

Estudos atuais sobre medicamentos para combater a COVID-19.

Éber Coelho Paraguassu (1) e Anneli Mercedes Celis de Cárdenas (2)

EDITORIAL

Resumo

Uma campanha de triagem em grande escala rendeu dezenas de estruturas cristalinas de pequenos fragmentos de moléculas que se ligam à protease principal do SARS-CoV-2. A comunidade de pesquisa global é encorajada a persegui-los como pontos de partida para a descoberta de medicamentos para COVID-19.

Palavras Chave: Covid-19, Medicamentos, Farmacologia, Terapêutica, Tratamento.



Current studies on drugs to combat COVID-19.

A large-scale screening campaign yielded dozens of crystalline structures of small fragments of molecules that bind to the main SARS-CoV-2 protease. The global research community is encouraged to pursue them as starting points for drug discovery for COVID-19.

Keywords: Covid-19, Medicines, Pharmacology, Therapeutics, Treatment.

Instituição afiliada: 1- GOE/UNIAVAN. 2- Universidade Federal do Amapá.

Dados da publicação: Artigo recebido em 10 de Outubro, revisado em 15 de Outubro, aceito para publicação em 19 de Outubro e publicado em 29 de Outubro.

DOI: <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2020v2n11p01-09>

 Éber Coelho Paraguassu paraguassutans@gmail.com



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Estudos para uma medicação efetiva

Em julho de 2020, mais de meio milhão de pessoas em todo o mundo morreram de COVID-19. Esse número terá crescido consideravelmente no momento em que você ler isto. A comunidade de pesquisa respondeu à pandemia com uma urgência sem precedentes. Várias vacinas experimentais entraram em ensaios clínicos - com várias já na fase III - enquanto os médicos exploram tratamentos potenciais usando anticorpos experimentais e drogas já aprovadas para outras indicações. Com sorte, uma vacina eficaz logo estará disponível. No entanto, vale lembrar que, embora ainda não tenhamos uma vacina eficaz contra o HIV quase três décadas após sua descoberta, os medicamentos de pequenas moléculas tornaram a convivência com o vírus controlável. A criação de novos medicamentos de pequenas moléculas geralmente leva anos, o que é mais uma razão para começar cedo. Alguns passos promissores em direção ao objetivo de desenvolver uma droga que vise especificamente o SARS-CoV-2, o coronavírus responsável pelo COVID-19, são agora descritos por Douangamath et al. dentro *Nature Communications* [1]. Crucialmente, todas as informações relatadas no manuscrito foram divulgadas antes da publicação, com a ideia de que a comunidade científica mais ampla pode desenvolver rapidamente a partir delas.

Uma tela de fragmento em grande escala contra a protease principal M^{pro} do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 entra nas células humanas e coopta os ribossomos para traduzir seu RNA viral em duas poliproteínas. Essas poliproteínas são, por sua vez, clivadas em peptídeos individuais, em grande parte por uma enzima prosaicamente chamada de protease principal, ou M^{pro}. Devido ao seu papel inicial e essencial no ciclo de replicação viral, o M^{pro} é um alvo óbvio para a descoberta de medicamentos. Na verdade, os pesquisadores identificaram previamente inibidores peptidomiméticos potentes de M^{pro} de MERS-CoV, um coronavírus relacionado [2]. Com base neste trabalho, os inibidores da SARS-CoV-2 M^{pro} também foram desenvolvidos rapidamente [3·4], mas sua natureza peptídica pode complicar a administração oral.

Para identificar novas pistas não peptídicas, uma equipe internacional liderada por Martin Walsh e Frank von Delft da Diamond Light Source, Reino Unido e Nir London do Instituto Weizmann de Ciência em Israel, abordou o M^{pro} usando uma abordagem chamada droga baseada em fragmento descoberta (FBDD) [5]. Em vez de começar a partir de uma molécula maior baseada em substrato como com os peptidomiméticos, ou rastrear centenas de milhares de moléculas do tamanho de drogas, o FBDD começa com bibliotecas mais limitadas de moléculas menores ou fragmentos. Como há menos fragmentos pequenos possíveis do que moléculas do tamanho de drogas, o FBDD pode pesquisar o espaço químico

de forma mais abrangente para encontrar os pontos de partida mais atraentes para a química medicinal. Além disso, como os fragmentos são tão pequenos, eles tendem a se ligar a mais sítios nas proteínas, o que facilita a identificação do chumbo. Quase 50 medicamentos derivados de FBDD entraram em desenvolvimento clínico .

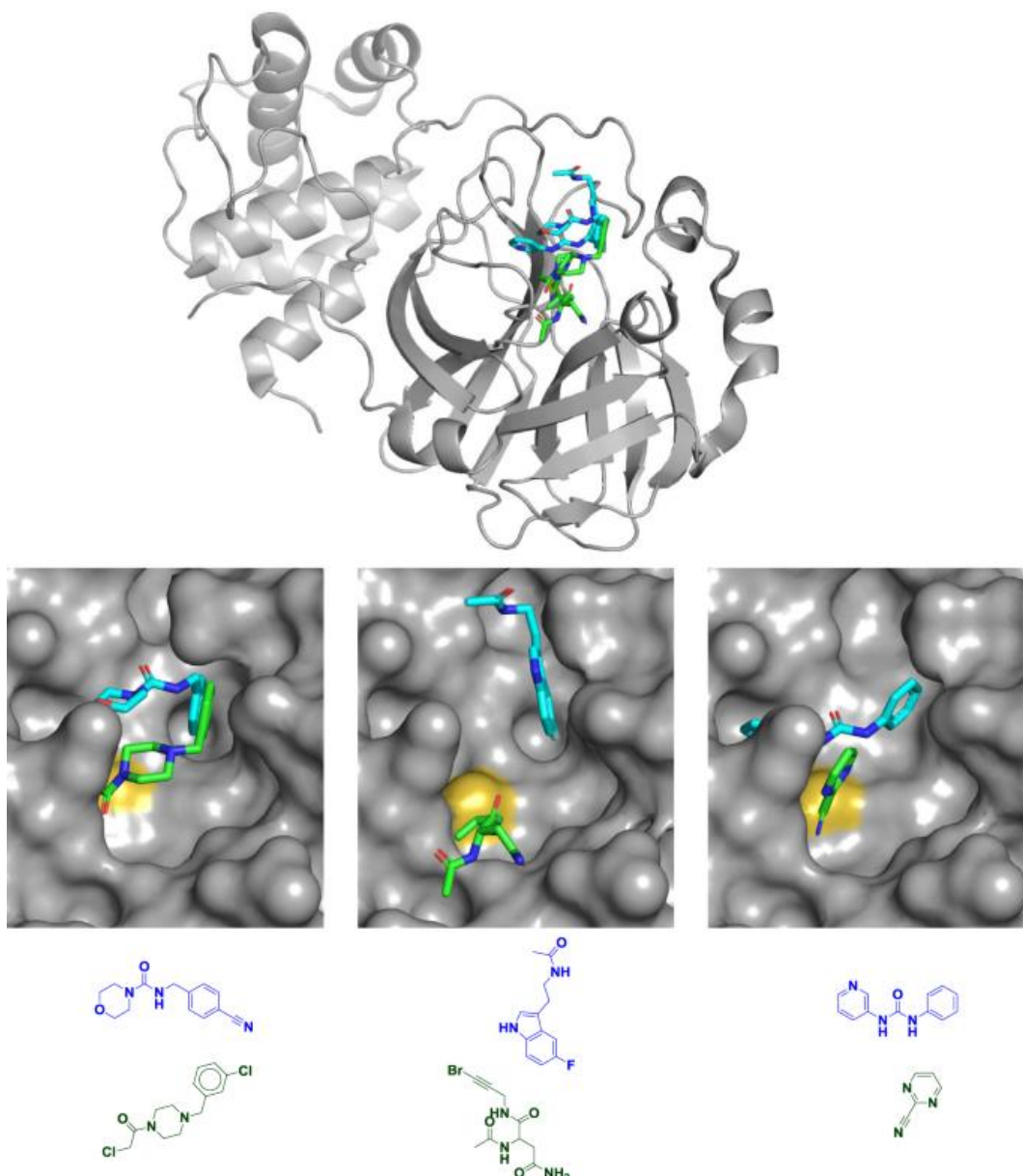
O sítio ativo de M^{pro} contém um resíduo de cisteína essencial para a atividade catalítica, e os inibidores SARS-CoV-2 M^{pro} relatados anteriormente contêm um centro eletrofílico (como um aldeído ou uma α -cetoamida) que captura covalentemente o tiol de cisteína [3-4]. A formação de ligações covalentes pode melhorar a eficácia dos inibidores, principalmente quando a formação de ligações é irreversível, como é o caso de drogas como a penicilina. No entanto, começando com a era da triagem de alto rendimento, as empresas farmacêuticas tenderam a se afastar das drogas covalentes por medo de que a ligação indiscriminada a outras proteínas pudesse causar toxicidade imprevisível. No entanto, o recente sucesso de múltiplas drogas covalentes seletivas e bem caracterizadas para o câncer renovou o interesse em modificadores covalentes, incluindo moléculas do tamanho de fragmentos [6-7] .

No novo artigo da *Nature Communications* , os pesquisadores começaram examinando uma biblioteca de ~ 1000 fragmentos eletrofílicos contra M^{pro} usando espectrometria de massa para identificar quais poderiam se ligar à proteína. Devido à reatividade da cisteína do local ativo, condições bastante rigorosas (5 μ M de cada fragmento por 1,5 horas à temperatura ambiente) foram usadas para atingir algum grau de discriminação. Nessas condições, 68 fragmentos modificaram apreciavelmente o M^{pro} , mas não foram genericamente reativos contra outras proteínas ou tióis de moléculas pequenas.

Entre os vários métodos usados para caracterizar fragmentos que se ligam a uma proteína, a cristalografia de raios-X é indiscutivelmente o mais informativo, pois revela as interações moleculares detalhadas da ligação do ligante. Mesmo quando bem-sucedida, a cristalografia pode consumir muito tempo, e muitos caçadores de drogas se consideram afortunados quando possuem uma ou algumas estruturas de cristal. Aqui, os pesquisadores obtiveram uma estrutura de alta resolução de 1,25 Å de M^{pro} de cristais adequados para experiências de imersão. Alguns dos fragmentos covalentes reagiram primeiro com a proteína e depois cristalizaram. No total, 68 fragmentos covalentes e 1176 na maioria fragmentos não covalentes foram selecionados por co-cristalização ou imersão dos compostos nos cristais. 1877 cristais foram montados em Diamond e 1638 conjuntos de dados com uma resolução melhor que 2,8 Å foram coletados - um empreendimento impressionante que rendeu estruturas de 96 fragmentos ligados a M^{pro} . A velocidade com que isso foi feito é impressionante: os cristais de proteína foram obtidos pela primeira vez em 13 de fevereiro de 2020, e todos os dados experimentais foram coletados em 7 de março. As primeiras estruturas de cristal foram tornadas públicas apenas três dias depois e, no início de abril de 2020, todas as estruturas finais foram lançadas em meio à pandemia em evolução. Se uma imagem vale mais que mil palavras, Douangamath et al. publicou um romance.

Não surpreendentemente, a maioria dos fragmentos - incluindo todos os 48 covalentes - ligam-se ao sítio ativo. Curiosamente, esperava-se que dois fragmentos que se ligam covalentemente à cisteína do sítio ativo não fossem covalentes; a “ogiva” de bromoalquina que eles contêm (Fig. 1) geralmente não reage⁸. O fato de que esses compostos modificam a enzima ilustra o quão suscetível a cisteína do sítio ativo é à modificação, o que poderia ser um bom augúrio para a descoberta de drogas. Dito isso, todos os vários inibidores de quinase aprovados recentemente têm como alvo as cisteínas não catalíticas [7] e poucos fármacos covalentes aprovados têm como alvo resíduos de cisteína no local ativo. Esse fato fala sobre a importância de 23 fragmentos não covalentes que exploram coletivamente muitos sub-bolsões individuais dentro do grande sítio ativo. De fato, esforços recentes baseados em fragmentos contra outra cisteína hidrolase, USP7, levaram a duas classes de inibidores potentes não covalentes^{9, 10}.

Fig. 1: Fragmentos diversos em diversos locais de ligação.



Estrutura M^{pro} e estruturas químicas de seis fragmentos ligados ao sítio ativo de M^{pro} para ilustrar seus múltiplos locais de ligação. Embora a enzima cataliticamente ativa seja um homodímero obrigatório, apenas um monômero é mostrado (topo) para maior clareza. Os fragmentos covalentes são mostrados em verde, os fragmentos não covalentes são mostrados em azul ou ciano, e o átomo de enxofre de cisteína catalítico é mostrado em amarelo. Todos os seis fragmentos são mostrados sobrepostos no painel superior, em pares no painel do meio e como estruturas químicas no painel inferior; sobreposições são mostradas para ilustrar a gama de modos de ligação embora cada fragmento tenha sido cristalizado individualmente. Todos os três fragmentos não covalentes mostrados vêm de uma biblioteca de fragmentos "posicionados" projetada para química de acompanhamento rápido através das ligações de ureia ou amida [13]. A maioria dos fragmentos covalentes encontrados são cloroacetamidas (embaixo, à esquerda), mas outros incluem bromoalquinos (embaixo, no meio) e nitrilos aromáticos (embaixo, à direita). Os códigos PDB são (da esquerda para a direita e de cima para baixo): 5RFE, 5R7Z, 5R83, 5RET, 5RG3 e 5RHB. Conforme observado por Douangamath et al. [1](#), a sobreposição de estruturas sugere muitas oportunidades para a fusão de fragmentos, por exemplo, os dois compostos à esquerda.

Além disso, M^{pro} funciona como um dímero, e três fragmentos se ligam na interface do dímero; os pesquisadores sugerem que estes podem ser otimizados em moléculas que inibem a enzima alostericamente. Exemplos de alguns dos fragmentos que ilustram os múltiplos modos de ligação e interações são mostrados na Fig. 1.

Outro aspecto impressionante do trabalho é a dedicação dos pesquisadores à ciência aberta. As coordenadas de todas as estruturas foram depositadas no Banco de Dados de Proteínas e liberadas em tempo real à medida que eram resolvidas. As próximas etapas são usar essas informações para produzir moléculas com melhores atividades para semear programas de descoberta de medicamentos. Esses métodos comumente incluem a fusão ou ligação de dois fragmentos para produzir uma molécula maior e mais potente como, por exemplo, no caso do medicamento contra o câncer venetoclax [11]. Os pesquisadores destacam várias possibilidades, uma das quais é mostrada na Fig. 1. Mais comumente, os fragmentos podem ser cultivados em moléculas maiores pela adição de novas frações em locais promissores, como foi feito para o medicamento contra o câncer vemurafenib [12]. Alguns dos fragmentos divulgados foram projetados especificamente para ter grupos funcionais bem adequados para química fácil e, assim, facilitar este processo [13].

A natureza multifacetada dos fragmentos oferece amplas oportunidades para a elaboração química, e um único fragmento pode levar a vários medicamentos. Por exemplo, um fragmento de 9 átomos (7-azaindol) é encontrado em pelo menos seis compostos clínicos direcionados a múltiplas quinases desenvolvidas por diferentes grupos de pesquisadores [14]. Os químicos medicinais estão usando cada vez mais fragmentos publicados por terceiros para permitir esforços internos de descoberta de medicamentos, em alguns casos levando a compostos clínicos [15·16]. As dezenas de estruturas de fragmentos



relatadas aqui podem inspirar uma miríade de ideias adequadas para uma abordagem colaborativa e, de fato, um consórcio de pesquisadores chamado COVID Moonshot tem aceitado sugestões públicas de moléculas. Eles estão sendo computacionalmente triados, sintetizados e testados, com dados experimentais disponibilizados publicamente.

O caminho a frente

Ainda há muito que fazer. Parafraseando Winston Churchill, provavelmente este não é o fim do começo. No caso do primeiro medicamento derivado de FBDD aprovado, vemurafenib, demorou pouco menos de um ano para ir de fragmento a candidato clínico, um período de tempo extraordinariamente curto para a descoberta de um medicamento de molécula pequena. As atividades funcionais dos fragmentos estão apenas começando a ser relatadas e, embora alguns tenham IC₅₀ submicromolares, provavelmente precisarão ser melhoradas em ordens de magnitude. A permeabilidade celular, seletividade, farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade de moléculas melhoradas ainda precisam ser avaliadas e otimizadas. Mesmo que seja bem-sucedido, pode levar anos até que qualquer candidato proveniente desse trabalho entre na clínica.

Embora vacinas ou tratamentos baseados em anticorpos possam estar disponíveis antes que uma pequena molécula seja aprovada, o trabalho no M^{pro} ainda vale a pena prosseguir. As vacinas podem não ser 100% eficazes na prevenção da infecção, portanto, os medicamentos para tratar COVID-19 ainda serão necessários. O SARS-CoV-2 é o terceiro coronavírus a nos afligir desde o início do século, e não há razão para pensar que não veremos mais. Embora a SARS pareça ter desaparecido, ainda não há tratamentos aprovados para MERS, que tem uma taxa de mortalidade mais alta, mas uma taxa de transmissão mais baixa. Dada a estreita conservação de M^{pro}, inibidores derivados de fragmentos poderiam ser amplamente ativos contra tais ameaças. Os fragmentos descobertos por Douangamath et al. - juntamente com os esforços realizados em todo o mundo - representam os primeiros passos de uma longa e incerta jornada. Mas talvez um dia, um deles seja reconhecido como um grande salto para a humanidade.

REFERÊNCIAS

1. Douangamath, A. et al. Crystallographic and electrophilic fragment screening of the SARS-CoV-2 main protease. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18709-w> (2020).
2. Zhang, L. et al. Alpha-ketoamides as broad-spectrum inhibitors of coronavirus and enterovirus replication: structure-based design, synthesis, and activity assessment. *J. Med. Chem.* **63**, 4562–4578 (2020).

3. Jin, Z. et al. Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* **582**, 289–293 (2020).
4. Dai, W. et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science* **368**, 1331–1335 (2020).
5. Erlanson, D. A., Fesik, S. W., Hubbard, R. E., Jahnke, W. & Jhoti, H. Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 605–619 (2016).
6. Resnick, E. et al. Rapid covalent-probe discovery by electrophile-fragment screening. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 8951–8968 (2019).
7. Abdeldayem, A., Raouf, Y. S., Constantinescu, S. N., Moriggl, R. & Gunning, P. T. Advances in covalent kinase inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **49**, 2617–2687 (2020).
8. Mons, E. et al. The alkyne moiety as a latent electrophile in irreversible covalent small molecule inhibitors of cathepsin K. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 3507–3514 (2019).
9. Di Lello, P. et al. Discovery of small-molecule inhibitors of ubiquitin specific protease 7 (USP7) using integrated NMR and in silico techniques. *J. Med. Chem.* **60**, 10056–10070 (2017).
10. Gavory, G. et al. Discovery and characterization of highly potent and selective allosteric USP7 inhibitors. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 118–125 (2018).
11. Oltsersdorf, T. et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**, 677–681 (2005).
12. Tsai, J. et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 3041–3046 (2008).
13. Sreeramulu, S. et al. NMR quality control of fragment libraries for screening. *J. Biomol. NMR* <https://doi.org/10.1007/s10858-020-00327-9> (2020).
14. Irie, T. & Sawa, M. 7-azaindole: a versatile scaffold for developing kinase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **66**, 29–36 (2018).
15. Erlanson, D. A., de Esch, I. J. P., Jahnke, W., Johnson, C. N. & Mortenson, P. N. Fragment-to-lead medicinal chemistry publications in 2018. *J. Med. Chem.* **63**, 4430–4444 (2020).
16. Tron, A. E. et al. Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.* **9**, 5341 (2018).