

AValiação *in silico* DE COMPOSTOS BIOATIVOS INIBIDORES DE PROTEASE MPRO DE SARS-CoV-2

Felipe André Barbosa Lima de Oliveira¹; Maria Eduarda Cruz da Silva²; Maria Eduarda Nascimento Peixoto da Silva³; Lays Evellyn Tomaz Oliveira⁴; Mateus Ferreira Leite⁵; Itácio Queiroz de Mello Padilha⁶ (Orientador).

RESUMO:

A triagem de candidatos a novos fármacos pode estar atrelada a análise *in silico* das propriedades farmacocinéticas e de docking molecular. A previsão virtual evita perda de tempo e dinheiro. O objetivo foi avaliar *in silico* as propriedades ADMET e docking molecular de diferentes compostos bioativos contra SARS-CoV-2 disponíveis na literatura científica. As moléculas foram convertidas em código-SMILE e avaliados com software pkCSM. A busca por moléculas, em particular, usados para fins terapêuticos com ações antivirais têm gerado inúmeras moléculas com potenciais terapêuticos. A partir da pesquisa bibliográfica, foram selecionadas 25 moléculas em 6 publicações. As moléculas apresentaram perfis farmacocinéticos e toxicológicos variados e valores de maior afinidade ΔG variando entre $-8,64$ e $-6,45$. Mesmo os bem avaliados apresentam propriedades que podem ser melhoradas utilizando de desenho racional de drogas, incrementando suas características. As triagens e análises virtuais dos compostos avaliados podem aumentar a probabilidade de sucesso nos ensaios clínicos.

INTRODUÇÃO:

A pandemia da COVID-19 trouxe mudanças drásticas e um imenso impacto na população mundial. O SARS-CoV-2 pertence à família Coronaviridae com molécula de RNA (Ácido Ribonucléico) de fita simples com envelope de glicoproteína em sua superfície (Abd El-Aziz e Stockand, 2020). O RNA viral é composto por mais de seis sequências codificantes como a protease viral (Mpro). Após a entrada do vírus na célula hospedeira, a replicação ocorre lugar no hospedeiro com a síntese de poliproteínas, das quais a Mpro é a principal protease do coronavírus é responsável por nova replicação do vírus (Shereen et al., 2020). A proteína Mpro é conservada entre os coronavírus (CoVs), juntamente com algumas características comuns de seus substratos em diferentes CoVs. A ausência de qualquer Mpro humano homólogo intimamente relacionado o torna um alvo proteico ideal para possíveis medicamentos antivirais, pois é improvável que seus inibidores sejam tóxicos em humanos.



O estudo dos produtos naturais tem sido uma estratégia eficaz para desenvolver novos medicamentos potentes com diferentes finalidades (anti-inflamatórios, antimicrobianos, antivirais, anticâncer, entre outros). O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, uma vez que contempla os estudos farmacocinéticos, os quais abrangem os processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), ou seja, “o que o organismo faz com o fármaco” (Guido et al., 2010). A fase farmacodinâmica está relacionada com a interação do fármaco com seu alvo (receptor, enzimas etc.) e a consequente produção do efeito terapêutico, e pode ser entendida como “o que o fármaco faz no organismo” (Pereira, 2007). As abordagens computacionais podem ajudar a diminuir os custos e acelerar a realização dessa triagem molecular a fim de encontrar moléculas bioativas de interesse médico (Tropsha et al., 2016).

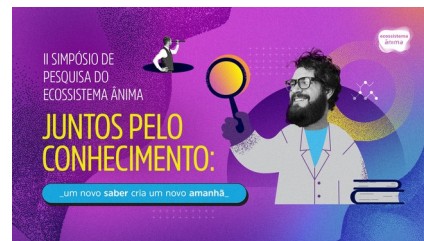
Embora muitas vacinas tenham sido aprovadas em todo o mundo, ainda não há tratamento para a COVID-19, e apenas medidas de suporte e prevenção estão sendo aplicadas para reduzir as complicações da doença. Além disso, ao tentar se adaptar a ambientes em mudança, o vírus desenvolveu uma série de mutações que podem afetar fortemente sua transmissibilidade e infectividade. Essas mutações também são propensas a aumentar e se espalhar em todo o mundo, devido à seleção natural.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos bioativos, ADMET, COVID-19.

MÉTODO:

As estruturas moleculares dos compostos bioativos foram obtidas por meio pesquisa bibliográfica a partir do levantamento de referências teóricas publicadas na forma de artigos científicos nos últimos dez anos. Para a pesquisa, foi elaborada uma estratégia de busca que combinem os campos “título” e “resumo” para as palavras-chave “molecule” cruzada com “bioactive compound” e “anti-SARS-CoV-2” combinadas com nomes de plantas tradicionalmente utilizadas como anti-virais, entre o intervalo de tempo de 2020 a 2022. Para a realização da busca dos artigos, utilizou-se as bases de dados PubMed e Scielo.

As moléculas selecionadas foram convertidas em um código único, composto de letras e números em uma única linha contínua, que consiga guardar todas as informações sobre a estrutura e particularidades do composto (Código SMILE, Simplified Molecular Input Line EntrySpecification). A conversão em códigos SMILE foi realizada como auxílio da ferramenta



SMILE Generator disponível em:

http://www.cheminfo.org/flavor/malaria/Utilities/SMILES_generator_checker/index.html. O

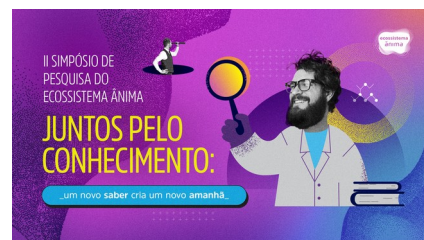
Código SMILE de cada molécula foi avaliado pelo software on-line pkCSM, disponível em: <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>. As propriedades físico-químicas (lipofilicidade, pKa, solubilidade, permeabilidade) e estabilidade (metabólica, no plasma e em solução) de entidades químicas. Adicionalmente, serão avaliadas as propriedades “drug-like” na descoberta de fármacos e metodologias relacionadas com a absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade (totalizando 30 modelos preditivos).

As coordenadas atômicas da proteína Mpro foram obtidas por meio do banco de dados PDB (Protein Data Bank), pelo código de acesso 2H2Z (Dai et al., 2020). Os experimentos de docking proteína-ligante entre a Mpro e Ligante, foram realizados por meio do software SwissDock (Grosdidier et al., 2011). O algoritmo de busca conformacional utilizado será o algoritmo genético Lamarckiano. Foram obtidas dez conformações para cada complexo proteína-ligante. Completados os passos anteriores, a conformação de menor energia de cada complexo será escolhida para análise no VMD. Os dados gerados foram analisados com auxílio do software Microsoft Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

A busca por compostos bioativos, em particular, usados para fins terapêuticos com ações antivirais têm gerado inúmeras moléculas com potenciais terapêuticos. A partir da pesquisa bibliográfica, foram selecionadas 25 moléculas em 6 publicações (Tabela 1).

Referência	Título	Ano	N°
Coelho et al., 2020	Biochemical screening for SARS-CoV-2 main protease inhibitors.	2020	4
Ali e Kunugi, 2021	Propolis, Bee Honey, and Their Components Protect against Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review of In Silico, In Vitro, and Clinical Studies.	2021	5
Chen et al., 2021	Natural Bioactive Molecules as Potential Agents Against SARS-CoV-2.	2021	4
Bahadur-Gurung et al., 2021	Identification of SARS-CoV-2 inhibitors from extracts of Houttuynia cordata Thunb.	2021	4
Tripathi et al., 2021	Identification of bioactive molecule from Withania somnifera (Ashwagandha) as SARS-CoV-2 main protease inhibitor.	2021	5



Ma et al., 2022	Drug-Repurposing Screening Identified Tropifexor as a SARS-CoV-2 Papain-like Protease Inhibitor.	2022	3
-----------------	--	------	---

Tabela 1 – Artigos selecionados para coleta de moléculas bioativas. *Número de moléculas selecionadas para o estudo.

As moléculas selecionadas foram avaliadas em laboratório entre moléculas inéditas e já conhecidas por outras atividades biológicas. Duas moléculas foram escolhidas como controles positivos das análises posteriores devido a sua ação anti-SARS-CoV-2 (Remdesivir e Michel acceptor inhibitor- N3). A partir dos dados estruturais publicados, as estruturas moleculares foram convertidas em códigos SMILES, o qual é um modo de representação de estruturas químicas somente com caracteres normais ASCII (American Standard Code for Information Interchange), composto de letras e números em uma única linha contínua, que consiga guardar todas as informações sobre a estrutura e particularidades do composto. A conversão em código SMILES é essencial para análises farmacocinéticas, uma vez que é o arquivo de entrada para análise on-line pelo pkCSM, onde as características de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade foram preditas. Para a análise integrada dos resultados qualitativos e quantitativos, foram atribuídos pesos aos parâmetros avaliados focando nas características importantes para a ação do composto bioativo. Dessa forma, foi possível ranquear as moléculas a partir dos parâmetros farmacocinéticos (Tabela 2).

Moléculas	Pontuação
Phenylmercuric acetate (2)	132364
1,2,3,4,5-pentametoxi-dibenzo-quinolin-7-ona	129701
CAPE (Caffeic acid phenethyl ester)	117517,88
7-oxodesidroasimilobina	111855
1,2-dimetoxi-3-hidroxi-5-oxonoraporfina	109483
Tropifexor	87490,52
EACC	84476
Michel acceptor inhibitor- N3 (controle positivo)	78234,52
Tannic acid	66799
Nicotiflorin	65175
Luteolin	59851
Remdesivir (controle positivo)	42249,62
Withanoside IV	34142
Sintoindoside IX	28617,6
Thimerosal (1)	17940,7



Rutin	8642,6
Anacardic acid n. 91	264,102
Baicalein n. 43	246,152
Psoralidin n. 114	219,152
Iguesterin n. 34	197,761
Evans blue	167,8
KY-226	161,699
Withanoside II	153,2
Withanoside V	144,94
Quercetin	-18929

Tabela 2 - Ranqueamento das moléculas baseado na pontuação dos resultados obtidos pela análise do *software* pkCSM.

O acetato fenilmercúrico é outro composto orgânico contendo mercúrio, utilizado como conservante em tintas e como desinfetante, já descritos na literatura como inibidores de Mpro de SARS-CoV. Os indicadores físico-químicos têm sido usados durante o início do desenvolvimento de fármacos por fornecerem informações que se relacionam com as principais propriedades que afetam as funções biológicas (Li et al., 2019). A ferramenta on-line pkCSM é utilizada para a predição da toxicidade de candidatos a fármacos a partir das propriedades ADMET. Esta etapa é fundamental para predizer se os potenciais fármacos, apresentam os parâmetros adequados para a seleção de drogas, visando à administração no organismo humano. Por ser gratuito, não retém nenhuma informação enviada e fornece uma plataforma integrada capaz de avaliar de forma rápida propriedades farmacocinéticas e de toxicidade de candidatos a fármacos (Pires et al., 2015). Os aspectos de toxicidade de fármacos envolvem diferentes testes.

O desenvolvimento de medicamentos requer em média de 13 anos de pesquisas. Além do projeto e da produção, é necessário examinar a eficácia, a toxicidade e os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos da droga em estudos baseados em células e animais (Zhang et al., 2020). Os resultados obtidos mostram a importância das análises do potencial farmacocinético durante a triagem de moléculas e seus derivados bioativos. As avaliações *in silico* realizada antes e durante os ensaios *in vitro* podem economizar recursos e tempo na busca por novos fármacos (Xiao et al., 2020).

O modelo construído e de boa qualidade da proteína Mpro foi então usado para a predizer a ligação de diferentes ligantes por meio de testes de docking molecular. As interações da Mpro as moléculas escolhidas foram avaliadas por meio da estimativa de energia livre (ΔG), Tabela 3. Quanto mais negativo for o valor da energia de ligação (entalpia livre de Gibbs), mais exotérmica



será a interação proposta. A aptidão total e as pontuações totais da ferramenta online SwissDock indicam que valores mais baixos representam modos de ligação que são mais favoráveis do que números de pontuação mais elevados.

Moléculas	ΔG Estimado (kcal/mol)	FullFitness (kcal/mol)
Withanoside II	-8,64	-872.42
Sitoindoside IX	-8,48	-759,88
Remdesivir (controle positivo)	-8,47	-1060,03
Tropifexor	-8,47	-1060,03
KY-226	-8,11	-1161.55
Thimerosal (1)	-8,11	-851.07
Withanoside IV	-8,02	-893.18
Rutin	-8	-937,93
Nicotiflorin	-7,98	-951,31
Withanoside V	-7,98	-887.58
Ácido tânico	-7,74	-852,65
Evans blue (11)	-7,74	-852,65
Michel acceptor inhibitor- N3 (controle positivo)	-7,42	-1072,42
Igusterin	-7,28	-1006.32
CAPE (Caffeic acid phenethyl ester)	-7,22	-1098.04
Anacardic acid	-7,19	-1125.09
EACC	-6,97	-1176,78
1,2-dimetoxi-3-hidroxi-5-oxonoraporfina	-6,91	-1035,76
Psoralidin	-6,84	-1089.50
3	-6,75	-1003,65
Quercetin	-6,73	-1080,61
Luteolin	-6,68	-1107,93
14	-6,66	-1047,83
Baicalein	-6,45	-1082.20
Phenylmercuric acetate (2)	ND	ND

Tabela 3 - Energias de interação estimada das melhores poses de docking molecular de Mpro com ligantes a partir dos resultados obtidos pelo programa SwissDock. ND - Não determinado.

Os valores de docking mostraram uma maior afinidade para o Withanoside II e Sitoindoside IX (-8,64 e -8,48 kcal/mol, respectivamente). Contudo, tais ligantes não apresentaram as melhores pontuações em relação aos parâmetros farmacocinéticos. Os resultados evidenciam a complexidade no desenvolvimento de futuros fármacos. Devido à complexidade estrutural do



Phenylmercuric acetate, não foi possível obter os resultados de docking molecular. De fato, os dados computacionais podem ser corroborados com experimentos *in vitro*.

CONCLUSÕES:

A busca por novos fármacos com potencial terapêutico é de extrema importância e tem início com os testes *in vitro*. A triagem de candidatos pode estar atrelada a análise *in silico* das propriedades farmacocinéticas e de docking molecular. As moléculas escolhidas apresentam potencial terapêutico, mas apresentaram perfis farmacocinéticos preditos variados. Os resultados mostram que mesmo os compostos mais bem avaliados apresentam propriedades que podem ser melhoradas utilizando metodologias de desenho racional de drogas, onde modificações subsequentes podem ser realizadas para aprimorar a molécula ligante e torná-la mais específica para um determinado alvo, incrementando suas características farmacológicas. As triagens e análises virtuais das propriedades farmacocinéticas dos compostos avaliados podem aumentar a probabilidade de sucesso nos ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS:

Abd El-Aziz TM, Stockand JD. Recent progress and challenges in drug development against COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2)-an update on the status. *Infect Genet Evol.* 2020;83(104327):1–10.

Ali AM, Kunugi H. Propolis, Bee Honey, and Their Components Protect against Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review of In Silico, In Vitro, and Clinical Studies. *Molecules.* 2021 Feb 25;26(5):1232.

Chen W, Wang Z, Wang Y, Li Y. Natural Bioactive Molecules as Potential Agents Against SARS-CoV-2. *Front Pharmacol.* 2021 Aug 17;12:702472.

Coelho C, Gallo G, Campos CB, Hardy L, Würtele M. Biochemical screening for SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *PLoS One.* 2020 Oct 6;15(10):e0240079

Dai W, Zhang B, Jiang XM et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science.* 2020 Jun 19;368(6497):1331-1335.



Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(Web Server issue):W270-7. doi: 10.1093/nar/gkr366.

Guido R, Andricopulo A, Oliva G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: Aplicações em doenças infecciosas. *Estud Avancados.* 2010;24(70):81–98.

Bahadur Gurung A, Ajmal Ali M, Lee J, Abul Farah M, Mashay Al-Anazi K, Al-Hemaid F. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors from extracts of *Houttuynia cordata* Thunb. *Saudi J Biol Sci.* 2021 Dec;28(12):7517-7527.

Li S-Y, Sun Z-K, Zeng X-Y, Zhang Y, Wang M-L, Hu S-C, et al. Potent Cytotoxicity of Novel L-Shaped Ortho-Quinone Analogs through Inducing Apoptosis Sheng-You. *Molecules.* 2019;24(4138):1–18.

Ma C, Hu Y, Wang Y, Choza J, Wang J. Drug-Repurposing Screening Identified Tropifexor as a SARS-CoV-2 Papain-like Protease Inhibitor. *ACS Infect Dis.* 2022 May 13;8(5):1022-1030.

Pires DE, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem.* 2015;58(9):4066–72.

Pereira DG. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. *Quim Nova.* 2007;30(1):171–7.

Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 2020;24:91–8.

Tripathi MK, Singh P, Sharma S, Singh TP, Ethayathulla AS, Kaur P. Identification of bioactive molecule from *Withania somnifera* (Ashwagandha) as SARS-CoV-2 main protease inhibitor. *J Biomol Struct Dyn.* 2021 Sep;39(15):5668-5681.

Tropsha A, Bajorath J. Computational Methods for Drug Discovery and Design. *J Med Chem.* 2016 Jan 14;59(1):1.

Xiao Y, Deng T, Wang D. Davanone terpenoid inhibits cisplatin-resistant acute myeloid leukemia cancer cell growth by inducing caspase-dependent apoptosis, loss of mitochondrial membrane potential, inhibition of cell migration and invasion and targeting PI3K/AKT/MAPK signalling p. *J BUON.* 2020;25(3):1607–13.

Zhang Z, Zhou L, Xie N, Nice EC, Zhang T, Cui Y, et al. Overcoming cancer apeutic bottleneck by drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther [Internet].* 2020;5(1):1–10.

FOMENTO

O trabalho faz parte do projeto de iniciação científica aprovado pelo edital PROCIÊNCIA 2023/1 do Ecosistema Ânima. O trabalho não contou com fomento.

