

Desenvolvimento de fármacos para tratamento da COVID-19

Juliana Romano Lopes¹, Carlos Henrique L Imperador¹, Chung Man Chin^{1,2}, Jean Leandro dos Santos¹

¹LAPDESF- Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, SP, ²CEPAM - Centro de Pesquisa Avançada em Medicina da UNILAGO, Faculdade de Medicina - UNILAGO, União das Faculdades dos Grandes Lagos, SJRP, SP
[autor correspondente. JLS: jean.santos@unesp.br]

RESUMO

A Covid-19 é uma nova doença, causada pelo SARS-CoV-2, pandemia ainda em curso, causando mais de 450 mil óbitos após 6 meses da descoberta do vírus e não há medicamento eficaz ou vacina até o momento. A emergência mundial para busca de tratamento específico contra a COVID-19, demandou o uso de estratégias para descoberta que fossem mais rápidas, incluindo o reposicionamento de fármacos. Este trabalho visa descrever as estratégias no desenvolvimento de fármacos para o tratamento da COVID-19, abordando os alvos terapêuticos

Palavras-chave: desenvolvimento de fármacos, COVID-19, estratégias, alvos terapêuticos, SARS-CoV-2

ABSTRACT

Covid-19 is a new disease, caused by SARS-CoV-2, a pandemic that is still in progress, causing more than 450 thousand deaths after 6 months of the discovery of the virus and there has been no effective drug or vaccine until now. The worldwide emergency to seek specific treatment against COVID-19 demanded the use of strategies for discovery that were faster, including the drug repurposing. This work aims to describe the strategies in the development of drugs for the treatment of COVID-19, addressing therapeutic targets.

Key words: drug design, COVID-19, strategies, therapeutic targets, SARS-CoV-2

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo moroso, de elevado custo e que apresenta altas taxas de insucesso. Estudos apontam que os custos para que um novo fármaco seja lançado alcance cifras de até 1 bilhão de dólares. Face a esta problemática, o uso de estratégias racionais que minimizem os riscos e otimize os custos é fundamental.

Dentre as diversas estratégias usadas para descoberta de novos fármacos é possível destacar: a) acaso; b) busca por produtos naturais; c) triagem sistemática/randômicas em larga escala (do inglês: *High-Throughput Screening* - HTS); d) abordagem fisiológica - estudo das vias bioquímicas para seleção de alvos moleculares; e) ferramentas computacionais (métodos diretos e indiretos); f) reposicionamento de fármacos; g) modificações moleculares, entre outros (Figura 1).

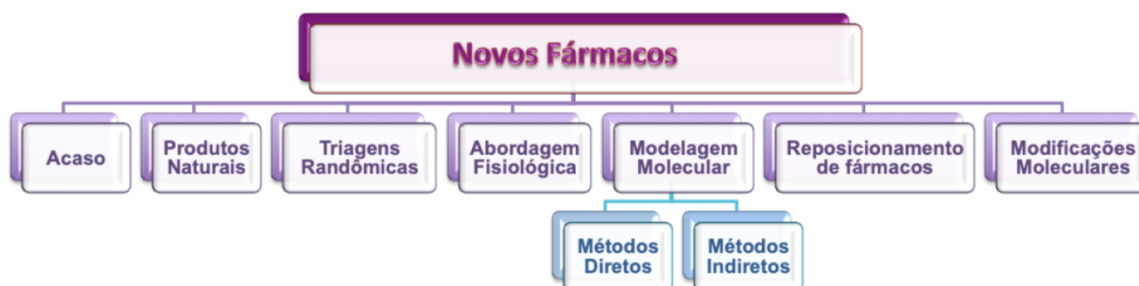


FIGURA 1. Principais estratégias usadas no planejamento de novos fármacos.

A fim de otimizar o processo de descoberta de novos fármacos, é comum a combinação dessas abordagens. Por exemplo, na abordagem fisiológica, o estudo das vias bioquímicas permite a identificação de alvos terapêuticos. Após a obtenção das estruturas destes alvos por meio de técnicas de cristalografia de raios-X ou crio-microscopia eletrônica é possível utilizar ferramentas computacionais para planejar ligantes, baseado no conhecimento do receptor. Em outro exemplo, a identificação da atividade farmacológica de um produto natural pode exigir alterações na estrutura química para melhorar propriedades farmacêuticas, farmacocinéticas ou farmacodinâmicas.

Frente ao desafio para a descoberta de um novo fármaco, como aquele imposto pela infecção por SARS-CoV-2 a aplicação dessas estratégias, usadas de forma combinada, permitem identificar novos compostos candidatos a fármacos que contribuam com o tratamento da COVID-19.¹⁻⁴ Em humanos, o SARS-CoV, MERS-CoV e o SARS-CoV-2 foram os três principais coronavírus responsáveis por causar as infecções mais graves e de maiores proporções. Após o sequenciamento do genoma viral e a identificação das principais estruturas para sobrevivência do vírus, possíveis alvos terapêuticos emergiram e foi possível identificar que por serem vírus do mesmo gênero compartilhavam algumas características e alvos em comum. Alguns destes alvos, como por exemplo, a protease principal (i.e. 3-CLpro) apresenta 96% de identidade em sua sequência de aminoácidos com SARS-Cov. Essa alta

similaridade possibilita planejar compostos com maior espectro de ação, sendo os novos compostos ativos tanto contra os SARS-Cov, MERS quanto SARS-Cov-2.¹⁻⁴

A emergência mundial para busca de tratamento específico contra a COVID-19, demandou o uso de estratégias para descoberta que fossem mais rápidas, e exemplo do reposicionamento de fármacos. Esta última tem como objetivo a identificação no rol de medicamentos já aprovados pelas agências regulatórias, aqueles que poderia atuar no combate da infecção.^{5,6} A grande vantagem desta abordagem está na possibilidade de se encontrar um medicamento disponível, com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas conhecidas⁵⁻⁷, que poderiam atuar em algum alvo tanto no paciente, quanto diretamente no vírus SARS-CoV-2. Entre os exemplos de fármacos identificados por reposicionamento para tratamento da infecção por SARS-CoV-2, é possível destacar: a hidroxicloroquina/cloroquina, inibidores de HIV protease (i.e. lopinavir e darunavir), inibidores da RNA polimerase (i.e. remdesivir, favipiravir, ribavirin), arbidol, mesilato camostat, anticorpos monoclonais anti-IL-6 (i.e. tocilizumab, sarilumab), entre outras (**Figura 2**). Diversos estudos clínicos estão sendo conduzidos e os resultados parciais têm sido publicados

Outra abordagem atualmente adotada para descoberta de novos fármacos contra SARC-Cov-2 é a triagem sistemática/randômica em larga escala (HTS), que visa identificar ligantes por meio da avaliação de uma biblioteca de

compostos. A seleção de ligantes pode ocorrer por meio de ensaios *in vitro* ou utilizando ferramentas computacionais, como a triagem virtual em alta escala (do inglês: HTVS).⁵⁻⁷

O planejamento baseado na estrutura de alvos utiliza técnicas computacionais e biofísicas na identificação de ligantes. Estes ligantes, de origem sintética ou natural, depois de avaliados podem ser otimizados por meio das estratégias de modificação molecular. Para o planejamento baseado em alvo, é fundamental que a estrutura do vírus e prováveis locais de intervenção sejam identificados a fim de planejar compostos que apresentem segurança e eficácia desejáveis no tratamento.

Os coronavírus possuem quatro grandes proteínas estruturais, sendo elas: proteína de nucleocapsídeo (N), proteína “*spike*” (S), proteína de membrana (M) e proteína de envelope (E).⁵ A infecção por esses vírus se inicia através do reconhecimento da proteína “*spike*” com receptores celulares. Os coronavírus que infectam humanos utilizam receptores de entrada diferentes, sendo estes: aminopeptidase (para HCoV-229E); ácido siálico 9-O-acetilado (para HCoV-NL6 e HCoV-HKU1); enzima conversora de angiotensina 2 (para SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 e HCoV-NL63) e dipeptidil peptidase 4 (para MERS-CoV).⁵

O ciclo de infecção por SARS-CoV-2 se inicia após a entrada dos vírus nas células auxiliado pelos receptores.⁸ Seu RNA (+) genômico passa pelo processo de tradução levando a formação de cadeias de poliproteínas (pp1a e pp1ab), que são posteriormente processadas por duas proteases: “3C-like” (3CL^{pro}) e “papain-like” (PL^{pro}).⁸ Com o auxílio das proteases, essas poliproteínas são clivadas em 16 proteínas não-estruturais (nsp) que compõem o complexo replicase-transcriptase viral⁸. Esse complexo leva a formação de RNA (-), o que gera novas fitas de RNA (+) genômico por processos de replicação e a síntese de proteínas estruturais através da tradução de mRNA (+) subgenômico.⁸ As proteínas virais formadas e o RNA genômico constituem os novos vírions, que são liberados das células infectadas por um processo de exocitose.⁸

A inibição dos alvos do ciclo de vida do SARS-CoV-2 é capaz de bloquear processos essenciais para a continuidade do ciclo de vida do vírus e controlar a infecção. Dentre estes é possível destacar: o uso de inibidores de proteínas estruturais, os inibidores das proteínas estruturais de envelope, membrana e nucleocapsídeo; inibidores de fusão; inibidores de proteases como a protease principal (3CL^{pro}), PL^{pro} e inibidores de RNA polimerase. A seguir serão apresentados os principais alvos investigados em SARS-CoV-2 para o planejamento de novos fármacos.

INIBIDORES DE FUSÃO

A proteína “*spike*” (S) que compõem o nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 é fundamental para o reconhecimento dos receptores celulares. A interação da proteína S com a enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA2) promove o processo de fusão da membrana celular, permitindo a entrada do vírus nas células.^{7,9} Compostos capazes de inibir a interação entre a proteína S do vírus com a ACE2 impedem o processo de fusão e consequentemente, bloqueiam a entrada do vírus.

O fármaco arbidol (**Figura 2**) é um antiviral aprovado na Rússia e China para tratamento de gripe causado pelo vírus influenza.⁹ Esse composto foi identificado por meio da estratégia de reposicionamento de fármacos como candidato para atuação frente a COVID-19 através do mecanismo de inibição da fusão da membrana celular.⁹ Estudos estão sendo realizados para identificar a real contribuição desse composto frente a infecção por SARS-CoV-2.

INIBIDORES DE PROTEASE

As proteases são fundamentais para o ciclo de vida dos coronavírus e constituem um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos antivirais. As proteases PL^{pro} e 3CL^{pro} estão envolvidas no processo de clivagem das poliproteínas pp1a e pp1ab.^{7,9}

A protease tipo-papaina (PL^{pro}) é uma cisteíno protease responsável pela clivagem das três

primeiras posições da poliproteína, levando a formação de três proteínas não estruturais^{7,9}. A protease principal dos coronavírus, denominada de 3CL^{pro} é uma protease do tipo quimiotripsina responsável pela clivagem do restante da cadeia de poliproteína, levando a formação das proteínas não estruturais nsp4 até nsp16^{7,9}. Essas proteínas estruturais são responsáveis pela formação do complexo replicase-transcriptase, essencial para os processos de replicação e transcrição dos coronavírus.^{7,9}

Inibidores dessas proteases são relatados em diferentes estudos *in vitro* para SARS-CoV, MERS-CoV e recentemente, para SARS-CoV-2.^{5,10} Esses compostos geralmente constituem estruturas químicas derivadas de peptídeos (peptídomiméticos) ou moléculas pequenas e geralmente são capazes de atuar através de interações covalentes com o aminoácido reativo dessas proteases, a cisteína na forma de tiolato.¹⁰ Ao interagir com o sítio dessas proteases, sua atividade catalítica é cessada, desencadeando a atividade antiviral desses compostos.

Dentro da estratégia de reposicionamento de fármacos, alguns inibidores de protease de HIV como a combinação lopianvir/ritonavir e darunavir (**Figura 2**) foram avaliados quanto a possibilidade de atuarem frente a protease principal dos coronavírus (3CL^{pro}).^{5,7,9} Até o presente momento, nenhum desses fármacos foi aprovado para tratamento de COVID-19, tendo sido apenas identificados como possíveis candidatos por sua capacidade em atuarem como inibidores de protease, demandando maiores estudos para averiguar a real contribuição desses compostos frente a infecção por SARS-CoV-2

INIBIDORES DE RNA POLIMERASE (RDRP) DEPENDENTES DE RNA

As RNA polimerases dependentes de RNA são enzimas virais que atuam na replicação de RNA

viral, levando a produção de RNA genômico e subgenômico^{7,9}. Por conta disso, são essenciais para a formação de novos vírions. As polimerases são utilizadas como alvo terapêutico no tratamento de diferentes infecções e seus inibidores geralmente se baseiam em estruturas análogas de nucleotídeos ou não-nucleosídeos.^{7,9}

A ribavirina, remdesivir e favipiravir (**Figura 2**) são exemplos de fármacos que atuam como inibidores de RNA polimerase dependentes de RNA e foram identificados como possíveis alternativas no tratamento de COVID-19.^{7,9} A ribavirina é um análogo de guanidina, aprovado para o tratamento de hepatite C. O remdesivir é um pró-fármaco que sofre metabolismo para formação de um análogo de trifosfato de nucleosídeo C-adenosina, tendo sua atividade antiviral avaliada frente a diferentes vírus como Ebola e MERS-CoV. O favipiravir é um pró-fármaco análogo de purina, tendo sido avaliado em estudos contra os vírus Influenza e ebola.^{7,9}

Assim como os exemplos citados de inibidores de protease e inibidores de fusão, nenhum inibidor de RNA polimerase dependente de RNA foi aprovado para o tratamento de COVID-19 até o presente momento.

ALVOS LIGADOS À RESPOSTA IMUNE INATA

Além das intervenções cujo alvo são proteínas virais, algumas possibilidades de tratamento para COVID-19 visando controle de processos regulados no hospedeiro parecem promissores. Entre estas o uso de agentes anti-inflamatórios e anticoagulantes parecem diminuir os danos causados pelo vírus. A seguir serão apresentados exemplos de alvos terapêuticos presentes no hospedeiro e que podem contribuir para a diminuição dos danos causados pela infecção.

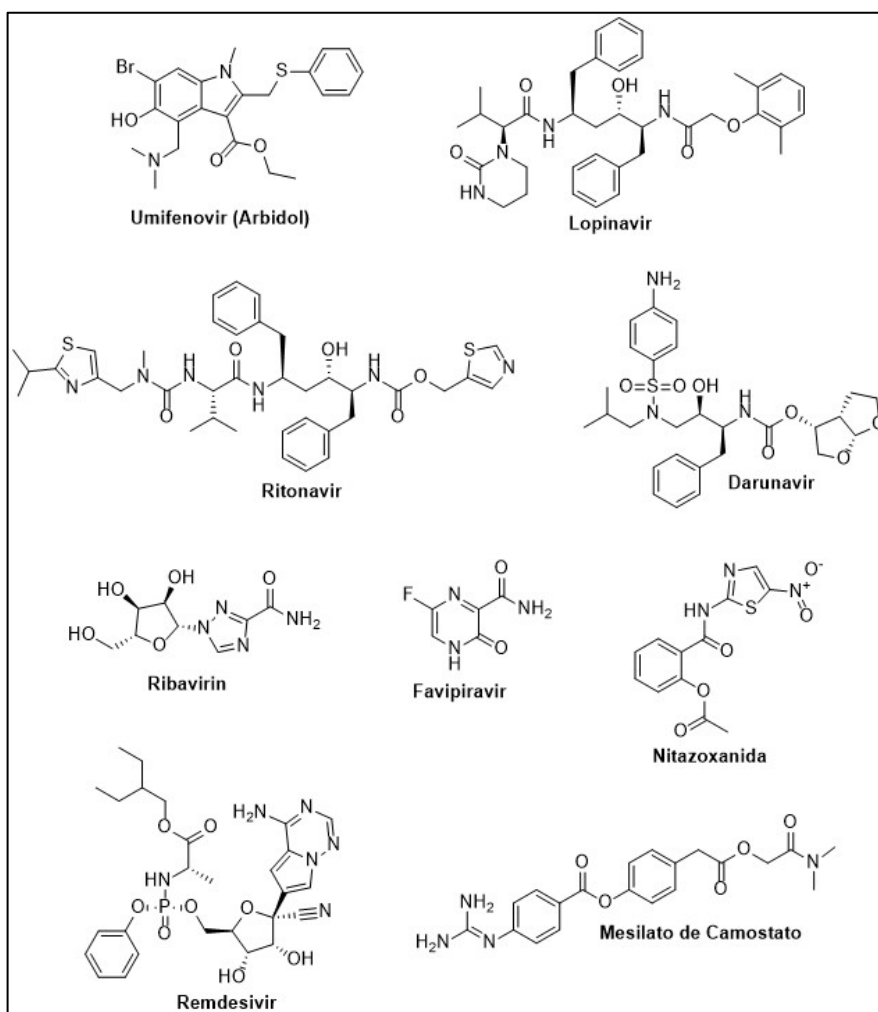


Figura 2. Estrutura química dos compostos identificados dentro da estratégia de reposicionamento de fármacos para COVID-19. Inibidor de fusão (arbidol); inibidores de protease (lopinavir/ritonavir e darunavir); inibidores de RNA polimerase (ribavirina, remdesivir, favipiravir); indutor de interferon (nitazoxadina) e inibidor de TMPRSS2 (mesilato de camostato).

A resposta imune inata do hospedeiro é fundamental para o controle da replicação viral. A resposta imune gerada por interferons (IFN) pode ser aumentada com o uso de interferons recombinantes, como os INF- α e β ou fármacos que induzem a produção dessas citocinas^{5,7,9}. Uma das estratégias avaliadas para o tratamento de infecções por SARS-CoV e MERS-CoV foi o uso de antivirais como ribavirina e lopianvir/ritonavir combinados com INF- α ou β , o que ainda requer maior investigação quanto aos reais benefícios dessa abordagem.^{7,9}

A nitazoxanida (**Figura 2**) é um fármaco aprovado para o tratamento de doenças parasitárias, cujo mecanismo se dá pela capacidade de induzir a produção de interferon tipo-1^{7,9}. Por apresentar uma atividade antiviral de amplo espectro, esse fármaco se tornou um possível candidato frente a SARS-CoV-2, porém, maiores estudos quanto sua eficácia no tratamento dessa infecção são necessários.^{7,9} Até o presente momento, nenhuma estratégia com o uso de interferons ou fármacos que

induzem aumento da resposta imune foi aprovada para o tratamento de COVID-19.

INIBIDORES DE TMRPSS2

O SARS-CoV e SARS-CoV-2 utilizam como porta de entrada nas células o receptor celular ECA2. Essa enzima é reguladora do sistema renina-angiotensina sendo responsável pela conversão de angiotensina I em angiotensina 1-7. Esse processo regulatório é fundamental para o controle de processos biológicos como da pressão arterial. O uso de bloqueadores de ECA/angiotensina motivou discussões e estudos quanto a real atuação desses fármacos na infecção por SARS-CoV-2, mas inibidores de ECA2 foram planejados para atuar impedindo a entrada do vírus nas células.⁹ Apesar de ser uma estratégia estudada, esses

compostos podem afetar as funções biológicas reguladas pela ECA2, desencadeando efeitos adversos.^{7,9}

Uma nova abordagem avaliada para impedir a entrada do vírus nas células são os inibidores de TMRPSS2.^{7,9} A serino protease de transmembrana do tipo 2 é uma protease humana que atua como auxiliar da entrada do vírus nas células. Sua real contribuição no mecanismo de entrada de SARS-CoV-2 ainda está sob investigação, mas o fármaco mesilato de camostato (**Figura 3**), aprovado no Japão para tratamento de pancreatite, foi identificado em estudos de inibição de TMRPSS2 *in vitro*.^{7,9} Desta forma, futuros estudos irão avaliar a capacidade de inibidores de TMRPSS2 em atuarem frente a COVID-19.

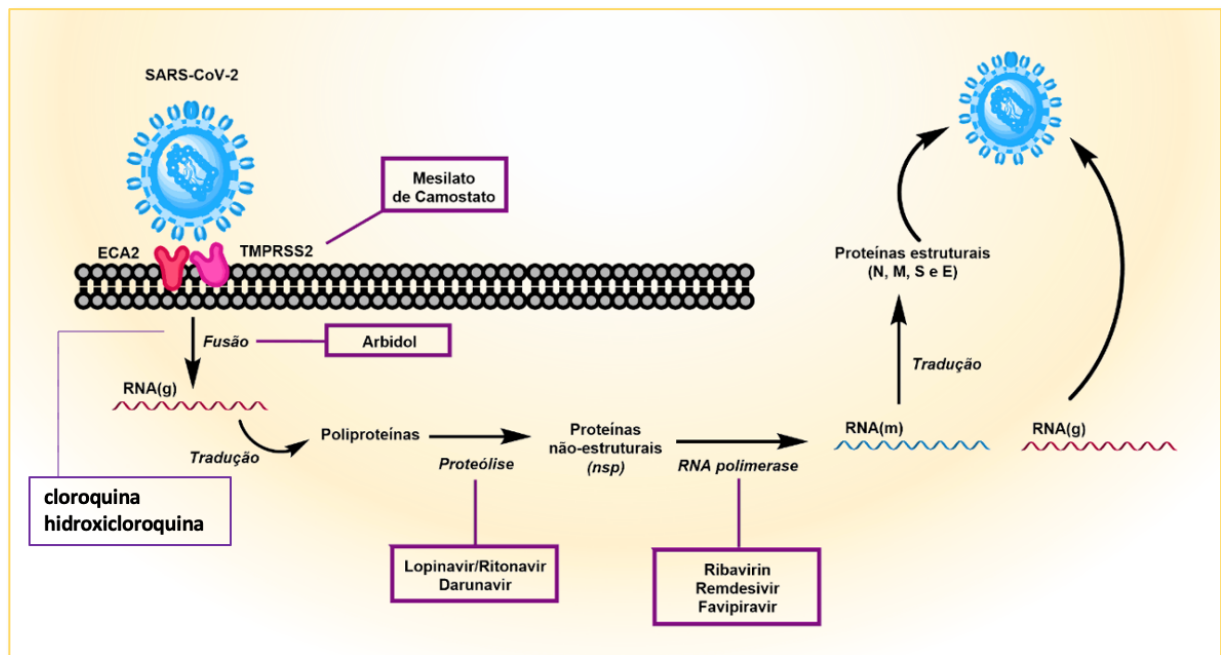


FIGURA 3. Alvos terapêuticos no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da COVID-19

CONCLUSÃO

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo complexo e multidisciplinar que demanda altos investimentos e envolve riscos

elevados. Frente a preocupação global, iniciada em 2002 com a SARS, em 2012 com a MERS e em 2019 com a COVID-19, estratégias rápidas que permitam o desenvolvimento de novos fármacos é uma emergência. Entre as

principais estratégias utilizadas, o reposicionamento de fármacos parece ser bastante promissor, e tem possibilitado a descoberta de compostos com atividade diretamente no vírus ou em alguma via do hospedeiro. Por meio desta abordagem vários estudos clínicos têm sido conduzidos para avaliar a efetividade e segurança de novos candidatos à fármacos para tratamento da COVID-19. Além dessa abordagem, a longo prazo, outras estratégias têm sido investigadas visando a inibição de alvos do SARS-CoV-2

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. The world health report 2003 - shaping the future. Disponível em: <https://www.who.int/whr/2003/en/>. Acesso em: 7 de jun. 2020.
2. World Health Organization. MERS situation update, January 2020. Disponível em: <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html>. Acesso em: 7 de jun. 2020.
3. ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, p. 270-273, 2020.
4. [World Health Organization. Coronavirus disease \(COVID-2019\) situation reports, Situation report – 129, May, 2020. Disponível em: https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/). Acesso em: 7 de jun. 2020.
5. PILLAIYAR, T.; MEENAKSHISUNDARAM, S.; MANICKAM, M. Recent discovery and development of inhibitors targeting coronaviruses. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 4, p. 668-688, 2020.
6. LIU, C. et al. Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. **ACS Central Science**, v. 6, p. 315-331, 2020
7. ZUMLA, A. et al. Coronaviruses – drug Discovery and therapeutic options. **Nature Reviews**, v. 15, p. 327-347, 2016.
8. DE WIT, E. et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 523-534, 2016.
9. SANDERS, J. M. et al. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) A Review. **JAMA**, v. 323, n. 18, p. 1824-1836, 2020.
10. PILLAIYAR, T. et al. An Overview of Severe Acute Respiratory Syndrome–Coronavirus (SARS-CoV) 3CL Protease Inhibitors: Peptidomimetics and Small Molecule Chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 6595-6628, 2016.