

مقاله پژوهشی

بررسی داکینگ داروهای مجوزدار غیر ویروسی به منظور دستیابی به مهارکننده های جدید ورود و

تکثیر ویروس ابولا

واحد ادهمی، ساقی سپهری*

گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: به دلیل قدرت و شیوع بالای عفونت زایی و عدم داروی مناسب ویروس ابولا طی سال های اخیر، پژوهش هایی در خصوص کشف و معرفی داروهای ضد ابولا انجام شده است. هدف از این پژوهش بررسی بیوانفورماتیکی مهار ورود و تکثیر ویروس ابولا توسط داروهای مجوزدار غیر ویروسی است.

مواد و روش ها: این پژوهش به روش توصیفی- تحلیلی انجام گرفت. برای انجام این بررسی بیوانفورماتیکی، در ابتدا ساختار شیمیایی ترکیبات با استفاده از نرم افزار ChemDraw Ultra10.0 ترسیم شد سپس به منظور بهینه سازی انرژی، به نرم افزار Hyperchem8 انتقال یافت. مطالعات داکینگ به وسیله نرم افزار AutoDock4.2 انجام شد و در مرحله نهایی، مورد آنالیز و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: یافته های مطالعه حاضر نشان داد که پیوندهای درگیر در اتصال دارو با گیرنده ها، پیوند هیدروژنی، اتصالات هیدروفوبی، $\pi-\pi$ و کاتیون- π می باشند. در میان تمام ترکیبات مورد مطالعه، بهترین نتایج داکینگ مربوط به داروهای آمودیاکین، دیفنوکسیلات و کلروکینون است. در حقیقت این سه دارو با منفی ترین سطح انرژی اتصال تمایل بیشتری برای اتصال به اسیدهای آمینه جایگاه اتصال پروتئین های GP و VP40 دارند. ضعیف ترین نتایج داکینگ مربوط به دو داروی دیریترومایسین و اریترومایسین است زیرا هیدروفیلیسیته این دو دارو بسیار زیاد است. به طور کلی، وجود بخش های هیدروفوب، آمین نوع سوم و پیوندهای هیدروژنی بهینه باعث افزایش قدرت ضد ابولا می شود.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعات بیوانفورماتیکی، تمام داروها تأثیرات مهاری خوبی را در جایگاه اتصال گیرنده ها از خود نشان می دهند و می توانند به عنوان مهارکننده های مؤثر ورود و تکثیر ویروس ابولا مطرح شوند.

کلمات کلیدی: داکینگ، ویروس ابولا، drug repositioning، پروتئین ماتریس ویروسی اصلی ۴۰، گلیکو پروتئین

مقدمه

سال ۱۹۷۶ میلادی در کشور کنگو شناخته شد. نام این ویروس از یکی از رودخانه های کشور جمهوری دموکراتیک کنگو گرفته شده است. در این سال، ۲۸۴ نفر به این بیماری مبتلا شدند که در نهایت، ۱۵۱ نفر جان خود را از دست دادند (۴، ۵). اگرچه ویروس ابولا نزدیک به ۴۰ سال است که شناسایی شده است اما شیوع اخیر آن در غرب آفریقا وضعیت بحرانی را در منطقه ایجاد کرده است، به طوری که در گزارش مارس ۲۰۱۶، حدود ۲۸۶۱۰ مورد مبتلا و ۱۱۳۱۵ نفر جان خود را بر اثر این بیماری مهلک از دست داده اند (۶).

بیماری ابولا یکی از مرگ بارترین بیماری های ویروسی در طول تاریخ است که در غرب آفریقا شیوع پیدا کرده و به شدت در حال انتشار به سایر نقاط جهان است (۱، ۲). انتقال ویروس ابولا عمدتاً از طریق تماس های فیزیکی با مایعات بدن افراد آلوده است که منجر به تضعیف سیستم ایمنی، تب خونریزی کننده حاد و در نهایت مرگ میزبان می شود (۳). این ویروس نخستین بار در

*نویسنده مسئول: ساقی سپهری، گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
Email: sepehri.saghi@yahoo.com
http://orcid.org/0000-0001-7340-0468

قرار گرفته و اهمیت زیادی پیدا کرده است. این فرایند، شامل یافتن یک نشانه جدید درمانی برای یک داروی مجوزدار یا به عبارت دیگر، استفاده از داروها و ترکیبات شناخته شده برای درمان بیماری‌های جدید است. این روش یک جایگزین بسیار خوب برای روش‌های کشف و توسعه داروهای *de novo* (جدید طراحی شده) سنتی است. مزیت قابل توجه روش *drug repositioning* بر توسعه داروها به روش‌های سنتی این است که این روش تعداد قابل توجهی از آزمایش‌های سمیت و دیگر آزمایش‌ها را گذرانده است و ایمنی آن شناخته شده است و خطر شکست برای علت‌های سمی نامطلوب کاهش یافته است؛ بنابراین از هزینه‌های بسیار بالا نسبت به کشف داروهای سنتزی به دلیل قابلیت دسترسی زودتر به داده‌های فارماکوکینتیک، فراهمی زیستی، ایمنی و سمیت جلوگیری می‌کند.

روش محاسباتی طراحی دارو بر اساس ساختار، که در آن مولکول‌های کوچک درون ساختار ماکرومولکول‌های هدف «داک» می‌شوند و به اتصال آن‌ها در جایگاه مورد نظر امتیاز داده می‌شود به طور گسترده‌ای در کشف، طراحی و بهینه‌سازی ترکیبات رهبر (Lead) کاربرد دارد.

بررسی مهارکننده‌های ویروس ابولا به منظور تولید داروی مؤثر برای کاهش مرگ و میر بیماران و بهبود آن‌ها موضوع جدیدی بوده که در سال‌های اخیر مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است. در حال حاضر ناکافی بودن روش‌های مناسب برای شناسایی مکانیسم عمل مهارکننده‌ها بر عملکرد ویروس ابولا و رابطه ساختار شیمیایی آن‌ها با اثر ضد ابولا ما را ترغیب به بررسی بیشتر مکانیسم اثر ترکیبات می‌کند. روش *drug repositioning* روشی است که اخیراً مورد توجه بسیار زیاد برای کشف مهارکننده‌ها قرار گرفته است. داروهای مورد بررسی در این مطالعه با روش *drug repositioning* قبلاً بر روی ویروس ابولا به منظور معرفی مهارکننده‌های جدید آزمایش شده‌اند (۱۳). نرم‌افزارها و روش‌های محاسباتی طراحی دارو روشی جدید بوده که پیدایش و عمومیت آن با پیشرفت قدرت محاسبات در طی چندین دهه همراه بوده است. این روش‌ها همراه با آزمایش‌های بیولوژیکی جهت برقراری ارتباط میان ساختار و فعالیت ترکیبات دارویی، کشف ترکیبات جدید، پیش‌بینی فعالیت‌های بیولوژیک ترکیبات طراحی شده و همچنین درک واکنش‌ها و فرایندهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به علاوه، با این روش‌ها می‌توان به بیان و پیشگویی نحوه اتصال ترکیب به پروتئین هدف،

ابولا یکی از اعضای خانواده *Filoviridae* رسته *Mononegaviral* است. این ویروس با پوشش لیپیدی دارای یک رشته RNA خطی در جهت منفی و هفت نوع پروتئین است. این ویروس شکل رشته‌ای دارد و قطر و طول آن به ترتیب حدود ۸۰ و ۱۲۰۰ نانومتر در یک ویرون بالغ است. ویروس ابولا از طریق حیواناتی مانند شامپانزه، گوریل و خفاش به انسان منتقل می‌شود (۷، ۸). از بین این پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین (GP) یکی از پروتئین‌های مهم ویروس ابولا است، این پروتئین غشایی است و تنها گلیکوپروتئین ساختاری ابولا به شمار می‌رود. ساختار اولیه آن ۶۷۶ اسید آمینه دارد و توسط آنزیم فورین سلول میزبان به دو هترودایمر تبدیل می‌گردد (GP1 و GP2) که این دو هترودایمر با یک گروه دی سولفیدی به یکدیگر متصل شده‌اند. GP روی سطح ویروس قرار گرفته است و نقش ادغام ویروس به سلول میزبان را بازی می‌کند، بدین ترتیب ویروس به سلول میزبان متصل و به داخل آن وارد می‌شود. به همین دلیل نقش بسیار مهمی در چرخه زندگی ابولا بازی می‌کند (۷). مطالعات اخیر، بیشتر بر روی مهار GP متمرکز شده است؛ زیرا کشف و توسعه این مهارکننده‌ها می‌تواند به عنوان دارویی برای جلوگیری از ورود و اتصال ویروس ابولا به سلول مورد توجه قرار گیرند (۹). پروتئین مهم دیگر ویروس ابولا که بسیار مورد توجه است، پروتئین ماتریکس اصلی (Viral matrix protein) (VP40)، فراوان‌ترین پروتئینی که در زیر پوشش ویروسی قرار گرفته که این پروتئین شامل ۳۲۶ اسید آمینه و وزن مولکولی ۳۵ کیلودالتون دارد و یک نقش حیاتی در حفظ همبستگی ساختاری و بلوغ ویرون بازی می‌کند. در چرخه زندگی ویروس ابولا، این پروتئین نقش‌های دیگری از جمله، تشکیل ویرون، تنظیم رونویسی ویروسی و همچنین مونتاژ و جوانه زنی ویرون‌های بالغ را ایفا می‌کند. VP40 نیز همچون GP به عنوان یک هدف خوب برای داروهای ضد ابولا مورد توجه است که مهارکننده‌های آن از تکثیر، مونتاژ و جوانه زنی ویروس جلوگیری می‌کنند (۱۰، ۱۱). متأسفانه در حال حاضر، درمان مؤثر برای عفونت ویروس ابولا وجود ندارد و یک تهدید بزرگ بهداشت جهانی به شمار می‌آید (۴، ۵). درمان با آنتی‌بادی در مدل‌های حیوانی آزمایش شد و برای تعداد معدودی بیمار مورد استفاده قرار گرفته است اما عرضه چنین داروهایی بسیار محدود است (۱۲).

فرایند معرفی مجدد دارو (*drug repositioning*) در سال‌های اخیر برای توسعه دارو و در صنایع داروسازی بسیار مورد توجه

دارو-گیرنده داروهای مختلف بر روی پروتئین های GP و VP40 و رابطه استخلاف های مختلف ساختار شیمیایی داروها با میزان اثر نشان داده شده مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

برای انجام روش داکینگ از نرم افزار اتوداک (AutoDock4.2) برای انجام داکینگ مولکولی استفاده شد. بدین منظور نرم افزار اتوداک بر روی کامپیوتر ۸ هسته ای تحت سیستم عامل ویندوز در دانشکده داروسازی اردبیل نصب شد و برای انجام این پژوهش در دی ماه سال ۱۳۹۶ مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه

ارزیابی اختلاف انرژی بین کانفورمرهای مختلف ترکیب و توضیح مکانیسم های واکنش و نقش و اثر گروه ها و استخلاف های مختلف در ساختار شیمیایی ترکیبات و عملکرد آن ها بر نحوه اتصال و نهایتاً اثربخشی ترکیب بر پروتئین هدف پرداخت. تاکنون بر روی این داروهای مجوز دار که اثر ضد ابولا نشان داده اند مطالعه شبیه سازی داکینگ مولکولی در ارتباط با نحوه برهمکنش این ترکیبات با گلیکوپروتئین (GP) و پروتئین ماتریکس اصلی (VP40) مورد بررسی قرار نگرفته است؛ بنابراین در این پژوهش، به منظور شناخت مکانیسم دقیق عملکرد داروها و شناسایی اسیدهای آمینه درگیر در این فرایند و انرژی بهینه برهمکنش

جدول ۱- نام دارو و مقادیر IC₅₀ علیه ویروس ابولا

ردیف	نام دارو	غلظت (میکرومولار)	ارزیابی تکثیر ویروس	ارزیابی ورود شبیه ویروس (% فعالیت)
۱	امیلودیپین	۱۰	-	۹۳
۲	امودیاکین	۱۰	-	۹۹
۳	بی پردن	۵۰	-	۹۸
۴	کارپوفن	۱۰	-	۹۴
۵	کلروکینون	۵۰	+	۹۷
۶	دکس برم فنیرامین	۵۰	-	۸۵
۷	دی بوکائین	۱۰	-	۹۹
۸	دیفنوکسیلات	۵۰	+	۹۶
۹	دی فنیل پیرالین	۵۰	+	۹۶
۱۰	دیریترومایسین	۵۰	-	۹۹
۱۱	اریترومایسین	۱۰	-	۹۶
۱۲	استرادی اول	۱۰	-	۹۳
۱۳	فلوکستین	۱۰	-	۹۶
۱۴	کتوتیفن	۵۰	+	۹۹
۱۵	لووپروپوکسیفن	۵۰	-	۹۸
۱۶	مایکوفنولات	۵۰	-	۹۱
۱۷	اکسی فن سیکلیمین	۵۰	-	۹۵
۱۸	پاروکستین	۱۰	-	۹۸
۱۹	پن بوتولول	۱۰	-	۹۸
۲۰	پروکلرپرازین	۱۰	-	۹۵
۲۱	پروتربتیلین	۱۰	-	۸۳
۲۲	تورمفین	۱۰	-	۹۷
۲۳	دیپی وفرین	۵۰	-	۹۴
۲۴	تری هگزی فنیدیل	۱۰	-	۹۷

بر اساس حجم مولکولی لیگندهای طراحی شده، شبکه‌ای با ابعاد $60 \times 60 \times 60$ آنگستروم در راستای محورهای سه‌گانه مختصات و فاصله نقاط شبکه $5.73/0$ آنگستروم (یک‌چهارم طول پیوند ساده کربن-کربن) که دربرگیرنده جایگاه فعال گیرنده بود، در نظر گرفته شد. فایل شبکه به‌صورت gpf ذخیره گردید. پارامترهای ذخیره‌شده در فایل gpf در اختیار محاسبات اتوگرید قرار گرفته است. پس از انجام عملیات داکینگ، نتایج شامل کانفورماسیون-های مولکول، انواع برهمکنش‌های مولکول با پروتئین شامل برهمکنش‌های هیدروژنی، هیدروفوبی، π - π با اسیدهای آمینه موجود در پاکت اتصال پروتئین‌ها قابل مشاهده و تجزیه و تحلیل می‌باشند. به‌منظور دستیابی به این اطلاعات از نرم‌افزارهای اتوداک تولز و Discovery Studio Viewer lite 4.0 استفاده شد.

نتایج

به دلیل نداشتن لیگاند کریستاله شده در پروتئین، معتبر سازی محاسبات داکینگ در این مطالعه، بر اساس انجام داکینگ کور (Blind-Docking) است که کل پروتئین در این روش داخل جعبه شبکه قرار می‌گیرد. سپس نحوه قرارگیری و برهم‌کنش-های لیگاند در جایگاه فعال پروتئین با نتایج حاصل از داکینگ همان لیگاند در مقالات گزارش شده مقایسه گردید. داکینگ قوی‌ترین دارو (آمودیاکین) به داخل پروتئین‌ها انجام شد. با بررسی نتایج آن، لیگاند در جایگاه فعال قرار گرفت و برهم‌کنش-های ضروری با توجه به پژوهش‌های گزارش شده قبلی را نشان دادند. پس از چند بار داکینگ متوالی، لیگاند در مکان مشابه قرار گرفت و برهم‌کنش‌های مشابه را با اسیدهای آمینه نشان داد بنابراین به نظر رسید این بخش جایگاه اتصال پروتئین است. بعد از اعتبارسنجی پروتکل داکینگ، بررسی نتایج داکینگ این ترکیبات نشان داد که تمام داروها، با توجه به نتایج بیولوژیک، فضای مشابه را درون جایگاه اتصال گیرنده باحالت‌های اتصال مشابه اشغال می‌کنند. نتایج داکینگ در جداول ۲ و ۳ آورده شده است. دو معیار مهم در تعیین بهترین حالت داک شده، بیشترین (منفی‌ترین) انرژی اتصال آزاد تخمین زده شده و همچنین بیشترین برهم‌کنش‌های مناسب با اسیدآمینه‌های اصلی جایگاه فعال GP و VP40 می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی میان GP و VP40 و ۲۴ داروی مجوزدار به‌منظور دست یافتن به اتصالات

برهمکنش‌های ۲۴ دارو با مجوز FDA که قبلاً طی بررسی‌های عملی مختلف قابلیت مهار ویروس ابولا از طریق آن‌ها به اثبات رسیده است (۱۳)، با اسیدهای آمینه جایگاه اتصال پروتئین‌های GP و VP40 با استفاده از روش شبیه‌سازی داکینگ مولکولی انجام و مورد آنالیز قرار گرفت. نام دارو و مقادیر IC_{50} آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

شبیه‌سازی داکینگ مولکولی توسط نرم‌افزار AutoDock4.2 انجام شد. ژنتیک الگوریتم (genetic algorithm) (GA) به‌عنوان الگوریتم جستجوگر توسط نرم‌افزار مورد استفاده قرار گرفت. برنامه گرافیکی AutoDock Tools 1.5.6 (ADT) برای تهیه، انجام و آنالیز شبیه‌سازی‌های داکینگ مولکولی به کار رفت. در ابتدا، ساختارهای دوبعدی داروها به‌وسیله برنامه ChemDraw Ultra10.0 ترسیم و سپس با استفاده از نرم‌افزار Hyperchem8 در میدان نیروی مکانیک مولکولی (MM+) و روش نیمه تجربی PM3 و الگوریتم Polak-Ribiere از نظر انرژی بهینه شدند. پس از بهینه‌سازی انرژی لیگاند، با استفاده از نرم‌افزار اتوداک تولز اتم‌های هیدروژن به ساختار مولکول افزوده شدند. در مرحله بعد، اتم‌های هیدروژن غیر قطبی در اتم کربن مربوطه ادغام شده و بار الکتریکی گستگیگر (بارهای الکتریکی اتم که به‌صورت تجربی محاسبه می‌گردد) و تعداد درجات آزادی زوایای پیچشی لیگاند با استفاده از نرم‌افزار اتوداک تولز محاسبه گردید. در نهایت فایل لیگاند به‌صورت pdbqt ذخیره شد. ساختارهای کریستالی سه‌بعدی پروتئین‌های GP و VP40 ویروس ابولا از پایگاه بانک داده‌های پروتئین داندلود گردیدند (کد شناسایی GP: 5JQ3 و کد شناسایی VP40: 4LDB) (www.pdb.org). روش انجام داکینگ و آنالیز کانفورمرها بر اساس توضیحات قبلی صورت گرفت (۱۴، ۱۵). در ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Notepat++ و یا Discovery Studio Viewer lite 4.0 مولکول‌های آب از ساختار کریستالوگرافی حذف گردیدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار اتوداک تولز اتم‌های هیدروژن به ساختار کریستالوگرافی افزوده شدند. در مرحله بعد، اتم‌های هیدروژن غیر قطبی در اتم کربن مربوطه ادغام شده و بار الکتریکی کلمن و پارامترهای حلال پوشی ماکرومولکول محاسبه و در نهایت فایل ماکرومولکول به‌صورت pdbqt ذخیره گردید. پس از تهیه فایل‌های ورودی موردنیاز داکینگ (ماکرومولکول، لیگاند و نقشه اتصال)، مطالعات داکینگ به‌منظور مدل‌سازی برهم‌کنش‌های لیگاند-گیرنده، با استفاده از الگوریتمی تحت عنوان ژنتیک لامارکین انجام شد. در مرحله بعد،

جدول ۲- انرژی آزاد اتصال، پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش های هیدروفوب، $\pi-\pi$ و کاتیون- π داروها در پروتئین GP بر اساس نتایج داکینگ مولکولی

نام دارو	انرژی آزاد اتصال (کیلوکالری بر مول)	پیوند هیدروژنی	برهمکنش های هیدروفوبی	برهمکنش های $\pi-\pi$
امیلودیبین	-۷/۴۶	His516, Asn512, Glu106, Trp104	Glu103, Trp104, Ala105, His518, Arg136, Asn514, Asn512, Trp291, Phe290, Leu547, His516, Glu106	-
امودیاکین	-۸/۳۷	Ala105, Tyr214	Glu103, Trp104, Tyr213, Tyr214, Arg136, Cys135, His516, Ala105, Phe290, Asn514, Asn512	Tyr214
بی پردن	-۷/۶۷	His516	Glu106, Asn512, Cys135, Trp104, Asn514, Ala105, Phe290, Glu103, Tyr214, Tyr213, Arg136, Arg136	-
کارپروفن	-۷/۴۱	Tyr214	Glu106, Ala105, Arg136, Cys135, Tyr214, Tyr213, Trp104, His516, Phe290	Tyr214
کلروکین	-۷/۱۲	Glu106	Gly212, Cys135, Arg136, Trp104, Ala105, His516, Asn512, Glu103, Glu71, Asn69, Asn514, Phe290, Tyr213, Tyr214	-
دکس بروم فنیرامین	-۷/۵۵	Ala105	Glu103, His516, Glu106, Phe290, Arg136, Trp104, Cys135, Arg134, Tyr213	His516
دی بوکائین	-۷/۳۶	Glu106, Tyr214	His516, Ala105, Cys135, Tyr213, Phe290, Arg136, Arg134, Gly212, Trp104	-
دیفنوکسیلات	-۹/۱۳	Tyr214	Trp291, Asn512, Glu103, Asn514, Arg136, Arg134, Tyr213, Cys135, Ala105, His516, Trp104, Glu106, Phe290	-
دی فنیل پیرالین	-۷/۰۹	-	Tyr214, Arg136, Arg134, His516, Ala105, Trp104, Xys135, Glu103, Asn512, Glu106, Phe290, Tyr213	Phe290
دی پیوفرین	-۷/۶۰	His516, Trp104, Glu103	Glu71, Phe290, Asn69, Asn512, Leu515, Glu106, Arg136, Ala105, Glu106, Leu547	-
دیریترومایسین	-۴/۳۶	His549, Glu545	Ile544, Tyr517, Gly546, Ser195, Asp192, Lys191, Leu547, Gln551, Met548	-
اریترومایسین	-۵/۸۹	Tyr214, Ser211, His516, Trp104	Arg136, Ala105, Glu106, Tyr213, Gly212, Phe290, Asn514, Asn512, Leu547, Glu545	-
استرادیول	-۷/۹۶	Asn512, Tyr214	Trp291, His516, Arg136, Ala105, Tyr213, Cys135, Trp104, Glu106, Phe290	Phe290
فلوکستین	-۷/۱۶	Trp104	Asn514, Gly72, Asn69, Trp291, Phe290, His516, Asn512, Arg136, Ala105, Glu106, Glu103, Glu71	-
کتوتیفن	-۸/۵۰	Tyr214	Asn512, Phe290, Glu106, Trp104, His516, Arg136, Tyr213, Arg134, Ala105, Cys135	-
لووپروپوکسیفن	-۶/۹۶	Glu106	Gly212, Arg136, His516, Trp104, Cys135, Arg134, Tyr214, Tyr213, Phe290, Ala105	-
مایکوفنولات	-۶/۹۵	Ala105, His516	Tyr213, Cys135, Arg136, Tyr214, Trp104, Glu106, Glu103, Asn514, Asn512, Trp291, Leu515	-
اکسی فن سیکلیمین	-۸/۲۴	His516, Glu106, Trp104	Gly212, Arg136, Ala105, Tyr214, Cys135, Arg134, Tyr213, Asn514, Glu103, Asn512, Phe290	-
پاروکستین	-۸/۱۸	His516, Asn512, Glu106	Asn514, Trp291, Leu547, Phe290, Ala105, Cys135, Arg136, Tyr213, Tyr214, Trp104	-
پن بوتلول	-۷/۲۰	Glu106	Tyr213, Cys135, His516, Tyr214, Arg136, Ala105, Trp104, Phe290	-
پروکلرپرازین	-۷/۸۲	-	Gln251, Arg136, Glu106, Phe290, Trp104, Asn512, Ala105, His516, Leu547, Asn514	-
پروتربتیلین	-۷/۸۹	Glu106	Asn514, Asn512, His516, Glu103, Phe290, Ala105, Trp104, Arg136	-
تورمفین	-۷/۱۵	Trp104	Tyr214, Tyr213, Arg136, Arg134, Cys135, Ala105, Glu103, Glu71, Phe290, Asn512, Asn69, His516, Glu106	Phe290, His516
تری هگزی فنیدیل	-۷/۹۱	Glu106	Tyr214, Trp104, Tyr213, Arg136, Ala105, Cys135, Arg134, His516, Glu103, Asn512, Phe290, Asn514, Tyr213,	-

جدول ۳- انرژی آزاد اتصال، پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش‌های هیدروفوب، π - π و کاتیون- π داروها در پروتئین VP40 بر اساس داکینگ مولکولی

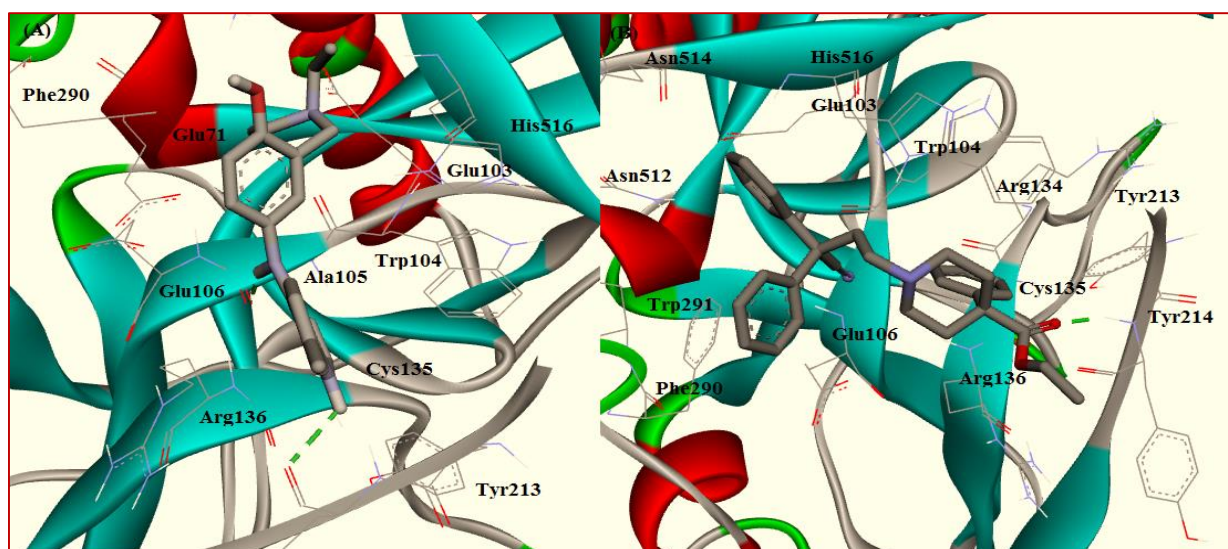
نام دارو	انرژی آزاد اتصال (کیلوکالری بر مول)	پیوندهای هیدروژنی	برهمکنش‌های هیدروفوبی	برهمکنش π - π
آمیلودیپین	-۶/۵۷	His516, Asn512, Glu106, Trp104	Glu103, Trp104, Ala105, His518, Arg136, Asn514, Asn512, Trp291, Phe290, Leu547, His516, Glu106	-
آمودیاکین	-۳/۳۵	Ser316, Leu158	Glu103, Trp104, Tyr213, Tyr214, Arg136, Cys135, His516, Ala105, Phe290, Asn514, Asn512	Tyr214
بی پردین	-۵/۸۷	Arg214	Phe161, Leu158, Phe157, Glu155, Arg148, Ala156, Ser316, Lys212, Cys314, Ser319, Leu213, His315, Pro290	-
کارپروفن	-۷/۴۵	Cys314, Gln155, Arg214	Ser319, Ser316, Leu158, His315, Leu213, Lys212	-

ابولا به سلول میزبان جلوگیری می‌کند. مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد که این دارو به پروتئین GP با پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوب متصل می‌گردد. به‌علاوه در موقعیت کرین شماره ۴ حلقه کینولین یک بخش حجیم متصل است که انتهای این بخش آمین نوع سوم قرار دارد. این بخش با اسیدهای آمینه Asn512, Asn514, His516, Glu71, Glu103, Phe290 و Glu106 برهمکنش‌های هیدروفوب تشکیل می‌دهد. همچنین دارای یک استخلاف کلر در کرین شماره ۷ حلقه کینولین می‌باشند که این استخلاف باعث افزایش لیپوفیلیسته ترکیب می‌شود. ویژگی لیپوفیلیستی بالای داروی آمودیاکین (CLogP برابر ۵/۳۵) می‌تواند روی برهم‌کنش‌های هیدروفوبی با گیرنده و نیز امکان دست‌یابی ویروس (نفوذپذیری غشای سلول میزبان) تأثیر داشته باشد. این دارو علاوه بر برهمکنش‌های ذکرشده قادر به ایجاد برهمکنش π - π است که این اتصال بین حلقه فنیل متصل به موقعیت ۴ حلقه کینولین و حلقه فنیل اسیدآمینه Tyr214 ایجاد می‌گردد. لازم به ذکر است که از بین این چهار دارو، تنها آمودیاکین توانایی برهمکنش π - π را دارد. تعداد پیوندهای قابل چرخش آمودیاکین برابر ۶ است، این ویژگی بر روی خواص فیزیکی‌شیمیایی دارو در تجویز خوراکی (۱۷، ۱۸) و همچنین جهت‌گیری فضایی ترکیب در جایگاه اتصال پروتئین مؤثر است. داروی دیفنوکسیلات به دلیل دارا بودن بخش‌های هیدروفوب (حلقه‌های آروماتیک و حلقه آلیفاتیک) توانایی تشکیل بالای برهمکنش‌های هیدروفوب با اسیدهای آمینه پاکت اتصال را دارد و یک ترکیب کاملاً لیپوفیل با CLogP برابر ۵/۳۳

برقرارشده میان دارو و گیرنده انجام گرفت. در این روش، انرژی پیوندی و انرژی داکینگ محاسبه‌شده از نظر مقداری، هریک به ترتیب مجموعه‌ای از انرژی داخل مولکولی با انرژی داخل مولکولی با انرژی آزاد پیچشی و انرژی داخلی لیگاند است (۱۶). منفی‌ترین $\Delta G_{\text{binding}}$ (انرژی آزاد اتصال). برهم‌کنش‌های مناسب و اتصال محکم با اسیدآمینه‌های اصلی در جایگاه فعال GP برای اغلب ترکیبات فعال مشاهده می‌شود. از میان ترکیبات موردبررسی داروی آمودیاکین (Amodiaquine)، دیفنوکسیلات (Diphenoxylate)، کتوتیفن (Ketotifen) و پاروکستین (Paroxetine) بهترین نتایج داکینگ را بر روی گیرنده GP نشان دادند که مقدار انرژی اتصال آن‌ها به ترتیب -۸/۳۷، -۹/۱۳، -۸/۵۰ و -۸/۱۸ کیلوکالری بر مول گزارش شد. در بررسی که در سال ۲۰۱۳ توسط Madrid و همکاران انجام شد، این دارو در بررسی مهار ورود ویروس ابولا به سلول میزبان با درصد مهار ۹۹ بیشترین خاصیت ضد ابولایی را نشان داده است (۱۳)؛ بنابراین نتایج *in silico* به‌دست‌آمده در این پژوهش با نتایج *in vitro* گزارش‌شده مطابقت دارد. از طرف دیگر، دو داروی دیتروماکسین و اریتروماکسین با انرژی پیوند به ترتیب برابر با -۴/۳۶ و -۵/۸۹ کیلوکالری بر مول کمترین انرژی پیوند را در بین سایر داروها نشان داده‌اند. بررسی داکینگ ترکیبات بر روی VP40، دو داروی کتوتیفن و کلروکینون بالاترین انرژی پیوند را دارند. داروی آمودیاکین دارای اسکلت اصلی حلقه کینولین است که در غلظت ۱۰ میکرومولار با ۹۹ درصد فعالیت از ورود ویروس

نشان می دهد. کتوتیفن نسبت به دیفنوکسیلات دارای ساختار غیرقابل انعطاف پذیر است، بنابراین باوجود برهمکنش های مشابه با اسیدهای آمینه جایگاه اتصال اما انرژی اتصال ضعیف تری نشان می دهد که احتمالاً به دلیل کانفورمر نامناسب در فضای سه بعدی پاکت، باعث تضعیف برهمکنش ها شده است. نتایج محاسبات داکینگ و اثر ضد ابولای داروی پاروکستین همبستگی خوبی با یکدیگر دارند و هر دو مقادیر خوبی را نشان می دهند. داروی پاروکستین در مقایسه با آمودیاکین اثر ضد ابولا و انرژی اتصال ضعیف تری را نشان می دهد. احتمالاً دلیل آن مربوط به هیدروفیلیسیته بالاتر پاروکستین (CLogP برابر با ۴/۲۴ در مقابل ۵/۳۵) و افزایش پیوندهای هیدروژنی با اسیدهای آمینه جایگاه اتصال گیرنده و کاهش نفوذپذیری غشایی این دارو برای

است. مقدار لیپوفیلیسیته این دارو تقریباً برابر با لیپوفیلیسیته داروی آمودیاکین است. به علاوه، این دارو دارای تعداد ۹ پیوند قابل چرخش است که در مقایسه با آمودیاکین ۳ پیوند قابل چرخش بیشتر دارد. با توجه به موارد ذکر شده، بالاترین انرژی اتصال را از بین تمام ترکیبات در نتایج داکینگ، متعلق به داروی دیفنوکسیلات است (انرژی پیوند برابر ۹/۱۳- کیلوکالری بر مول). دیفنوکسیلات برخلاف آمودیاکین، فاقد برهمکنش $\pi-\pi$ است. یکی از تفاوت های مهم این دو دارو در نوع آمین (آمین نوع سوم) است: در دیفنوکسیلات آمین حلقوی و در آمودیاکین آمین زنجیره. غیرقابل انعطاف بودن آمین نوع سوم در دیفنوکسیلات احتمالاً به ضرر سیستم است و این امر می تواند یکی از دلایل کاهش اثر ضد ابولای ترکیب نسبت به آمودیاکین شود.



شکل ۱- بررسی برهمکنش های هیدروفوب و هیدروژنی داروهای آمودیاکین (A) و دیفنوکسیلات (B) با اسیدهای آمینه موجود در جایگاه اتصال گیرنده GP. پیوندهای هیدروژنی با خط چین سبز نشان داده می شوند.

رسیدن به هدف است. به علاوه، ساختار پاروکستین انعطاف پذیری کمتری در مقایسه با ساختار آمودیاکین دارد (تعداد پیوندهای قابل چرخش برابر ۴ در مقابل ۶). از این رو، کانفورمر نامناسب این ترکیب نسبت به آمودیاکین باعث برهمکنش های هیدروفوب ضعیف تر با اسیدهای آمینه جایگاه اتصال گیرنده می شود.

داروهای دیریترومایسین (Dirithromycin) و اریترومایسین (Erythromycin) ضعیف ترین انرژی اتصال را در بین تمام ترکیبات مورد بررسی نشان دادند که احتمالاً ناشی از هیدروفیل بودن ساختار این دو ترکیب (CLogP به ترتیب برای

برهمکنش های داروهای آمودیاکین و دیفنوکسیلات در جایگاه اتصال پروتئین GP در شکل ۱ نشان داده شده است.

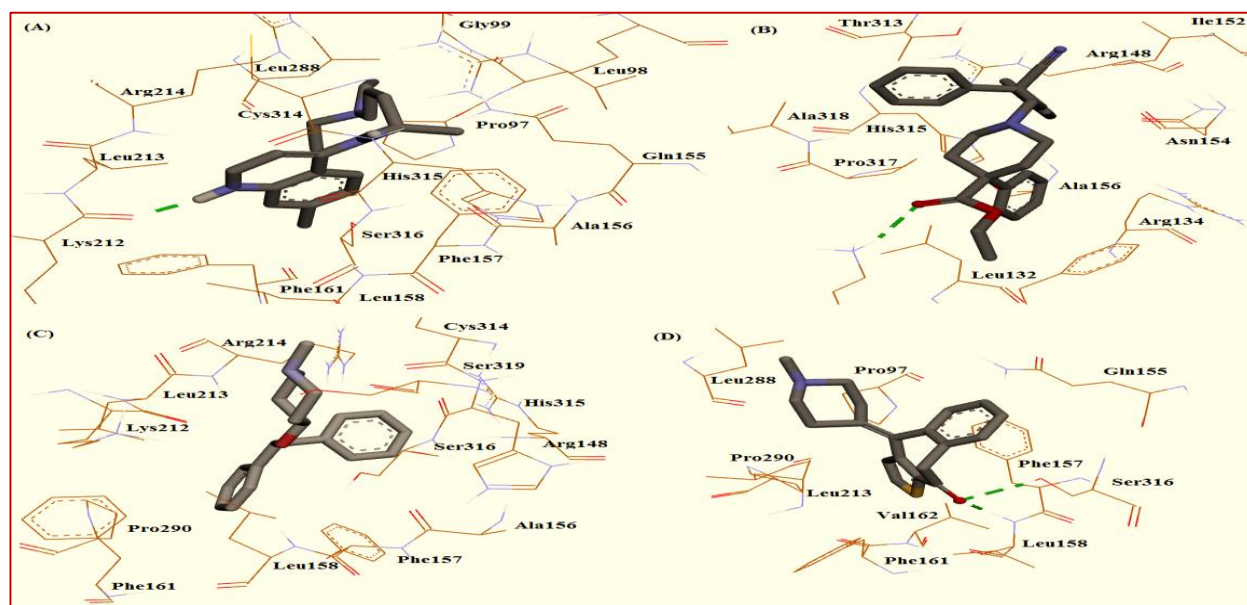
نتایج داکینگ نشان داد برهمکنش های عمده داروی کتوتیفن از نوع هیدروفوب است و تنها توانایی تشکیل یک پیوند هیدروژنی را دارد به همین دلیل از نظر انرژی اتصال بعد از دیفنوکسیلات در مرتبه دوم قرار گرفته است. به علاوه این دارو ساختار کاملاً غیرقابل انعطاف دارد (فاقد پیوندهای قابل چرخش)؛ بنابراین، به دلیل عدم وجود پیوندهای قابل چرخش و وجود آمین نوع سوم حلقوی در مقایسه با آمودیاکین اثر ضد ابولای ضعیف تری را

یا مورد آزمایش قرار نگرفتند و یا اثری نداشتند. از آنجایی که پروتئین VP40 یکی از مهم‌ترین اهداف تکثیر ویروس می‌باشند بنابراین داکینگ این داروها بر روی این پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. بررسی داکینگ این چهار دارو در گیرنده VP40 نشان داد که همگی برهمکنش‌های هیدروفوبی با حفره هیدروفوب جایگاه فعال پروتئین نشان می‌دهند (شکل ۲). دو داروی کلروکین و دی فنوکسیلات علاوه بر برهمکنش‌های هیدروفوب با اسیدهای آمینه جایگاه اتصال، یک پیوند هیدروژنی به ترتیب با اسیدهای آمینه Lys212 و Lys127 تشکیل می‌دهد. داروی دی فنیل پیرالین در ردیف دوم قرار می‌گیرد که تنها برهمکنش‌های هیدروفوبی با اسیدهای آمینه جایگاه فعال نشان می‌دهد و فاقد پیوند هیدروژنی است (شکل ۲ و جدول ۳). داروی کتوتیفن کمترین $\Delta G_{\text{binding}}$ را در نتایج داکینگ با گیرنده VP40 نشان می‌دهد.

مطالعات داکینگ نشان داد که قرار دادن برخی استخلاف‌ها بر

دیریترومایسین و اریترومایسین برابر با $3/46$ و $1/09$ است که نتیجه آن تشکیل تعداد زیاد پیوند هیدروژنی و کاهش برهمکنش‌های هیدروفوب است که به نفع سیستم نیست. داروی اریترومایسین اثر ضد ابولا و انرژی اتصال بیشتری در مقایسه با داروی دیریترومایسین نشان داد. دلیل این امر احتمالاً مربوط به جهت‌گیری فضایی مناسب‌تر این دارو با اسیدهای آمینه جایگاه اتصال است. یکی دیگر از دلایل مهم کاهش انرژی اتصال و اثر ضد ابولای این دو دارو نسبت به داروهای قبلی، افزایش تعداد پیوندهای قابل چرخش است (دیریترومایسین و اریترومایسین به ترتیب برابر با ۱۲ و ۷ است). انعطاف‌پذیری بسیار بالای این داروها باعث جهت‌گیری فضایی نامناسب در جایگاه اتصال گیرنده و به دنبال آن کاهش برهمکنش‌های قوی با اسیدهای آمینه می‌گردد.

در بررسی‌های بیولوژیک درمجموع تمام داروها فعالیت مهار ورود وپروسه ابولا خوب تا قوی نشان می‌دهند که نتایج داکینگ



شکل ۲- بررسی اسیدهای آمینه در گریز در تشکیل پیوند هیدروفوبی و هیدروژنی (پیوندهای هیدروژنی سبز نشان داده شده‌اند) با داروهای کلروکینون (A)، دی فنوکسیلات (B)، دی فنیل بیرالین (C) و کتوتیفن (D) در جایگاه اتصال گیرنده VP40

روی قسمت‌های خاصی از این داروها موجب ایجاد اتصالات هیدروفوبیک یا پیوند هیدروژنی بین ترکیب و گیرنده می‌شوند که این امر قدرت ترکیبات را افزایش می‌دهد.

بررسی رابطه ساختار-فعالیت (SAR) این ترکیبات در پروتئین VP40 و پروتئین GP، نشان داد که وجود حلقه‌های آروماتیک و بخش‌های هیدروفوب، آمین نوع سوم، پیوندهای قابل چرخش و

مولکولی این فعالیت را با نشان دادن برهمکنش‌های داروها با اسیدهای آمینه جایگاه اتصال تأیید می‌کند و قرارگیری تمام ترکیبات را در مکان مشابه اثبات می‌نماید.

در بین داروهای منتخب، تنها چهار داروی کلروکینون، دی فنوکسیلات، دی فنیل پیرالین و کتوتیفن مورد آزمایش مهار تکثیر ویروس ابولا قرار گرفته و جواب مثبت دادند. سایر ترکیبات

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل که در اجرای این پروژه ما را یاری کردند، تشکر به عمل می آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده اند.

پیوندهای هیدروژنی بهینه باعث افزایش قدرت ضد ابولای ترکیب می شود. می توان این طور استنباط کرد که تشکیل پیوند هیدروژنی بهینه و لیپوفیلیسته بالای ترکیب به منظور افزایش برهمکنش های هیدروفوب از عوامل مهم در مهار ورود و تکثیر ویروس ابولا است. این ترکیبات می تواند برای درمان عفونت ویروس ابولا به عنوان یک داروی جدید معرفی شوند.

References

1. Mirza MU, Ikram N. Integrated computational approach for virtual hit identification against ebola viral proteins VP35 and VP40. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1748):1-31.
2. Bandyopadhyay B, Verma N, Chouhan U. In Silico analysis of newly identified potential drug lead compound against VP40 for the treatment of ebola virus infection. *Int J Adv Biotechnol Res*. 2016;7(4):1357-1365.
3. Basu A, Mills DM, Mitchell D, Ndungo E, Williams JD, Herbert AS, et al. Novel small molecule entry inhibitors of ebola virus. *JID*. 2015;212(2):425-34.
4. Li H, Ying T, Yu F, Lu L, Jiang S. Development of therapeutics for treatment of Ebola virus infection. *Microb Infect*. 2015;17(2):109-117.
5. Veljkovic V, Loiseau PM, Figadere B, Glisic S, Veljkovic N, Perovic VR, et al. Virtual screen for repurposing approved and experimental drugs for candidate inhibitors of EBOLA virus infection [version 2; referees: 2 approved]. *F1000Res* 2015;4(34):1-13.
6. World Health Organization. Ebola Situation Reports; <http://www.who.int/csr/disease/ebola/situation-reports/en/> 2016.
7. Setlur AS, Naik SY, Skariyachan S. Herbal lead as ideal bioactive compounds against probable drug targets of ebola virus in comparison with known chemical analogue: A computational drug discovery perspective. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*. 2017;9(2):254-277.
8. Raj Utkarsh, Varadwaj PK. Flavonoids as multi-target inhibitors for proteins associated with ebola virus: in silico discovery using virtual screening and molecular docking studies. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*. 2016;8(2):132-141.
9. Plesko S, Volk H, Luksic M, Podlipnik C. *In Silico* study of plant polyphenols' interactions with VP24-ebola virus membrane-associated protein. *Acta Chim. Slov*. 2015;62(3):555-564.
10. Balmith M, Soliman MES. Potential Ebola drug targets-filling the gap: a critical step forward towards the design and discovery of potential drugs. *Biologia*. 2017;72(1):1-13.
11. Priya JV, Prabha AS, Rajesh SV, Aroulmoji V, Gnanendra TS. High Throughput Screening for Identification of Potent Inhibitors Targeting Ebola Virus Major Matrix Protein VP40. *Int J Adv Sci Eng*. 2015;1(4):10-16.
12. Balmith M, Faya M, Soliman ME. Ebola virus: A gap in drug design and discovery-experimental and computational perspective. *Chem Biol Drug Des*. 2017;89(3):297-308.
13. Madrid PB, Chopra S, Manger ID, Gilfillan L, Keepers TR, Shurtleff AC, et al. A systematic screen of FDA-approved drugs for inhibitors of biological threat agents. *Plos One*. 2013;8(4): e60579.
14. Sepehri S, Gharagani S, Saghale L, Aghasadeghi MR, Fassihi A. QSAR and docking studies of some 1,2,3,4-tetrahydropyrimidines: evaluation of gp41 as possible target for anti-HIV-1 activity. *Med Chem Res*. 2015;24(4):1707-1724.
15. Sepehri S, Soleymani S, Zabihollahi R, Aghasadeghi MR, Sadat M, Saghale L, et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of novel 4-[4-arylpyridin-1(4H)-yl]benzoic acid derivatives as anti-HIV-1 agents. *Chem Biodivers*. 2017;14(12):e1700295.
16. Li F, Li X, Liu X, Zhang L, You L, Zhao J, et al. Docking and 3D-QSAR studies on the Ah receptor binding affinities of polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs). *Environ Toxicol Pharmacol*. 2011;32(3):478-85.
17. Refsgaard HHF, Jensen BF, Brockhoff PB, Padkjaer SB, Guldbrandt M, Chistensen MS. In silico prediction of membrane permeability from calculated molecular parameters. *J Med Chem*. 2005;48(3):805-11.
18. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kapple KD. Molecular properties that influences the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*. 2002;45(12):2615-23.



Original Article

Molecular Docking Study of Anti-viral FDA-approved Drugs as Novel Entry and Replication Ebola Viral Inhibitors

Adhami V, Sepehri S*

Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Received: 05 Aug 2018

Accepted: 03 Jan 2019

Abstract

Background & Objective: Because of the reported high ability of virulence and the lack of appropriate drug of Ebola virus during the last decades, many investigations have been accomplished regarding discovery and the introduction of anti-Ebola drugs. The aim of this research was the bioinformatical study of entry and replication of Ebola viral inhibition by drug repurposing.

Materials & Methods: It is a descriptive-analytic study. In order to investigate the mode of interaction of the compounds with GP and VP40 binding sites, the chemical structures of all compounds were designed using ChemDraw program, then were transferred into Hyperchem software for energy minimization. Molecular docking simulation was accomplished using AutoDock 4.2 program.

Results: Docking results revealed the hydrophobic, hydrogen bond, π - π and π -cation contacts were involved in the drug-protein interactions. Among all the studied drugs, the best docking results were related to Amodiaquine and Diphenoxylate drugs displayed. Actually, this compounds had the most negative $\Delta G_{\text{binding}}$ that indicated suitable modes and favorable interactions with the amino acid residues at the binding site of GP and VP40. The weakest docking results were exhibited for Dirithromycin and Erythromycin drugs due to the high hydrophilic character of them. In general, the presence of hydrophobic portions, tertiary amines, and optimal hydrogen bonds increases the strength of anti-Ebola medications.

Conclusion: According to the results of the molecular docking, the entire FDA-approved drugs revealed a good inhibition effect on entry and replication Ebola viral.

Keywords: Docking, Ebola viral, Drug repositioning .VP40 .GP

*Corresponding Author : Sepehri Saghi, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
Email: sepehri.saghi@yahoo.com
<http://orcid.org/0000-0001-7340-0468>