مقاله پژوهشی

بررسی داکینگ داروهای مجوزدار غیر ویروسی به‌منظور دست‌یابی به مهارکننده‌های 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 عفونت‌زایی و عدم داروی مناسب ویروس ابولا طی سال‌های اخیر، پژوهش‌هایی 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 روش‌ها: این پژوهش به روش توصیفی- تحلیلی انجام گرفت. برای انجام این بررسی بیوانفورماتیکی، در ابتدا ساختار شیمیایی ترکیبات با استفاده از نرم‌افزار ChemDraw Ultra10.0 ترسیم شد سپس به‌منظور بهینه‌سازی انرژی، به نرم‌افزار Hyperchem8 انتقال یافت. مطالعات داکینگ به‌وسیله نرم‌افزار AutoDock4.2 انجام شد و در مرحله نهایی، مورد آنالیز و تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت.

نتایج: یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که پیوندهای درگیر در اتصال دارو با گیرنده‌ها، پیوند هیدروژنی، اتصالات هیدروفوبی، π-π و کاتیون-π می‌باشند. در میان تمام ترکیبات موردمطالعه، بهترین نتایج داکینگ مربوط به داروهای آمودیاکین، دیفنوکسیلات و کلروکینون است. در حقیقت این سه دارو با منفی‌ترین سطح انرژی اتصال تمایل بیشتری برای اتصال به اسیدهای آمینه جایگاه اتصال پروتئین‌های GP و VP40 دارند. ضعیف‌ترین نتایج داکینگ مربوط به دو داروی دیریترومایسین و اریترومایسین است زیرا هیدروفیلیسیته این دو دارو بسیار زیاد است. به‌طورکلی، وجود بخش‌های هیدروفوب، آمین نوع سوم و پیوندهای هیدروژنی بهینه باعث افزایش قدرت ضد ابولای داروها می‌شود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات بیوانفورماتیکی، تمام داروها تأثیرات مهاری خوبی را در جایگاه اتصال گیرنده‌ها از خود نشان می‌دهند و می‌توانند به‌عنوان مهارکننده‌های مؤثر ورود و تکثیر ویروس ابولا مطرح شوند.

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

مقدمه

بیماری ابولا یکی از مرگ‌بارترین بیماری‌های ویروسی در طول تاریخ است که در غرب آفریقا شیوع پیداکرده و به‌شدت در حال انتشار به سایر نقاط جهان است (۱، ۲). انتقال ویروس ابولا عمدتاً از طریق تماس‌های فیزیکی با مایعات بدن افراد آلوده است که منجر به تضعیف سیستم ایمنی، تب خونریزی کننده حاد و درنهایت مرگ میزبان می‌شود (۳). این ویروس نخستین بار در سال ۱۹۷۶ میلادی در کشور کنگو شناخته شد. نام این ویروس از یکی از رودخانه‌های کشور جمهوری دموکراتیک کنگو گرفته شده است. در این سال، ۲۸۴ نفر به این بیماری مبتلا شدند که درنهایت، 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، به‌طوری‌که در گزارش مارس ۲۰۱۶، حدود ۲۸۶۱۰ مورد مبتلا و ۱۱۳۱۵ نفر جان خود را براثر این بیماری مهلک از دست داده‌اند (۶).

*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

ابولا یکی از اعضای خانواده Filoviridae رسته Mononegaviral است. این ویروس با پوشش لیپیدی دارای یک‌رشته 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 ویریون 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 اسیدآمینه دارد و توسط آنزیم فورین سلول میزبان به دو هترودیمر تبدیل می‌گردد (GP1 و GP2) که این دو هترودیمر 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 می‌توانند به‌عنوان دارویی برای جلوگیری از ورود و اتصال ویروس ابولا به سلول موردتوجه قرار گیرند (۹). پروتئین مهم دیگر ویروس ابولا که بسیار موردتوجه است، پروتئین ماتریکس اصلی (Viral matrix protein) (VP40)، فراوان‌ترین پروتئینی که در زیر پوشش ویروسی قرار گرفته که این پروتئین شامل ۳۲۶ اسیدآمینه و وزن مولکولی ۳۵ کیلودالتون دارد و یک نقش حیاتی در حفظ همبستگی ساختاری و بلوغ ویریون بازی می‌کند. در چرخه زندگی ویروس ابولا، این پروتئین نقش‌های دیگری ازجمله، تشکیل ویریون، تنظیم رونویسی ویروسی و همچنین مونتاژ و جوانه‌زنی ویریون‌های بالغ را ایفا می‌کند. VP40 نیز همچون GP به‌عنوان یک هدف خوب برای داروهای ضد ابولا مورد توجه است که مهارکننده‌های آن از تکثیر، مونتاژ و جوانه‌زنی 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 مورداستفاده 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 موردتوجه قرارگرفته و اهمیت زیادی پیدا کرده است. این فرایند، شامل یافتن یک نشانه جدید درمانی برای یک داروی مجوزدار یا به‌عبارت‌دیگر، استفاده از داروها و ترکیبات شناخته‌شده برای درمان بیماری‌های جدید است. این روش یک جایگزین بسیار خوب برای روش‌های کشف و توسعه داروهای de novo (جدید طراحی‌شده) سنتی است. مزیت قابل‌توجه روش drug repositioning بر توسعه داروها به روش‌های سنتی این است که این روش تعداد قابل‌توجهی 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 موردنظر امتیاز داده می‌شود به‌طور گسترده‌ای در کشف، طراحی و بهینه‌سازی ترکیبات رهبر (Lead) کاربرد دارد.

بررسی مهارکننده‌های ویروس ابولا به‌منظور تولید داروی مؤثر برای کاهش مرگ‌ومیر بیماران و بهبود آن‌ها موضوع جدیدی بوده که در سال‌های اخیر موردبررسی 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 موردتوجه بسیار زیاد برای کشف مهارکننده‌ها قرار گرفته است. داروهای موردبررسی در این مطالعه با روش drug repositioning قبلاً بر روی ویروس ابولا به‌منظور 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 طراحی‌شده و همچنین درک واکنش‌ها و فرایندهای بیوشیمیایی مورداستفاده قرار می‌گیرد. به‌علاوه، با این روش‌ها می‌توان به بیان و پیشگویی نحوه اتصال ترکیب به پروتئین هدف،

ارزیابی اختلاف انرژی بین کانفورمرهای مختلف ترکیب و توضیح مکانیسم‌های واکنش و نقش و اثر گروه‌ها و استخلاف‌های مختلف در ساختار شیمیایی ترکیبات و عملکرد آن‌ها بر نحوه اتصال و نهایتاً اثربخشی ترکیب بر پروتئین هدف پرداخت. تاکنون بر روی این داروهای مجوز دار که اثر ضد ابولا نشان داده‌اند مطالعه شبیه‌سازی داکینگ مولکولی در ارتباط با نحوه برهمکنش این ترکیبات با گلیکوپروتئین (GP) و پروتئین ماتریکس اصلی (VP40) موردبررسی قرار نگرفته است؛ بنابراین در این پژوهش، به‌منظور شناخت مکانیسم دقیق عملکرد داروها و شناسایی اسیدهای آمینه درگیر در این فرایند و انرژی بهینه برهمکنش دارو-گیرنده داروهای مختلف بر روی پروتئین‌های GP و VP40 و رابطه استخلاف‌های مختلف ساختار شیمیایی داروها با میزان اثر نشان داده‌شده موردبررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

برای انجام روش داکینگ از نرم‌افزار اتوداک (AutoDock4.2) برای انجام داکینگ مولکولی استفاده شد. بدین منظور نرم‌افزار اتوداک بر روی کامپیوتر ۸ هسته‌ای تحت سیستم‌عامل ویندوز در دانشکده داروسازی اردبیل نصب شد و برای انجام این پژوهش در دی‌ماه سال ۱۳۹۶ مورداستفاده قرار گرفت. در این مطالعه

جدول ۱– نام دارو و مقادیر IC_{50} 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 پریدن	۵۰	–	۹۸
۴	کارپروفن	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	پروتریپتیلین	۱۰	–	۸۳
۲۲	تورمفین	۱۰	–	۹۷
۲۳	دیپی وفرین	۵۰	–	۹۴
۲۴	تری هگزی فنیدیل	۱۰	–	۹۷

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 مورداستفاده 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 ازنظر 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 ادغام‌شده و بار الکتریکی گستیگر (بارهای الکتریکی‌اتم که به‌صورت تجربی محاسبه می‌گردد) و تعداد درجات آزادی زوایای پیچشی لیگاند با استفاده از نرم‌افزار اتوداک تولز محاسبه گردید. درنهایت فایل لیگاند به‌صورت pdbqt ذخیره شد. ساختارهای کریستالی سه‌بعدی پروتئین‌های GP و VP40 ویروس ابولا از پایگاه بانک داده‌های پروتئین دانلود 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 ادغام‌شده و بار الکتریکی کلمن و پارامترهای حلال پوشی ماکرومولکول محاسبه و درنهایت 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، بر اساس حجم مولکولی لیگاندهای طراحی‌شده، شبکه‌ای با ابعاد ۶۰×۶۰×۶۰ آنگستروم در راستای محورهای سه‌گانه مختصات و فاصله نقاط شبکه ۰/۵۷۳ 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 کانفورماسیون‌های مولکول، انواع برهمکنش‌های مولکول با پروتئین شامل برهمکنش‌های هیدروژنی، هیدروفوبی، π-π با اسیدهای آمینه موجود در پاکت اتصال پروتئین‌ها قابل‌مشاهده و تجزیه‌وتحلیل 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 برهم‌کنش‌های لیگاند در جایگاه فعال پروتئین با نتایج حاصل از داکینگ همان لیگاند در مقالات گزارش‌شده مقایسه گردید. داکینگ قوی‌ترین دارو (آمودیاکین) به داخل پروتئین‌ها انجام شد. با بررسی نتایج آن، لیگاند در جایگاه فعال قرار گرفت و برهم‌کنش‌های ضروری با توجه به پژوهش‌های گزارش‌شده 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 VP40می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

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

جدول ۲- انرژی آزاد اتصال، پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش‌های هیدروفوب، π-π و کاتیون-π داروها در پروتئین GP بر اساس نتایج داکینگ مولکولی

نام دارو	انرژی آزاد اتصال (کیلوکالری بر مول)	پیوند هیدروژنی	برهمکنش‌های هیدروفوبی	برهمکنش‌های π-π
امیلودیپین	-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 پریدن	-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 بوتولول	-۷/۲۰	Glu106	Tyr213, Cys135, His516, Tyr214, Arg136, Ala105, Trp104, Phe290	-
پروکلرپرازین	-۷/۸۲	-	Gln251, Arg136, Glu106, Phe290, Trp104, Asn512, Ala105, His516, Leu547, Asn514	-
پروتریپتیلین	-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

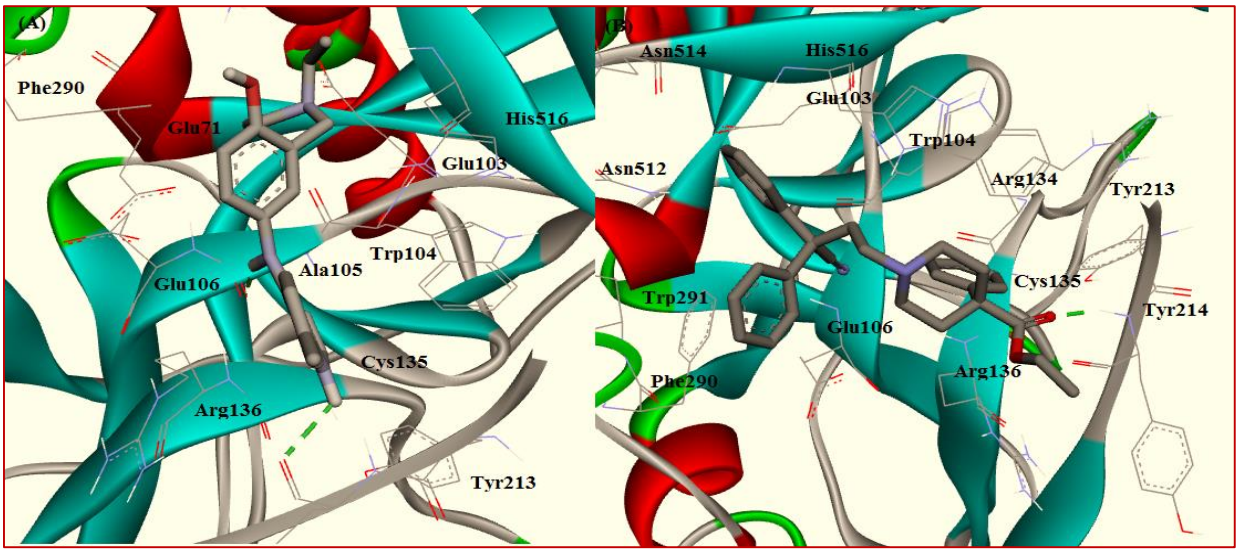
نام دارو	انرژی آزاد اتصال (کیلوکالری بر مول)	پیوندهای هیدروژنی	برهمکنش‌های هیدروفوبی	برهمکنش π-π
آمیلودیپین	-۶/۵۷	His516, Asn512, Glu106, Trp104	Glu103, Trp104, Ala105, His518, Arg136, Asn514, Asn512, Trp291, Phe290, Leu547, His516, Glu106	-
آمودیاکین	-۳/۳۵	Ser316, Leu158	Glu103, Trp104, Tyr213, Tyr214, Arg136, Cys135, His516, Ala105, Phe290, Asn514, Asn512	Tyr214
بی پریدین	-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	-

برقرارشده میان دارو و گیرنده انجام گرفت. در این روش، انرژی پیوندی و انرژی داکینگ محاسبه‌شده ازنظر مقداری، هریک به ترتیب مجموعه‌ای از انرژی داخل مولکولی باانرژی داخل مولکولی باانرژی آزاد پیچشی و انرژی داخلی لیگاند است (۱۶). منفی‌ترین $\Delta G_{binding}$ (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 مهاری 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 دیتروماسین و اریترومایسین باانرژی 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 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 کربن شماره ۴ حلقه کینولین یک بخش حجیم متصل است که انتهای این بخش آمین نوع سوم قرار دارد. این بخش با اسیدهای آمینه Phe290، Glu103، Glu71، His516، Asn514، Asn512 و Glu106 برهمکنش‌های هیدروفوب تشکیل می‌دهد. همچنین دارای یک استخلاف کلر در کربن شماره ۷ حلقه کینولین می‌باشند که این استخلاف باعث افزایش لیپوفیلیسیته ترکیب می‌شود. ویژگی لیپوفیلیسیتی 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 فیزیکوشیمیایی 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

است. مقدار لیپوفیلیسیته این دارو تقریباً برابر با لیپوفیلیسیته داروی آمودیاکین است. به‌علاوه، این دارو دارای تعداد ۹ پیوند قابل چرخش است که در مقایسه با آمودیاکین ۳ پیوند قابل چرخش بیشتر دارد. با توجه به موارد ذکرشده، 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 π-π است. یکی از تفاوت‌های مهم این دو دارو در نوع آمین (آمین نوع سوم) است: در دیفنوکسیلات آمین حلقوی و در آمودیکین آمین زنجیره. غیرقابل انعطاف بودن آمین نوع سوم در دیفنکسیلات احتمالاً به ضرر سیستم است و این امر می‌تواند یکی از دلایل کاهش اثر ضد ابولای ترکیب نسبت به آمودیاکین شود.

نشان می‌دهد. کتوتیفن نسبت به دیفنوکسیلات دارای ساختار غیرقابل انعطاف‌پذیر است، بنابراین باوجود برهمکنش‌های مشابه با اسیدهای آمینه جایگاه اتصال اما انرژی اتصال ضعیف‌تری نشان می‌دهد که احتمالاً به دلیل کانفورمر نامناسب در فضای سه‌بعدی پاکت، باعث تضعیف برهمکنش‌ها شده است. نتایج محاسبات داکینگ و اثر ضد ابولای داروی پاروکستین همبستگی خوبی با یکدیگر دارند و هر دو مقادیر خوبی را نشان می‌دهند. داروی پاروکستین در مقایسه با آمودیاکین اثر ضد ابولا و انرژی اتصال ضعیف‌تری را نشان می‌دهد. 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



شکل ۱- بررسی برهمکنش‌های هیدروفوب و هیدروژنی داروهای آمودیاکین (**A**) و دیفنوکسیلات (**B**) با اسیدهای آمینه موجود در جایگاه اتصال گیرنده GP. پیوندهای هیدروژنی با خط‌چین سبز نشان داده می‌شوند.

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

نتایج داکینگ نشان داد برهمکنش‌های عمده داروی کتوتیفن از نوع هیدروفوب است و تنها توانایی تشکیل یک پیوند هیدروژنی را دارد به همین دلیل ازنظر انرژی اتصال بعد از دیفنوکسیلات در مرتبه دوم قرار گرفته است. به‌علاوه 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 ضعیف‌تری را

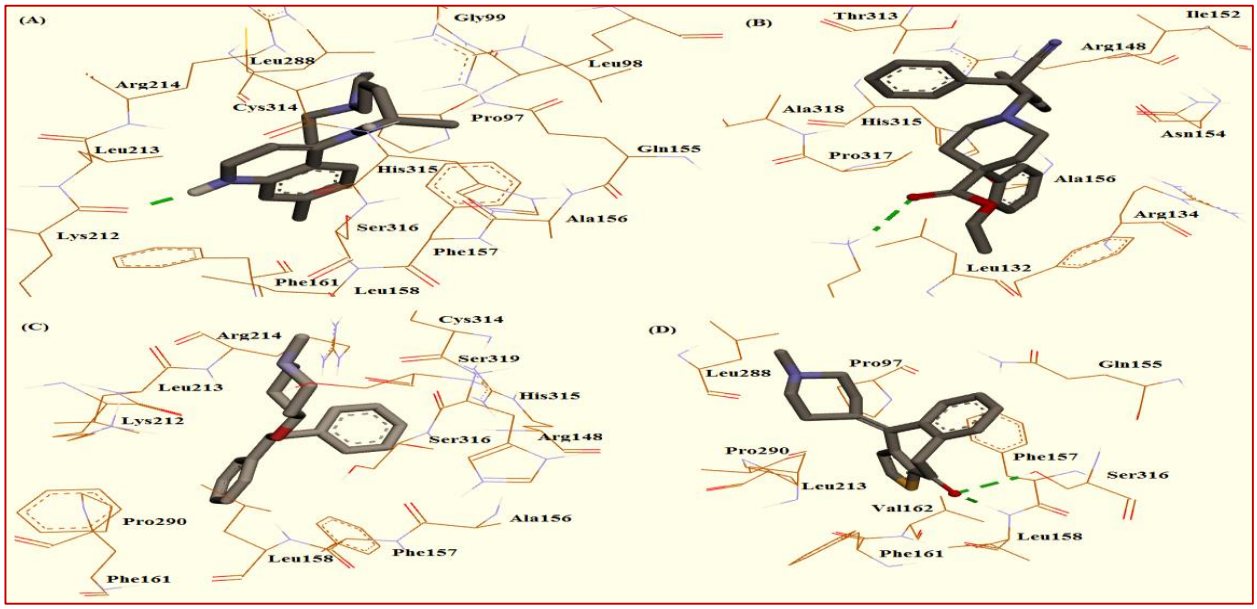
رسیدن به هدف است. به‌علاوه، ساختار پاروکستین انعطاف‌پذیری کمتری در مقایسه با ساختار آمودیاکین دارد (تعداد پیوندهای قابل چرخش برابر ۴ در مقابل ۶). ازاین‌رو، کانفورمر نامناسب این ترکیب نسبت به آمودیاکین باعث برهمکنش‌های هیدروفوب ضعیف‌تر با اسیدهای آمینه جایگاه اتصال گیرنده می‌شود.

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

دیریترومایسین و اریترومایسین برابر با ۳/۴۶ و ۱/۰۹) 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 ویروس ابولا خوب تا قوی نشان می‌دهند که نتایج داکینگ یا مورد آزمایش قرار نگرفتند و یا اثری نداشتند. ازآنجایی‌که پروتئین VP40 یکی از مهم‌ترین اهداف تکثیر ویریون می‌باشند بنابراین داکینگ این داروها بر روی این پروتئین موردبررسی 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 $\Delta G_{binding}$ را در نتایج داکینگ با گیرنده VP40 نشان می‌دهد.

مطالعات داکینگ نشان داد که قرار دادن برخی استخلاف‌ها بر



شکل۲- بررسی اسیدهای آمینه درگیر در تشکیل پیوند هیدروفوبی و هیدروژنی (پیوندهای هیدروژنی با خطچین سبز نشان داده شده‌اند) با داروهای کلروکینون (A)، دی فنوکسیلات (B)، دی فنیل پیرالین (C) و کتوتیفن (D) در جایگاه اتصال گیرنده VP40

مولکولی این فعالیت را با نشان دادن برهمکنش‌های داروها با اسیدهای آمینه جایگاه اتصال تائید 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 قرارگرفته و جواب مثبت دادند. سایر ترکیبات 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

پیوندهای هیدروژنی بهینه باعث افزایش قدرت ضد ابولای ترکیب می‌شود. می‌توان این‌طور استنباط کرد که تشکیل پیوند هیدروژنی بهینه و لیپوفیلیسیته بالای ترکیب به‌منظور افزایش برهمکنش‌های هیدروفوب از عوامل مهم در مهار ورود و تکثیر ویروس ابولا است. این ترکیبات می‌تواند برای درمان عفونت ویروس ابولا به‌عنوان یک داروی جدید معرفی شوند.

تشکر و قدردانی

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

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

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 Sillico 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, Saghaie 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, Saghaie 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 $\Delta G_{binding}$ 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

Journal of Fasa University of Medical Sciences 9 (2019): 1257-1266