



Moleküler doking metoduyla SARS-CoV-2 MPro enziminin aktif bölgesinin incelenmesi ve borlu ilaç geliştirme imkanının araştırılması

Ahmet Köseoğlu^{1,*}, Emine Kaya¹, Sedat Sürdem²

¹TENMAK - Bor Araştırma Enstitüsü (BOREN), Ankara, 06530, Türkiye

²Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Bilimleri Bölümü, Ankara, 06530, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:

İlk gönderi 7 Temmuz 2021

Kabul 5 Ocak 2022

Online 29 Mart 2022

Araştırma Makalesi

DOI: 10.30728/boron.957434

Anahtar kelimeler:

Ana Proteaz

Bortezomib

COVID-19

Moleküler doking

SARS-CoV-2

ÖZET

COVID-19'a yol açan SARS-CoV-2 virüsünün yapısına yönelik yapılan çalışmalarda, SARS-CoV-2 virüsünün Ana Proteaz enziminin (Mpro) 2002 yılında ortaya çıkan SARS-CoV virüsünün Mpro enzimine %96 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. SARS-CoV ve SARS-CoV-2 için halen ilaç bulunamamış olduğundan geniş spektrumlu antiviral ilaçların geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada, başka hastalıklar için kullanılan FDA (Food and Drug Administration) onaylı antiviral ilaç moleküllerinin ve literatürde yer alan SARS-CoV ve SARS-CoV-2 için *in vitro* biyolojik testlerde aktif olduğu bulunan aday ilaç moleküllerinin Mpro'ya bağlanma enerjileri AutoDock Vina ile hesaplandı. GC-376 kodlu molekülün en düşük bağlanma enerjisine sahip olduğu bulundu (-8,0 kcal/mol). Ayrıca, Mpro'ya kovalent bağlanabilecek bor içeren moleküllerin tasarlanma imkânı araştırıldı. Mpro enziminin aktif kısmında, yan zincirlerinde -OH grubu olan THR24, THR25, SER46 ve SER144 amino asitlerinin, boronik asit grubu içeren ilaç molekülleriyle kovalent bağlanma yapmaya uygun durdukları bulundu. Bor içeren kanser ilacı Bortezomib'in de Mpro'yu inhibe edebileceği öngörüldü ve bağlanma enerjisi hesaplandı (-7,0 kcal/mol). Bortezomib üzerindeki boronik asit grubunun yeri değiştirilerek elde edilecek regioizomerlerinin, Mpro'nun THR24, THR25, SER46 ve SER144 amino asitlerinin -OH gruplarıyla kovalent bağlanmaya elverişli pozisyonlara sahip olmaları ve bu enzimi daha kuvvetli inhibe etmeleri beklenmektedir.

Investigation of active site of SARS-CoV-2 MPro enzyme and potential of boron based drug development by molecular docking method

ARTICLE INFO

Article history:

Received July 7 2021

Accepted January 5, 2022

Available online March 29, 2022

Research Article

DOI: 10.30728/boron.957434

Keywords:

Main protease

Bortezomib

COVID-19

Molecular docking

SARS-CoV-2

ABSTRACT

In researches on the structure of the SARS-CoV-2 virus that leads to COVID-19 it was found that its Main Protease enzyme (Mpro) has 96% similarity to Mpro of SARS-CoV virus that emerged in 2002. Since there are still no drugs for SARS-CoV and SARS-CoV-2 viruses, it is quite important to develop broad spectrum antiviral drugs. In this study, binding energies of FDA (Food and Drug Administration) approved antiviral drug molecules and candidate drug molecules found to be active in *in vitro* biological tests for SARS-CoV and SARS-CoV-2 in the literature to Mpro were calculated by using AutoDock Vina. It was found that GC-376 gave the lowest binding energy (-8.0 kcal/mol). Also, the possibility of designing boron containing drugs, which can covalently bind to Mpro, was investigated. It was also found that amino acids THR24, THR25, SER46 and SER144, which have -OH side chains and placed in the active site of Mpro, are able to form covalent bonds with drug molecules containing boronic acid group. It was also predicted that boron containing cancer drug Bortezomib can also inhibit Mpro and its binding energy was calculated (-7.0 kcal/mol). It is expected that the regioisomers of Bortezomib obtained by changing the place of boronic acid group on it will have better positions to covalently bind to -OH side chains of THR24, THR25, SER46 and SER144 amino acids of Mpro and inhibit the enzyme more strongly.

1. Giriş (Introduction)

2019 yılının sonunda Çin'in Wuhan kentinde, koronavirüs ailesine ait olan yeni bir virüs ortaya çıkarak kısa sürede tüm dünyaya yayıldı [1]. Solunum yolu enfek-

siyonuna neden olan bu virüs, SARS-CoV virüsüne benzerliğinden dolayı SARS-CoV-2 olarak isimlendirilmiş, hastalığa ise COVID-19 denilmiştir [2]. 11 Mart 2020'de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından pandemi ilan edilen COVID-19 [3], sebep olduğu sağlık

*Corresponding author: ahmetkoseoglu@yahoo.com

krizi ve ekonomiye olan ağır etkisiyle hayatımızı olumsuz yönde etkilemeye devam etmektedir.

COVID-19 ile mücadele edebilmek için hem tedavi hem de korunma yöntemlerinin geliştirilmesi oldukça önem arz etmektedir. Bor Araştırma Enstitüsü (BOREN), geliştirdiği bor içerikli el dezenfektanı BOREL ve virüsün hava yoluyla bulaşmasını azaltacak hava dezenfektanı BORTAM ile hastalığın daha hızlı yayılmasını engellemek için katkı sağlamıştır. Korunma yöntemleri hastalığın yayılma hızını düşürse de etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi elzemdir.

Hızla yayılan ve ağır sonuçlara neden olan COVID-19'un tedavisi için bilim dünyası yoğun çaba sarf etmektedir. 2020 yılı sonu itibari ile FDA (Food and Drug Administration) ve EMA (European Medicines Agency) tarafından onaylanan aşılardan ulaşılabilir olması gelecek için umut verici olsa da bu aşılardan tüm dünya nüfusuna kısa sürede uygulanması mümkün değildir. Ayrıca, virüsün mutasyona uğraması aşının etkinliğinin azalmasına da yol açabileceğinden acil olarak ilaç geliştirilmesi zorunludur.

COVID-19'a yol açan SARS-CoV-2 virüsünün ana proteaz enziminin (MPro) 2002 yılında ortaya çıkan SARS-CoV virüsünün MPro enzimine %96 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir [4]. MPro enzimi, viral RNA'nın insan hücresinde sentezlettiği polipeptinleri parçalayarak fonksiyonel viral proteinler oluşmasına neden olur ve bu sayede virüs çoğalır. Bu nedenle MPro enziminin inhibe edilmesi viral replikasyonu engelleyeceğinden ilaç geliştirmede bu enzim çok kuvvetli bir hedeftir.

Literatürde SARS-CoV virüsünü hedef alan çalışmalar bulunmaktadır [5,6]. SARS-CoV virüsü sadece uzak doğu ülkelerini etkilediği ve varlığı kısa sürdüğü için bu konuda ilaç geliştirme çalışmaları da daha fazla sürdürülmemiştir. Ancak, SARS-CoV virüsünün MPro enzimini inhibe edebilecek bir ilaç geliştirilmiş olsaydı günümüzde yaşadığımız pandemiyi seyri değişebilirdi. İleride ortaya çıkabilecek benzer ve belki daha da ölümcül olabilecek virüslere karşı etkin olabilecek geniş spektrumlu antiviral ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Yeni ilaç geliştirmek çok uzun süren bir proses olduğu için var olan ilaçların yeniden konumlandırılmasına (drug repurposing) öncelik verilmektedir. Bu çalışmada, başka hastalıklar için kullanılan FDA onaylı antiviral ilaç moleküllerinin ve literatürde yer alan bazı SARS-CoV ve SARS-CoV-2 için *in vitro* biyolojik testlerde aktif olduğu bulunan aday ilaç moleküllerinin MPro'ya bağlanma enerjileri AutoDock Vina programı [7] ile hesaplandı. Bağlanma enerjisi ve biyolojik aktivitesi iyi çıkan moleküllerin ağır semptom gösteren hastalarda değerlendirilmesi hayati önem taşımaktadır. En düşük bağlanma enerjisine sahip ilaç moleküllerinin MPro ile etkileşimleri de incelenerek COVID-19'a karşı potansiyel ilaç olarak kullanılabilir olanlar önerildi. Ayrıca COVID-19'a karşı bor içeren ilaç tasarımı imkanı-

nı göstermek için MPro enzimin aktif kısmı incelendi. Bor içeren Bortezomib kanser ilacının da yapı olarak MPro'yu inhibe edebileceği öngörülerek bağlanma hesaplaması yapıldı.

2. Malzemeler ve Yöntemler (Materials and Methods)

Literatürden alınan ilaç moleküllerinin MPro'yu inhibe etme potansiyelini incelemek için açık bir kaynak olan AutoDock Vina programı kullanılmıştır. Bu program ile MPro'nun kristal yapısını detaylı olarak incelemek mümkündür. Bu sayede enzimin aktif kısmındaki amino asitlerin yan zincirlerindeki grupların özellikleri incelenerek bu amino asitlerle uyumlu hidrofilik, hidrofobik, polar, apolar, Hidrojen bağı, π -istiflenmesi, halojen bağı [8] gibi etkileşimlerle enzime iyi bağlanan aday ilaç molekülleri tasarlanabilir. Cl, Br ve I atomlarının oksijen ve azot atomlarına yaptıkları (C-X)-O ve (C-X)-N etkileşimlerinden doğan zayıf bir bağ olan halojen bağının gücü hidrojen bağına yaklaşmaktadır. Anizotropik yük dağılımı sonucu (C-X) eksenini boyunca halojen atomlarının uç noktaları kısmi pozitif bir yüke sahip olup, oksijen ve azot atomlarına yaklaştıklarında halojen bağı yapmaktadırlar. Tek-nokta hesaplamaları sonucu d(X·O) uzunluklarının halojen ve oksijen atomlarının yarıçapları toplamından çok daha kısa oldukları bulunmuştur. Halojen bağlarının gücü Cl < Br < I \approx H şeklinde değişmektedir. (C-X)-O açısı genel olarak 180°'ye yaklaşmakta olup bu açı çok düzenli biyolojik sistemlerde daha çok değişkenlik göstermektedir. Halojen bağı her ne kadar zayıf bir bağ olsa da biyolojik sistemlerde moleküllerin bağlanma konformasyonlarını belirleyici bir öneme sahiptir. Aday ilaç moleküllerinin enzime bağlanma şekilleri ve enerjileri hesapsal kimya yöntemleriyle tespit edilebilir. AutoDock Vina özellikle moleküllerin bağlanma şekillerini oldukça iyi hesaplayabilmektedir. Bağlanma enerjileri ve şekilleri iyi çıkan moleküller üzerinde değişiklikler yapılarak tekrar bağlanma enerjileri hesaplanabilir. Böylece iterasyon yoluyla, en iyi sonuç veren moleküller daha da fonksiyonlaştırılarak ilaç adayı haline getirilebilir.

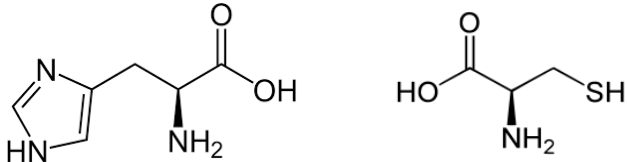
3. Sonuçlar ve Tartışma (Results and Discussion)

3.1. Hedef Enzimin Analizi (Analysis of the Target Enzyme)

SARS-CoV-2 virüsünün proteinlerinin yapıları ile ilgili bilgilere Protein DataBank (PDB) üzerinden ulaşmak mümkündür. MPro enziminin farklı çözünürlüklerde X-ray yapıları rapor edilmiştir. En yüksek çözünürlüklü MPro yapılarından biri 6YB7 kodlu 1,25Å çözünürlüğündeki ligandsız MPro X-ray kristal yapısıdır [9]. Bu çalışmada da bu yapı kullanılmıştır.

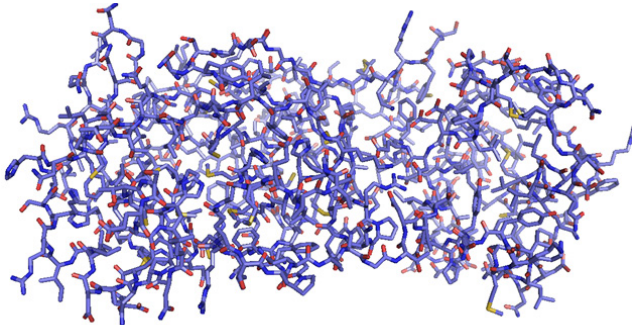
MPro enziminin aktif bölgesi, enzimin katalitik özelliğinden sorumlu Histidin (HIS41) ve Sistein (CYS145) amino asitlerinin yer aldığı bölgedir (Şekil 1).

6YB7 kodlu MPro enziminin yapısı AutoDock programında açılarak enzimin her tarafındaki su ve DMSO solvent molekülleri silindi ve enzim pdb. formatında



Şekil 1. Histidin ve Sistein amino asitlerinin yapıları (Structures of Histidine and Cysteine amino acids).

tekrar kaydedildi. MPro enziminin yapısı Şekil 2'de gösterilmiştir.

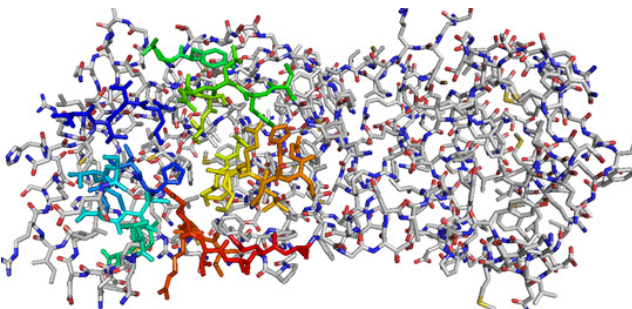


Şekil 2. COVID-19 virüsü ana proteaz enzimi (MPro) (COVID-19 virus main protease enzyme).

Daha sonra HIS41 ve CYS145 amino asitlerini çevreleyen bölgedeki amino asitler tek tek seçilerek bu bölge aktif kısım olarak belirlendi (Şekil 3 ve Şekil 4).

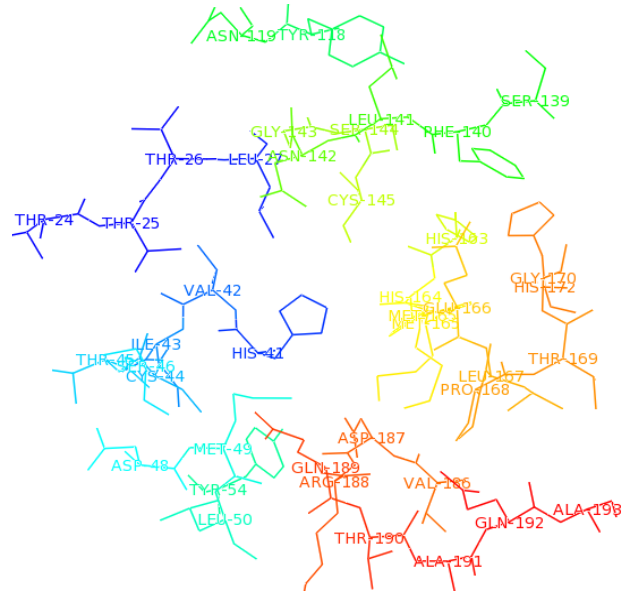
Aktif bölge içerisinde yer alan toplam 40 tane amino asit şunlardır: THR24, THR25, THR26, LEU27, HIS41, VAL42, ILE43, CYS44, THR45, SER46, ASP48, MET49, LEU50, TYR54, TYR118, ASN119, SER139, PHE140, LEU141, ASN142, GLY143, SER144, CYS145, HIS163, HIS164, MET165, GLU166, LEU167, PRO168, THR169, GLY170, HIS172, VAL186, ASP187, ARG188, GLN189, THR190, ALA191, GLN192, ALA193.

Aktif bölge belirlendikten sonra, proteinin yapısı grafik özellikleri iyi olan PyMol programında açılarak incelendi. Şekil 3'deki gibi renklendirilerek tespit edilen bu 40 tane amino asitin oluşturduğu aktif kısım Şekil 4'te



Şekil 3. MPro enzimi ve aktif bölge. Aktif bölgedeki amino asitler sarı, mavi, yeşil, turuncu, kırmızı ile renklendirilmiştir (MPro enzyme and active site. Amino acids placed in the active site were colored as, yellow, blue, green, orange, and red).

daha yakından gösterilmiştir. Aktif kısmın merkezinde MPro enziminin katalitik aktivitesinden sorumlu HIS41 (mavi) ve CYS145 (sarı) amino asitleri görülmektedir.



Şekil 4. MPro enziminin aktif bölgesi ve enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu HIS41 (mavi renkli) ve CYS145 (yeşil renkli) amino asitleri (Active site of MPro enzyme and amino acids HIS 41 (blue) and CYS 145 (green), which are responsible for catalytic activity of enzyme).

3.2. Literatürdeki Moleküllerin MPro'ya Bağlanmalarının Hesaplanması (Calculation of Binding Energies of Molecules in Literature)

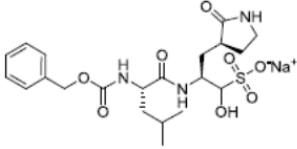
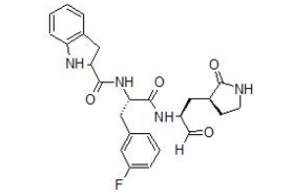
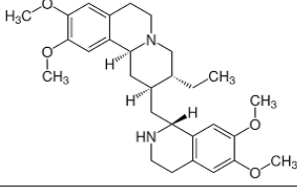
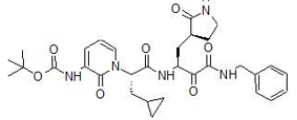
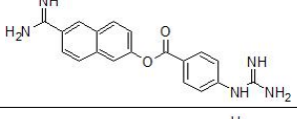
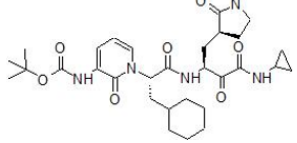
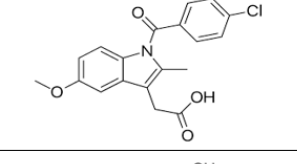
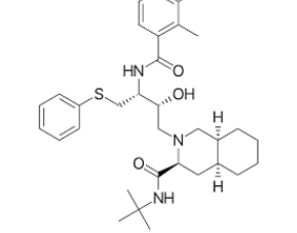
Kapsamlı literatür taraması yapılarak, şu ana kadar COVID-19 virüsüne karşı *in vitro* biyolojik testlerde aktif olduğu bulunan aday ilaç moleküllerinin ve başka bir amaç için kullanılan FDA onaylı antiviral ilaç moleküllerinin MPro'ya bağlanma enerjileri AutoDock Vina ile hesaplanmıştır. *In vitro* biyolojik testlerde aktif olduğu belirlenen moleküllerin aktiviteleri, her molekülün çalışmasına ait referans numarası ve bu 25 molekülün MPro enzime bağlanma enerjileri Tablo 1'de verilmiştir.

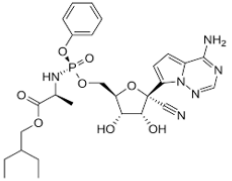
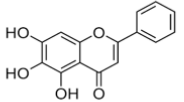
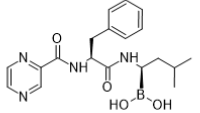
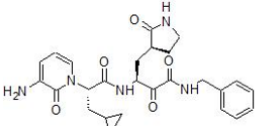
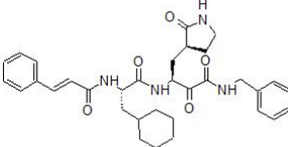
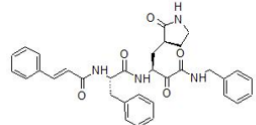
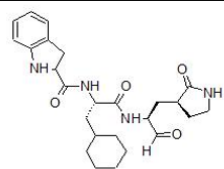
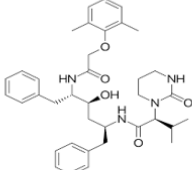
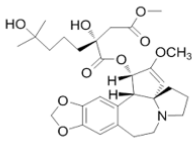
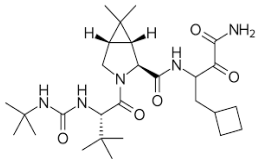
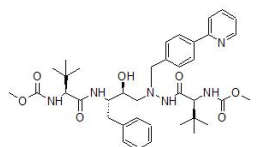
Bu moleküllerin COVID-19 biyolojik aktivitelerini değerlendirmek için EC_{50} ve IC_{50} değerleri gereklidir. Aday ilaç molekülün biyolojik aktivitesi, virüsün hücre içindeki çoğalmasını engellemek şeklinde ölçülmüşse EC_{50} olarak; virüsün izole edilmiş MPro enziminin katalitik aktivitesini engellemek şeklinde ölçülmüşse IC_{50} olarak raporlanır. EC_{50} değeri ölçülürken virüsün tamamı üzerinden bir inhibisyon var mı diye bakılırken, IC_{50} için ise yalnızca virüsün izole edilmiş MPro proteininin aktivitesini engelleyip engellemediğine bakılır. Yani, EC_{50} değeri iyi olan bir aday ilaç molekülü virüsün içine girdikten sonra MPro enzime bağlanıp engelleme gerçekleştirebildiği gibi, virüsün diğer enzimlerine de bağlanabilir. Bir ilaç molekülü için EC_{50} ve IC_{50} konsantrasyon değerleri ne kadar düşük olursa, o kadar iyi inhibe ettiği anlamına gelir.

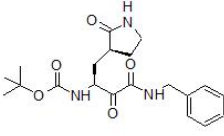
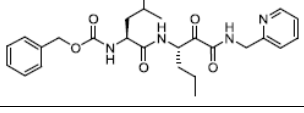
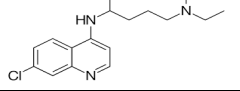
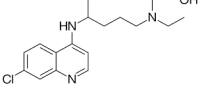
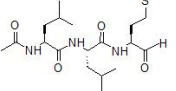
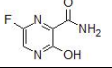
Tablo 1'de moleküller bağlanma enerjilerine göre sıralanmıştır. Bu moleküllerin yapılarıyla bağlanma enerjileri karşılaştırıldığında MPro'ya iyi bağlanan moleküllerin geniş hacimli moleküller olduğu; zayıf bağlananların ise küçük hacimli moleküller olduğu görülmektedir. MPro enzimine en iyi bağlanan molekül

-8,0 kcal/mol bağlanma enerjisiyle 1 numaralı GC-376 molekülüdür. Bu molekülün MPro enzimine kovalent olarak bağlandığı X-ray yapısı 7JSU koduyla rapor edilmiştir [22]. Bu kovalent bağ bütün etkileşimlerden kuvvetli olduğu için, X-ray yapısında görülen molekülün konformasyonu diğer etkileşimlerden çok kovalent

Tablo 1. Literatürde SARS-CoV ve SARS-CoV-2 virüslerine karşı biyolojik testlerde aktif olduğu belirlenen moleküllerin yapıları, biyolojik aktiviteleri ve bu çalışmada hesaplanan SARS-CoV-2 MPro enzimine bağlanma enerjileri (The structures and the biological activities of the molecules that are found to be active in biologicals tests in literature and their SARS-CoV-2 Mpro binding energies calculated in this work).

No	Bileşik (referans makaledeki ismi veya kodu)	Molekül Yapısı	Literatürdeki SARS-CoV-2'ye karşı Biyolojik Aktivitesi	Literatürdeki SARS-CoV' a karşı Biyolojik Aktivitesi	Ref	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
1	GC-376		IC ₅₀ =0,030 ± 0,008 µM		10	-8,0
2	11b		IC ₅₀ =0,040 ± 0,002 µM		11	-7,6
3	Emetine hydrochloride		EC ₅₀ =0,46 µM		12	-7,4
4	13b		IC ₅₀ = 0,67 ± 0,18 µM	IC ₅₀ = 0,90 ± 0,29 µM	13	-7,3
5	Nafamostat		EC ₅₀ =10 nM		14	-7,3
6	13a		IC ₅₀ =2,39 ± 0,63 µM		13	-7,2
7	Indometacin		IC ₅₀ =1 µM		15	-7,2
8	Nelfinavir		EC ₅₀ =1,13 µM		16	-7,2

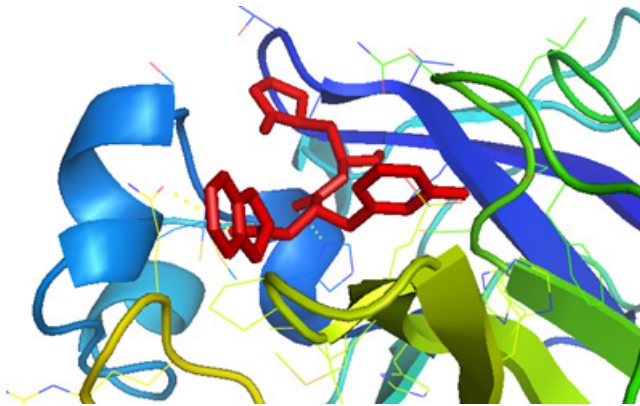
No	Bileşik (referans makaledeki ismi veya kodu)	Molekül Yapısı	Literatürdeki SARS-CoV-2'ye karşı Biyolojik Aktivitesi	Literatürdeki SARS-CoV' a karşı Biyolojik Aktivitesi	Ref	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
9	Remdesivir		EC ₅₀ =23,15 µM		12	-7,2
10	Baicalein		IC ₅₀ =0,39 ±0,12 µM		17	-7,1
11	Bortezomib				18	-7,0
12	14b		Neredeyse İnaktif		13	-7,0
13	11r		IC ₅₀ =0,18 ± 0,02 µM		13	-6,9
14	11a			IC ₅₀ = 1,95 ± 0,24 µM	19	-6,9
15	11a		IC ₅₀ =0,053 ± 0,005 µM		11	-6,9
16	Lopinavir		EC ₅₀ =26,63 µM		12	-6,8
17	Homoharringtonine		EC ₅₀ =2,55 µM		12	-6,8
18	Boceprevir		IC ₅₀ =4.13 ± 0,61 µM		10	-6,7
19	Atazanavir		EC ₅₀ =2,0 ± 0,12 µM		20	-6,5

No	Bileşik (referans makaledeki ismi veya kodu)	Molekül Yapısı	Literatürdeki SARS-CoV-2'ye karşı Biyolojik Aktivitesi	Literatürdeki SARS-CoV' a karşı Biyolojik Aktivitesi	Ref	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
20	11f			IC ₅₀ > 50 µM	19	-6,3
21	Calpain İnhibitörü XII		IC ₅₀ =0,45 ±0,06 µM		10	-6,0
22	Chloroquine		EC ₅₀ =2,71 µM		21	-6,0
23	Hydroxy Chloroquine		EC ₅₀ =4,51 µM		21	-5,7
24	Calpain İnhibitörü II		IC ₅₀ =0,97 ± 0,27 µM		10	-5,4
25	Favipiravir		EC ₅₀ >100 µM		12	-4,5

bağa göre belirlenmiştir. Bu nedenle molekülün fenil halkası herhangi bir etkileşim gösteremediği bir pozisyonda durmaktadır.

MPro enzimine ikinci en iyi bağlanan molekül ise -7,6 kcal/mol bağlanma enerjisiyle 11b kodlu bileşiktir. Bu molekülün MPro enzimi ile etkileşimi Şekil 5'teki gibidir.

Şekil 5'te ortada kırmızı renk ile gösterilen molekülün, enzimin HIS41 (ortada, mavi) ve CYS145 (ortada, turuncu) amino asitlerini içeren aktif kısmının üstüne oturduğu görülmektedir. Molekülün enzimin aktif kısmındaki pozisyonu daha detaylı incelendiğinde, molekül üzerindeki fenil, benzoinol ve indolin halkalarının adeta ters çevrilmiş bir üçayak şeklinde aktif kısma



Şekil 5. 11b kodlu molekülün (kırmızı) MPro enziminin aktif kısmıyla etkileşimi (Interaction of 11b coded molecule (red) with the active site of MPro enzyme).

yerleştiği görülmektedir. Bu aday ilaç molekülünün MPro enzimine karşı biyolojik aktivitesi IC₅₀=40nM ile ilaç olmaya yakın bir konsantrasyon olarak rapor edildiğinden, bu bileşik ve türevleri ilaç olmak için umut vadetmektedirler.

IC₅₀ değerleri rapor edilen diğer moleküller için MPro enzime bağlanma enerjileri -7,3 kcal/mol ile -6,7 kcal/mol arasındadır (24 no'lu Calpain İnhibitörü II hariç). Bu bağlanma enerji aralığındaki moleküllerin biyolojik aktivitesi de iyi olduğundan, yeni ilaç tasarlarken -6,7 kcal/mol ve aşağı çıkan moleküller hedef olarak önerilebilir. Bortezomib de -7,0 kcal/mol bağlanma enerjisi ile bu moleküllerden biridir.

3.3. Bortezomib ve Regioizomerlerinin MPro Enzimini İnhibe Edebilme Kapasitelerinin ve Borlu İlaç İmkanının İncelenmesi (Investigation of MPro Enzyme Inhibition Capacities of Bortezomib and Its Regioisomers and Possibility of Boron Containing Drug)

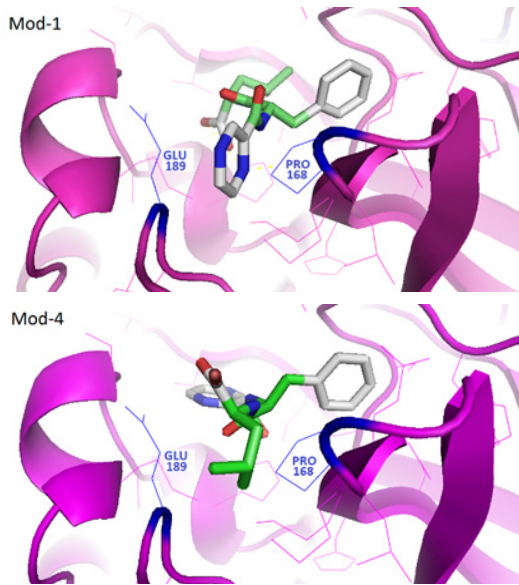
Boronik asit içeren moleküllerin bor atomu üzerinden -OH grubu içeren moleküllerle borat esterleri yoluyla kovalent bağ yaptığı bilinmektedir [23]. Borun bu kovalent bağ yapabilme kabiliyetinden dolayı, borlu ilaç tasarımı yaygın olarak yapılmaktadır. Boronik asit grubu içeren Bortezomib kanser tedavisinde kullanılan FDA onaylı bir ilaçtır. Bortezomib'in yapısı incelendiğinde, bu çalışmada hedef olarak seçilen MPro enziminin aktif kısmına oturmaya uygun bir geometriye sahip olduğu görülmüştür. AutoDock Vina ile yapılan hesaplama, bağlanma enerjisini -7,0 kcal/mol olarak vermiştir (Tablo 1).

Bortezomib'in gerek bağlanma enerjisinin iyi seviyede çıkması gerekse aromatik halkalarının ve hidroforbik izobütil grubunun oluşturduğu geometrisinin MPro enziminin aktif kısmına oturmaya elverişli olması nedeniyle bağlanma modları daha detaylı incelendi. Hesaplama sonucunda elde edilen Bortezomib'in 9 ayrı konformerleri için bağlanma enerjileri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Bortezomib'in farklı modlarının MPro'ya bağlanma enerjileri (MPro binding energies of different modes of Bortezomib).

Mod	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
1	-7,0
2	-6,7
3	-6,6
4	-6,6
5	-6,4
6	-6,2
7	-6,1
8	-6,1
9	-6,1

Bortezomib'in bu modlarının MPro'ya bağlanma şekilleri incelenerek, PRO168 ile GLU189 amino asitlerinin arasında kalan hidroforbik cebe nasıl girdiklerine bakıldı (Şekil 6). Bu cep hidroforbik olduğundan Bortezomib'in izobütil grubunun bu bölgeye girmesi beklenmektedir. Ancak, enerjisi en iyi konformer olan Mod-1'in (-7,0 kcal/mol) izobütil grubunun bu bölgeye girmediği görüldü. Bortezomib'in diğer modları incelendiğinde, Mod-4 ve Mod-7 konformerlerinin izobütil gruplarının bu hidroforbik cebe girdikleri görüldü. Bu iki konformerden bu bölgeye en iyi Mod-4 oturmaktadır.



Şekil 6. Bortezomib'in Mod-1 ve Mod-4 konformerlerinin MPro enzimine bağlanmaları (Binding poses of Mod-1 and Mod-4 conformers of Bortezomib to MPro).

Bu konformerlerde boronik asit grubunun yakınında, bor atomunun kovalent bağ yapabileceği, yan zincirleri -OH içeren amino asitler (serin ve treonin) bulunmaktadır. Dolayısıyla boronik asit grubunun pozisyonu değiştirilerek, enzimin aktif kısmında -OH yan grubu içeren amino asitler olan Serin ve Treonin amino asitleri ile kovalent bağ yapabilecek Bortezomib regioizomerleri tasarlanabilir. Aktif bölgede bulunan Serin ve Treonin amino asitleri ise şunlardır: THR24, THR25, THR26, THR45, SER46, SER139, SER144, THR169, THR190. Bu amino asitlerin yan zincirlerinde -OH grubu olmakla beraber, sadece THR24, THR25, SER46 ve SER144 amino asitlerinin yan zincirleri aktif bölgenin iç kısmına doğru bakmakta olup, diğerlerinin yan zincirleri aktif bölgenin dışına bakmaktadır. Dolayısıyla, Bortezomib'in ya da tasarlanabilecek diğer ilaç moleküllerinin boronik asit grupları, bu dört amino asitin -OH gruplarının yanına gelecek şekilde planlanırsa, boronik asitin bor atomunun bu amino asitlerin -OH gruplarıyla kovalent bağ yaparak, ilacın enzime kovalent olarak bağlanması sağlanabilir.

4. Sonuçlar (Conclusions)

Bu çalışmada, FDA onaylı antiviral ilaç moleküllerinin ve literatürde yer alan ve SARS-CoV-2 için *in vitro* biyolojik testlerde aktif olduğu bulunan aday ilaç moleküllerinin MPro'ya bağlanma enerjileri AutoDockVina programı ile hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda MPro'ya bağlanma enerjisi en yüksek molekül GC-376 (-8,0 kcal/mol) olarak bulunmuş olup bu molekül SARS-CoV-2 için ilaç olmaya adaydır.

MPro'ya kovalent bağlanabilecek bor içeren moleküllerin tasarlanma imkanı araştırılmıştır. MPro enziminin aktif kısmında, yan zincirlerinde -OH grubu olan THR24, THR25, SER46 ve SER144 amino asitlerinin, boronik asit grubu içeren ilaç molekülleriyle kovalent bağlanma yapmaya uygun oldukları bulunmuştur.

Bor içeren Bortezomib kanser ilacının da yapı olarak MPro'yu inhibe edebileceği öngörülerek bağlanma enerjisi hesaplanmıştır (-7,0 kcal/mol). Bortezomib'in Mod-4 konformerinin PRO168 ile GLU189 amino asitlerinin arasında kalan hidroforbik cebe girdiği görülmüştür. Bortezomib üzerindeki boronik asit grubunun yeri değiştirilerek THR24, THR25, SER46 ve SER144 amino asitlerinin -OH gruplarıyla kovalent bağlanmaya elverişli bir pozisyona getirilmesiyle elde edilecek regioizomerlerinin bu enzimi daha kuvvetli inhibe etmesi beklenmektedir.

Bortezomib ya da bor içeren aday ilaç moleküllerinin kovalent doking ile Mpro'ya bağlanmaları daha detaylı incelenebilir. Bunun için yine AutoDock Vina programı kullanılarak "Flexible Side-Chain" metodu [24], ya da yine AutoDock Vina kullanılarak kovalent bağlanan molekülleri bulmak için kullanılan ancak kovalent olmayan bir hesaplama yöntemi olan "Steric-Clashes Alleviating Receptor (SCAR)" [25] metodu uygulanabilir.

MPro enzimi için borlu ilaç imkanının olduğu bu çalışmada gösterildiğinden, Ixazomib ve Tavaborole gibi

faz aşamalarından geçmiş diğer borlu ilaçların MPro enzimine bağlanmaları incelenebileceği gibi, bor içeren diğer aday moleküller de tasarlanıp hesaplamaları yapılabilir.

SARS-CoV-2 virüsünün mutasyona uğraması sonucu sürekli yeni varyantlar ortaya çıktığından aşılarda etkisi azalmaktadır. Son çıkan varyantlardan biri olan B.1.617.2 kodlu delta varyantı baskın bir varyant olarak yayılmaktadır. İlk çıkan SARS-CoV-2 virüsünün MPro enzimi sekansı [26] delta varyantı MPro enzimi sekansı [27] BLAST veri tabanını [28] kullanarak karşılaştırıldı ve %100 aynı oldukları görüldü. MPro enziminin mutasyonlardan etkilenmediği görüldüğünden ve 2002 yılında ortaya çıkan SARS-CoV virüsü MPro'suna %96 oranında benzerliğinden dolayı gerek farklı varyantlara karşı mücadelede gerekse ileride ortaya çıkabilecek yeni koronavirüs türlerine karşı mücadelede MPro enzimini hedef alan ilaç geliştirilmesinin önemi bir kez daha görüldü.

Kaynaklar (References)

- [1] Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. P. (2020). The trinity of COVID-19: Immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, 20, 363-374.
- [2] World Health Organization. (2020). *WHO Director-General's Remarks at the Media Briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020*. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>.
- [3] World Health Organization. (2021). *COVID-19 Situation Reports, Weekly epidemiological update on COVID-19-15 June 2021*. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19-15-june-2021>.
- [4] Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., ... & Zhang, Y. Z. (2020). A New Coronavirus Associated with Human Respiratory Disease in China. *Nature*, 579, 265-269.
- [5] Gosh, A. K., Brindisi, M., Shahabi, D., Chapman, M. E., & Mesecar, A. D. (2020). Drug development and medicinal chemistry efforts toward SARS-coronavirus and covid-19 therapeutics. *ChemMedChem*, 15(11), 907-932.
- [6] Pillaiyar, T., Manickam, M., Namasivayam, V., Hayashi, Y., & Jung, S. (2016). An overview of severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) 3CL protease inhibitors: peptidomimetics and small molecule chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 14, 6595-6628.
- [7] Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461.
- [8] Lu, Y., Shi, T., Wang, Y., Yang, H., Yan, X., Luo, X., ... & Zhu, W. (2009). Halogen bonding-a novel interaction for rational drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 9, 2854-2862.
- [9] Owen, C. D., Lukacik, P., Strain-Damerell, C. M., Doungamath, A., Powell, A. J., Fearon, D., ... & Walsh, M. A. (2020). COVID-19 main protease with unliganded active site. <https://www.rcsb.org/structure/6YB7>.
- [10] Ma, C., Hurst, B., Hu, Y., Szeto, T., Tarbet, B., & Wang, J. (2020). Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease. *Cell Research*, 30, 678-692.
- [11] Dai, W., Zhang, B., Jiang, X., Su, H., Li, J., Zhao, Y., ... & Liu, H. (2020). Structure-based design, synthesis and biological evaluation of peptidomimetic aldehydes as a novel series of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *BioRxiv*, DOI: 10.1101/2020.03.25.996348.
- [12] Choy, K., Wong, A. Y., Kaewpreedee, P., Sia, S. F., Chen, D., Hui, K. P. Y., ... & Yen, H. (2020) Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication *in vitro*. *Antiviral Research*, 178, 104786.
- [13] Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerherring, L., ... & Hilgenfeld, R. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved a-ketoamide inhibitors. *Science*, 368, 409-412.
- [14] Yamamoto, M., Kiso, M., Sakai-Tagawa, Y., Iwatsuki-Horimoto, K., Imai, M., Takeda, M., ... & Inoue, J. (2020). The anticoagulant nafamostat potently inhibits SARS-CoV-2 infection *in vitro*: an existing drug with multiple possible therapeutic effects. *BioRxiv*.
- [15] Xu, T., Gao, X., Wu, Z., Selinger, D. W., & Zhou, Z. (2020). Indomethacin has a potent antiviral activity against SARS CoV-2 *in vitro* and canine coronavirus *in vivo*. *BioRxiv*.
- [16] Yamamoto, N., Matsuyama, S., Hoshino, T., & Yamamoto, N. (2020). Nelfinavir inhibits replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 *in vitro*. *BioRxiv*.
- [17] Liu, H., Ye, F., Sun, Q., Liang, H., Li, C., Li, S., ... & Lai, L. (2021). Scutellaria baicalensis extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease *in vitro*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 497-503.
- [18] Longhitano, L., Tibullo, D., Giallongo, C., Lazzarino, G., Tartaglia, N., Galimberti, S., ... & Liso, A. (2020). Protease inhibitors as a possible therapy for SARS-CoV-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3622.
- [19] Zhang, L., Lin, D., Kusov, Y., Nian, Y., Ma, Q., Wang, J., ... & Hilgenfeld, R. (2020). α -Ketoamides as broad-spectrum inhibitors of coronavirus and enterovirus replication: structure-based design, synthesis, and activity assessment. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(9), 4562-4578.
- [20] Fintelman-Rodrigues, N., Sacramento, C. Q., Lima, C. R., Souza da Silva, F., Ferreira, A. C., Mattos, M., ... & Souza, T. M. L. (2020). Atazanavir inhibits SARS-CoV-2 replication and pro-inflammatory cytokine production. *BioRxiv*.
- [21] Liu, J., Cao, X., Wang, X., Zhang, H., Hu, H., Li, Y., ... & Wang, M. (2020). Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection *in vitro*. *Cell Discovery*, 6(1), 1-4.
- [22] Iketani, S., Forouhar, F., Liu, H., Hong, S. J., Lin, F., Nair, M. S., ... & Ho, D. D. (2021). Lead compounds for the development of SARS-CoV-2 3CL protease inhibitors. *Nature Communications*, 12(1), 1-7.
- [23] Fang, G., Wang, H., Bian, Z., Sun, J., Liu, A., Fang,

- H., ... & Wu, Z. (2018). Recent development of boronic acid-based fluorescent sensors. *RSC Advances*, 8(51), 29400-29427.
- [24] Bianco, G., Forli, S., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Covalent docking using autodock: Two-point attractor and flexible side chain methods. *Protein Science*, 25(1), 295-301.
- [25] Ai, Y., Yu, L., Tan, X., Chai, X., & Liu, S. (2016). Discovery of covalent ligands via noncovalent docking by dissecting covalent docking based on a steric-clashes alleviating receptor (SCAR) strategy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(8), 1563-1575.
- [26] Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., ... & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579, 265-269.
- [27] Napit, R., Manandhar, P., Poudel, A., Raut, R., Gurung, A., Pradhan, S., ... & Karmacharya, D. (2021). Rapid genomic surveillance of SARS-CoV-2 in a dense urban community using environmental (sewage) samples. *medRxiv*.
- [28] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.