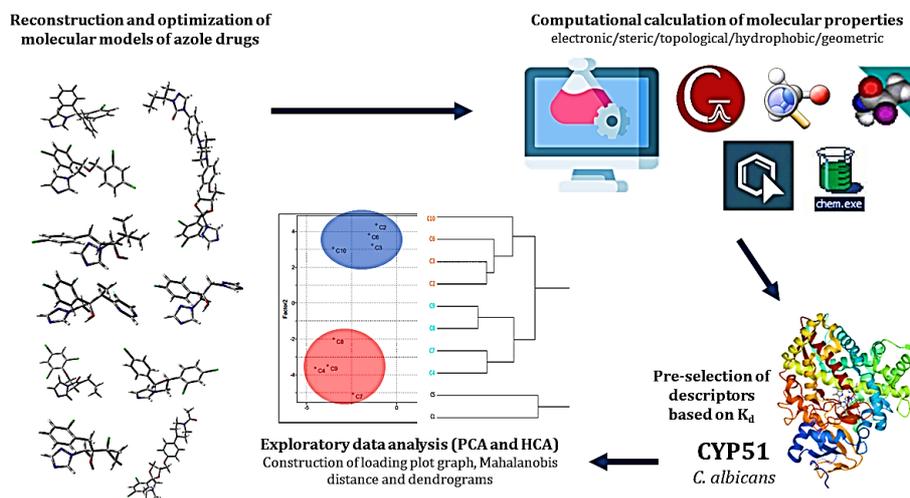


Graphical Abstract



Application of molecular modelling techniques, computational chemistry and chemometrics methods to assess azole drugs, commercially available and used in the treatment of fungal infections, to identify the relationships between chemical structure and calculated molecular properties.

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE FÁRMACOS AZÓLICOS DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES FÚNGICAS: ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE PROPRIEDADES MOLECULARES

Washington R. S. Neto^{1,2*}, Kerly F. M. Pasqualoto³, Alcindo A. dos Santos²

1 – Eurofarma Laboratórios S.A., São Paulo, SP

2 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

3 – Alchemy – Inovação, Pesquisa e Desenvolvimento Ltda., CIETEC/IPEN-USP, São Paulo, SP

* washington.neto@usp.br

Resumo: O mercado global voltado ao desenvolvimento de fármacos com propriedades antifúngicas tem movimentado bilhões de dólares anualmente e espera-se que esse setor mantenha um crescimento anual nos próximos seis anos. O principal fator que incentiva o desenvolvimento desse mercado é o aumento da incidência de infecções fúngicas em todo o mundo. Dentre as diversas classes de antifúngicos já disponíveis comercialmente, os derivados azólicos são os mais amplamente empregados no tratamento de infecções fúngicas devido, principalmente, ao seu amplo espectro de ação, baixo custo, menor efeito tóxico quando comparado a outras classes terapêuticas e boas características farmacocinéticas. No entanto, a exposição prolongada a esses fármacos tem levado ao aparecimento de espécies fúngicas resistentes, fato pelo qual se mantém a necessidade de entender cada vez mais a relação das propriedades moleculares desses fármacos com suas atividades biológicas.

Palavras-chave: fármacos azólicos, infecções fúngicas, avaliação *in silico*, propriedades moleculares.

***In silico* evaluation of azoles drugs commercially available for the treatment of fungal infections:
exploratory analysis of molecular properties**

Abstract: The global market focused on the development of drugs with antifungal properties has been moving billions of dollars annually and this sector is expected to maintain annual growth over the next six years. The main factor that encourages the development of this market is the increased incidence of fungal infections worldwide. Among the many classes of antifungals already commercially available, azole drugs are the most widely used in the treatment of fungal infections, mainly due to their broad action spectrum, low cost, less toxic effect when compared to other therapeutic classes and good pharmacokinetic characteristics. However, the prolonged exposure to these drugs has led to the emergence of resistant fungal species, a fact that maintains the need of a better understanding of the relationships between the molecular properties of these drugs and their biological activities.

Keywords: *azole drugs, fungal infections, in silico evaluation, molecular properties.*

Introdução

O mercado global voltado ao desenvolvimento de fármacos antifúngicos movimentou 11,92 bilhões de dólares em 2018 e calcula-se uma taxa de crescimento anual composta de 1,91% entre os anos de 2019 e 2026, quando o setor deverá alcançar a marca de 13,87 bilhões de dólares. A crescente prevalência de infecções fúngicas é um dos fatores que incentivam o desenvolvimento do setor.¹ Atualmente, há cinco grandes classes de antifúngicos que apresentam diferentes vias de administração, espectro de atividade e propriedades farmacocinéticas: azóis, equinocandinas, polienos, análogos da pirimidina e alilaminas.² Dentre elas, a classe dos azóis têm sido amplamente empregada no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas – o princípio de ação está relacionado com a inibição da enzima *lanosterol 14 α -desmetilase* (CYP51), o que afeta a biossíntese do ergosterol e a constituição/fluidez da membrana celular dos fungos. O seu extenso emprego está associado ao amplo espectro, menores efeitos adversos e versatilidade de apresentação.³⁻⁵ Não obstante, o uso indiscriminado dessa classe de compostos tem levado à identificação de resistência em diversas cepas fúngicas.⁶ Desse modo, modificações moleculares no arcabouço químico de fármacos azólicos têm sido investigadas a fim de se obter candidatos mais promissores no tratamento de infecções fúngicas. O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo desafiador, pois além de caro, requer uma abordagem multidisciplinar. O planejamento racional, difere de outros processos de descoberta por considerar o conhecimento das bases moleculares da doença que se deseja combater para gerar os novos protótipos. A identificação e a definição de alvos moleculares importantes, bem como dos ligantes que interagem com esses alvos, possibilitam o desenvolvimento de protótipos mais seletivos e específicos. Quando as estruturas moleculares tridimensionais (3D) do alvo e/ou do ligante estão disponíveis, a aplicação de estratégias auxiliadas por computador pode ser utilizada para previsão de novas entidades bioativas com características de interesse próximas do ideal.^{7,8} Em geral, utiliza-se a combinação de diferentes métodos de modelagem molecular, química computacional e quimiometria para que as relações entre estrutura química e propriedades moleculares/atividade biológica sejam mapeadas e utilizadas para a previsão de novos candidatos a fármacos.⁸ O objetivo deste trabalho é o de aplicar métodos de modelagem molecular, química computacional e quimiometria para avaliar fármacos azólicos, disponíveis comercialmente e utilizados no tratamento de infecções fúngicas, para identificar as relações entre estrutura química e propriedades moleculares calculadas.

Experimental

Construção de modelos moleculares 3D

Inicialmente, foi realizada uma busca no banco de dados de proteínas, *Protein Data Bank* (PDB - <http://www.rcsb.org>) para a identificação de complexos alvo-ligante, que foram utilizados como

estruturas de referência (moldes) para a construção dos ligantes. Nesta etapa, dez estruturas de fármacos distintos, cristalografados no alvo, foram selecionadas considerando-se organismo de origem, método experimental de caracterização e resolução da estrutura, como critérios de seleção. No programa HyperChem 8.0.7, os modelos moleculares 3D dos ligantes foram reconstruídos e tiveram a geometria otimizada em campo de força empírico MM+ (*Molecular Mechanic*). Em seguida, as cargas atômicas parciais foram calculadas para cada ligante com o método semi-empírico AM1 (*Austin Model 1*), no mesmo programa.

Cálculo de propriedades moleculares

Propriedades moleculares, também chamadas de descritores ou variáveis independentes, de diversas naturezas (eletrônicas, estéricas, topológicas, geométricas e hidrofóbicas), foram calculadas usando diferentes programas computacionais: Gaussian® 03W (versão 6.0), GaussView® (versão 4.1.2), ViewerLite® (versão 5.0), Marvin® (versão 19.9.0) e HyperChem™ (versão 8.0.7).

Filtros ou critérios de pré-seleção das variáveis independentes

Nesta etapa, foram considerados dados de constante de dissociação (K_d) relativos à enzima CYP51 de *Candida albicans* (CaCYP51),^{9,10} que expressam a resposta biológica (interação alvo-ligante). Os valores de K_d foram expressos em concentração molar (C) e linearizados como $\log(1/C)$, para representarem a variável dependente (relacionada à resposta biológica). Dois filtros de pré-seleção de descritores foram considerados: (i) o coeficiente de correlação de Pearson (R) entre cada propriedade calculada e os valores de $\log(1/C)$, e (ii) a inspeção visual dos gráficos de dispersão de cada propriedade calculada (x) e os valores de $\log(1/C)$ (y). Neste estudo, foi considerado um valor de *cutoff* para $R > |0,2|$ e as variáveis independentes que apresentaram boa distribuição e com tendência linear foram selecionadas para compor a matriz final de dados.

Análise exploratória de dados¹¹

A análise exploratória de dados, que compreende a análise de componentes principais (PCA, *principal components analysis*) e a análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA, *hierarchical cluster analysis*) foram realizadas com o programa Pirouette (versão 3.11). Os dados foram autoescalados, já que o conjunto de descritores contava com propriedades calculadas de diferentes ordens de grandeza. PCA é um método de compressão de dados a partir da combinação linear entre as variáveis independentes originais. Novas variáveis, denominadas componentes principais (PC) ou fatores, não correlacionadas entre si, são geradas a partir da projeção das variáveis originais, para representar a redução de dimensionalidade de dados do conjunto investigado. HCA é um método multivariado para calcular e comparar distâncias entre pares de amostras ou de variáveis, que agrupa os dados que apresentem atributos semelhantes. O método de conexão de dados e a distância Euclidiana foram considerados neste estudo. Os valores de distância são transformados em uma matriz de similaridade que varia de 0 (amostras ou variáveis não similares) a 1 (amostras ou variáveis idênticas). Os resultados são expressos em forma de dendrograma.

Resultados e Discussão

Na Figura 1, estão apresentados os modelos moleculares 3D otimizados dos ligantes investigados, que foram utilizados como dados de entrada (*input*) para o cálculo das propriedades moleculares. Calcularam-se 129 variáveis independentes para cada uma das amostras ($n = 10$), totalizando 1290

descritores. A matriz final apresentava 10 linhas (ligantes) e 129 colunas (descritores). Os dados biológicos ($\log I/C$) constavam da última coluna, sendo utilizados na pré-seleção de descritores, a fim de descartar as propriedades com baixa contribuição para a discriminação dos ligantes.

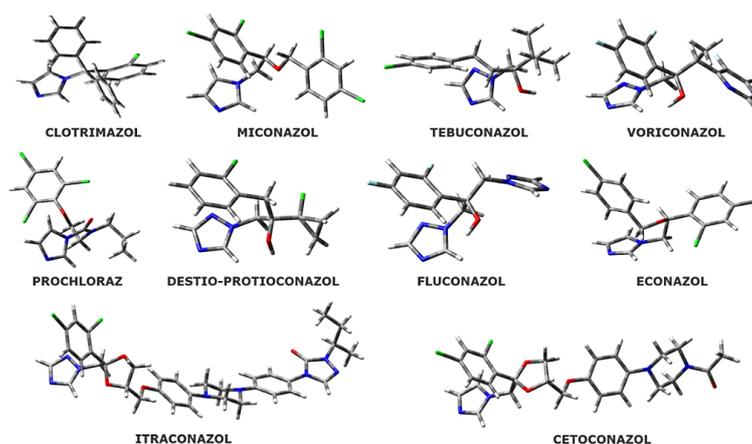


Figura 1 – Modelos moleculares 3D otimizados dos ligantes.

A partir da análise de PCA, verificou-se que as duas primeiras componentes principais (PCs) representavam de forma importante a variância dos dados originais ($PC1 + PC2 = 72,72\%$), sendo $55,27\%$ dos dados discriminados em PC1 e $18,45\%$ em PC2. A Figura 2 ilustra o gráfico de escores gerado com a informação contida nas duas primeiras PCs. Os ligantes foram discriminados em dois grupos principais de acordo com as propriedades calculadas: vermelho (fluconazol, voriconazol, tebuconazol, destio-protioconazol) e azul (clotrimazol, econazol, miconazol, prochloraz). Os dois fármacos mais volumosos, itraconazol e cetoconazol, estão mais separados dos dois grupos.

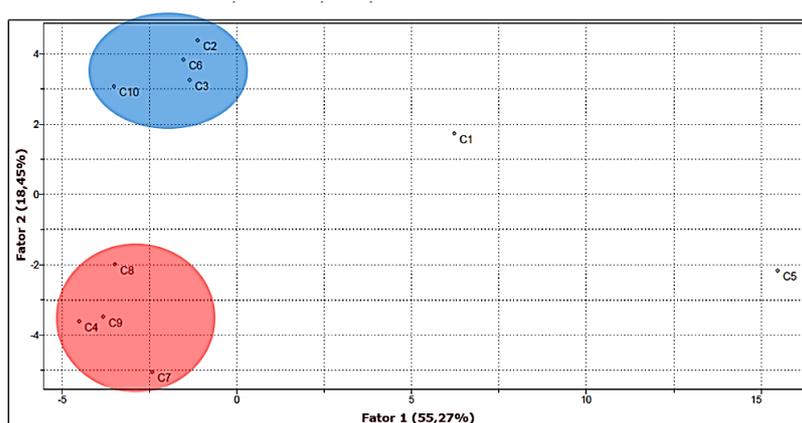


Figura 2 – Gráfico de escores para PC1 ($55,27\%$) e PC2 ($18,45\%$). Grupo vermelho: C4, C7, C8, C9; grupo azul: C2, C3, C6, C10. (C1: cetoconazol; C2: clotrimazol; C3: econazol; C4: fluconazol; C5: itraconazol; C6: miconazol; C7: voriconazol; C8: tebuconazol; C9: destio-protioconazol; C10: prochloraz).

A análise de HCA foi complementar à de PCA. No dendrograma de amostras (Figura 3), os subgrupos A' e A'', que apresentam índice de similaridade de $57,8\%$ e $57,1\%$, respectivamente, correspondem, nesta ordem, aos grupos azul e vermelho do gráfico de escores (Figura 2). Entre os dois subgrupos, a

similaridade foi de 45,3%. O grupo B possui 43,6% de similaridade e, neste grupo, estão os dois fármacos mais volumosos que ficaram distantes dos demais também no gráfico de escores (Figura 2).

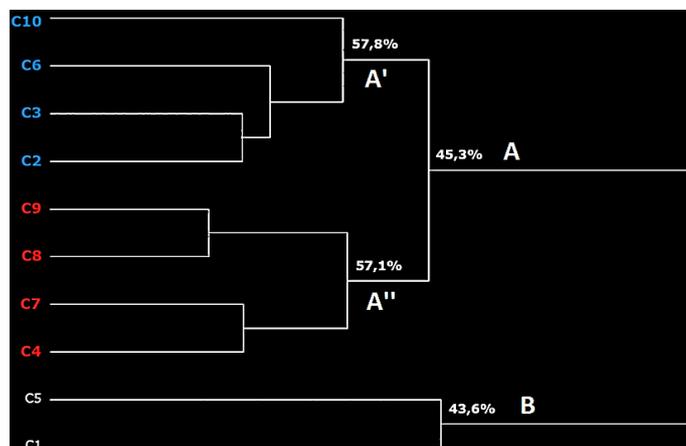


Figura 3 – Dendrograma de amostras. (C1: cetoconazol; C2: clotrimazol; C3: econazol; C4: fluconazol; C5: itraconazol; C6: miconazol; C7: voriconazol; C8: tebuconazol; C9: destio-protioconazol; C10: prochloraz).

A discriminação das amostras ocorre devido à influência de cada descritor nas PCs. Esta influência é atribuída por valores calculados de pesos. Em PC1, os valores maiores de pesos foram para as propriedades estéricas (volume e área superficial) e topológicas (índice de Randic e de Harary). Por outro lado, as propriedades eletrônicas (cargas do potencial eletrostático ChelpG) e geométricas (distâncias/ângulos de ligação) apresentaram maiores valores de pesos em PC2. No dendrograma de variáveis (HCA de variáveis; dado não demonstrado), verificou-se que as propriedades moleculares com maiores valores de pesos, principalmente aquelas relacionadas à PC1, se encontravam agrupadas com a atividade biológica, corroborando a influência demonstrada na discriminação das amostras. Por fim, confirmou-se que todos os compostos se encontravam dentro de um intervalo de confiança de 95% (gráfico de distância de Malahanobis), não sendo identificadas quaisquer amostras atípicas. Este resultado indica que as propriedades moleculares selecionadas representaram de forma satisfatória e apropriada o conjunto de antifúngicos investigado.

Conclusões

Concluiu-se que os métodos de PCA e HCA se mostraram complementares, o que atribuiu maior robustez aos resultados obtidos. A análise exploratória de dados também permitiu a identificação das propriedades moleculares que influenciaram de forma importante a separação dos compostos estudados, sendo a PC1 relacionada às propriedades estéricas e topológicas e a PC2 às eletrônicas e geométricas. Estas observações são importantes na área da química medicinal, servindo como suporte para o estabelecimento de relações estrutura-propriedade/atividade e auxiliando no direcionamento de desenvolvimento de novas entidades químicas com atividades biológicas de interesse.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio recebido pelo Programa de Mestrado Profissional do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e ao apoio dado pela Eurofarma Laboratórios S.A.

Referências

1. <https://www.globenewswire.com/news-release/2020/01/16/1971472/0/en/global-antifungal-drugs-market-is-expected-to-reach-usd-13-87-billion-by-2026-for-markets.html>. Acessado em 12 de outubro de 2020.
2. Campoy, S.; Adrio, J. L. Antifungals. *Biochem. Pharmacol.*, **2017**, 133, 86–96.
3. Odds, F. C. et al. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*, **2003**, 11, 272–279.
4. Carroll, K. C.; Hobden, J. A. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg*, 26ª ed., Lange, São Paulo, **2014**.
5. Murray, P. R. et al. *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier, New York, **2016**.
6. Parker, J. E. et al. Resistance to antifungals that target CYP51. *Journal of Chemical Biology*, 7, 143–161, **2014**.
7. Pasqualoto, K.F.M., Ferreira, A. K. et al. Developing Novel Anticancer Drug Candidates Regarding the Integration of Three Main Knowledge Fields: Computer-Aided Drug Design, Chemical Synthesis, and Pharmacological Evaluation. *J. Drug. Des. Res.*, 4, 1035–1038, **2017**.
8. Mandal, S. et al. Rational drug design. *Eur. J. Pharmacol.*, 625, 90–100, **2009**.
9. Warrilow, A. G. et al. Azole Affinity of Sterol 14-Demethylase (CYP51) Enzymes from *Candida albicans* and *Homo sapiens*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57, 1352–1360, **2013**.
10. Warrilow, A. G. S. et al. Azole binding properties of *Candida albicans* sterol 14- α demethylase (CaCYP51). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54, 4235–4245, **2010**.
11. Ferreira, M. M. C.; *Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações*, Editora Unicamp: Campinas, 2015.