5 (BENET ET AL, 2016) (Ver Tabela 1S, em material suplementar). Em seguida, o dimensionamento e a otimização das estruturas foram realizados com o comando PREPARE_LIGAND4 do software AutoDock Tools (MORRIS et al., 2009), gerando-se estruturas 3D, adição de hidrogênios, correção de cargas, mistura de hidrogênios polares e configuração de estruturas de torção.

Obtenção e preparo do receptor

O receptor em estudo foi a estrutura da principal protease viral Mpro, que foi obtida no repositório Protein Data Bank (PDB) sob o código 6LU7. A estrutura cristalina desta proteína foi obtida por difração complexa de raios-x para um inibidor sintético N3 (JIN et al., 2020; KUMAR; SINGHC; PATEL, 2020). Para possibilitar o encaixe molecular, os resíduos interferentes, as moléculas de água e o inibidor sintético foram removidos (N3) e cocrystalizados no arquivo de estrutura 6LU7 original removido pelo software cliente Discovery Studio 2020 (BIOVIA, 2015). Em seguida, os ligantes foram separados e à proteína foram adicionados hidrogênios polares. Posteriormente, foram salvos no formato PDBQT para serem executados.

Docking molecular com MolAiCal no modo de triagem virtual

O screening virtual foi realizado mediante simulações de docking molecular implementadas no MolAiCAID, que usou o Algoritmo Genético Lamarckiano. A caixa da grade foi centralizada nas coordenadas $x = -10,711837$, $y = 12,411388$ e $z = 68,831286$, com um tamanho de $20\text{Å}(x)$, $20\text{Å}(y)$ e $20\text{Å}(z)$, e com espaçamento = 0,642 e exaustividade = 8.

Para obter um conjunto de dados mais extenso, para todas as simulações (docking e redocking), foram realizadas 50 simulações independentes, sendo possível obter 20 poses por simulação. O critério de exaustividade igual a 64 foi utilizado para melhorar o refinamento parcial dos cálculos de acoplamento individual (MARINHO et al., 2020). A estrutura da proteína foi mantida rígida enquanto todas as ligações e torções dos ligantes foram ajustadas para girar (NGUYEN et al., 2017).

Para validar as simulações, foi realizado o redocking no ligante cocrystalizado N3. Se estabeleceu como parâmetro de seleção, resultados com valores de RMSD (Root Mean Square Deviation) menores que 2Å (YUSUF et al., 2008), e energia de ligação (afinidade) menor que $-9,0\text{ kcal/mol}$ (HUANG et al., 2010; SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014).

Após as etapas de docking molecular, realizou-se o estudo de Dinâmica Molecular (MD) a partir das posições atômicas obtidas dos complexos receptor-ligante e os arquivos de topologia (extensão PSF). Ambos os arquivos foram obtidos usando o servidor CHARMM (<https://www.charmm-gui.org/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização do docking/redocking molecular, foi possível verificar a interação entre os ligantes e a protease Mpro, tanto a nível de energia como de aproximação; foram escolhidos os 4 melhores

ligantes: Ergotamina (-9,9 Kcal/mol e 2,00Å RMSD), diidroergotamina (-9,8 Kcal/mol e 1,46Å RMSD), olisio (-9,5 Kcal/mol e 1,50Å RMSD), tripano blue (-9,3 Kcal/mol e 1,40Å RMSD), irinotecano (-9,2 Kcal/mol e 2,00Å RMSD).

De acordo com os sítios de ancoragem de triagem apresentados entre as drogas, o receptor foi dividido em duas regiões ativas (regiões I e II). Atenção especial foi dada ao sítio específico do ligante sintético N3 (região I e provável sítio da proteína ativa com os domínios: S1', S1-S4), em sua estrutura cocrystalizada, onde os fármacos Ergotamina, Dihidroergotamina, Olysio, Trypan Blue e Irinotecan também ancoraram. O re-docking foi realizado para mostrar a eficácia do método no software utilizado. Assim, foram analisados os três principais fármacos que apresentaram melhores ligações ao alvo. O desvio entre o ligante e o receptor variou com RMSD de 1.4 a 2.0 Å. Os três ligantes também alcançaram um desvio padrão médio de interações próximo ao valor otimizado, pois o ideal deve estar entre 1.00 - 2.00 Å, dependendo do tamanho do ligante (HEVENER et al., 2009).

CONCLUSÕES

Com base na triagem realizada com os 2108 medicamentos populares, pode-se afirmar que a ergotamina, diidroergotamina, olysio, tripano blue e irinotecano apresentaram as melhores interações com a protease Mpro do COVID-19 pelo estudo in silico com o MolAiCALID com algoritmo de modelo Genético Lamarckiano (GA) combinado com a estimativa de energia baseada em grade em conformação rígida e flexível. Além disso, estudos de dinâmica molecular também foram realizados para verificar a estabilidade do complexo receptor-ligante formado por meio de análises de RMSD, RMSF, H-Bond, SASA e MMGBSA. Ressalta-se que novos estudos devem ser realizados, pois os dados aqui colhidos são meramente relativos a análises computacionais e precisam ser testados experimentalmente in vitro e in vivo para que essas hipóteses sejam comprovadas, e assim, drogas já conhecidas tenham novas aplicações como inibidores do Sars-Cov-2.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Unilab pelo financiamento desta pesquisa executada entre 01/10/2021 e 30/09/2022, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic).

REFERÊNCIAS

- ARONSON, J. K. Old drugs - New uses. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 64, n. 5, p. 563-565, 2007.
- ASHUTOSH, T.; VYTAS, A. B. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock. *Journal of Molecular Medicine and Clinical Applications*, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2018.
- BAI, Q. et al. MolAICal: a soft tool for 3D drug design of protein targets by artificial intelligence and classical algorithm. *Briefings in bioinformatics*, v. 22, n. 3, p. 1-12, 2021.
- BENET ET AL. BDDCS, the Rule of 5 and Drugability. *Adv Drug Deliv Rev*, p. 89-98, 2016.
- BIOVIA. Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modelling Environment, Release 4.5 Accelrys Software Inc. San Diego, 2015.
- BOGOCH, I. I. et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: Potential for international spread via

- commercial air travel. *Journal of Travel Medicine*, v. 27, n. 2, p. 1-3, 2020.
- CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 507-513, 2020.
- CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, p. 181-192, 2019.
- DIAS, L. C. et al. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. *Química Nova*, v. 36, n. 10, p. 1552-1556, 2013.
- HAHN, K. L. Old drugs are new again. *Pharmacy Times*, v. 77, n. 6, p. 159-166, 2011.
- HEVENER, K. E. et al. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 49, n. 2, p. 444-460, 2009.
- HUANG, H. J. et al. Current developments of computer-aided drug design. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 41, n. 6, p. 623-635, 2010.
- JIN, Z. et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, v. 582, n. 7811, p. 289-293, 2020.
- KUMAR, Y.; SINGHC, H.; PATEL, C. N. In silico prediction of potential inhibitors for the Main protease of SARS-CoV-2 using molecular. *Journal of Infection and Public Health*, n. JIPH-1385, p. 1-14, 2020.
- LEDFORD, H. Dozens of coronavirus drugs are in development - what happens next? *Nature*, v. 581, p. 247-248, 2020.
- LU, H.; STRATTON, C. W.; TANG, Y. W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *Journal of Medical Virology*, v. 92, p. 401-402, 2020.
- MARINHO, E. M. et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. *Microbial Pathogenesis*, v. 148, p. 104365, nov. 2020.
- MENEZES, C. R.; SANCHES, C.; CHEQUER, F. M. D. Efetividade e toxicidade da cloroquina e da hidroxicloroquina associada (ou não) à azitromicina para tratamento da COVID-19. O que sabemos até o momento? *Journal of Health & Biological Sciences*, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2020.
- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785-91, dez. 2009.
- NGUYEN, D. D. et al. Rigidity Strengthening: A Mechanism for Protein-Ligand Binding. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 57, n. 7, p. 1715-1721, 2017.
- RESTER, U. From virtuality to reality - Virtual screening in lead discovery and lead optimization: A medicinal chemistry perspective *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2008.
- ROTHAN, H. A.; BYRAREDDY, S. N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity*, v. 109, n. 102433, p. 1-4, 2020.
- SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 2014.
- SLIWOSKI ET AL. *Computational Methods in Drug Discovery*. *Pharmacol Rev*, v. 66, p. 334-395, 2014.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.
- WANG, M. et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research*, v. 30, p. 269-271, 2020.
- WU, D. et al. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 94, p. 44-48, 2020.

YUSUF, D. et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. Journal of Chemical Information and Modeling, 2008.

ZHOU, T. et al. Preliminary prediction of the basic reproduction number of the Wuhan novel coronavirus 2019-nCoV. Journal of Evidence-Based Medicine, v. 13, n. 1, p. 3-7, 2020.