

ANÁLISE DO PERFIL FARMACOLÓGICO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS CONTRA O SARS-COV-2 PARA TRATAMENTO DA COVID-19

Laryssa Gabrielly de Mattos Sousa¹

Simone Queiroz Pantaleão²

Ana Ligia Scott³

Resumo: Este artigo apresenta o estudo de acoplamento dos fármacos: Molnupiravir®, Remdesivir® e Paxlovid® (Nirmatrelvir® + Ritonavir®) por meio do *docking* na proteína Mpro da Sars-CoV-2, que atualmente é utilizado no tratamento do Covid-19. Considerando conceitos básicos de biologia estrutural, acoplamento molecular (*docking*) e análises de bioinformática e quimioinformática. Essa protease foi analisada por ser essencial para a replicação do vírus pelo corpo. Tais dados corroboram com outras pesquisas conduzidas pelo laboratório LBBC da UFABC. Os fármacos analisados são eficazes, porém seu preço é elevado, portanto compreender sua ação possibilita novas pesquisas para a modificações estruturais destes ligantes com eficácia similar e preço mais acessível. Observou-se que as principais características físico-químicas destes fármacos são: grupo aromático, grupo hidrofóbico, grupo aceitador de ligação de hidrogênio e grupos doadores de ligação de hidrogênio e pontos de sinergia entre os resíduos: MET 165 e GLU 166 simultaneamente e interações moleculares estabelecidas com os resíduos: HIS 41, GLN 189, CYS 145, MET 165 e GLU 166.

Palavras-Chave: Sars-CoV-2, Mpro, *Docking* e fármacos.

¹Aluno do Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio – Laryssa.sousa3@etec.sp.gov.br

²Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC - simone.queiroz@ufabc.edu.br

³Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC – ana.scott@ufabc.edu.br

Abstract: This article presents a docking study of the drugs Molnupiravir®, Remdesivir® and Paxlovid® (Nirmatrelvir® + Ritonavir®) with the Sars-CoV-2 Mpro protein, which is currently used to treat Covid-19. They are considering basic concepts of structural biology, molecular docking bioinformatics, and chemoinformatics analysis. This protease was analyzed because the virus needs to replicate in the body. These data corroborate other research conducted by the LBBC laboratory at UFABC. The drugs analyzed are effective, but their price is high, so understanding their action enables new research into structural modifications of these ligands with similar efficacy and a more affordable price. It was observed that the main physicochemical characteristics of these drugs are: the aromatic group, hydrophobic group, hydrogen bond acceptor group, and hydrogen bond donor groups and synergy points between the residues: MET 165 and GLU 166 simultaneously and molecular interactions established with the residues: HIS 41, GLN 189, CYS 145, MET 165 and GLU 166.

Keywords: Sars-CoV-2, Mpro, *Docking* and *drugs*.

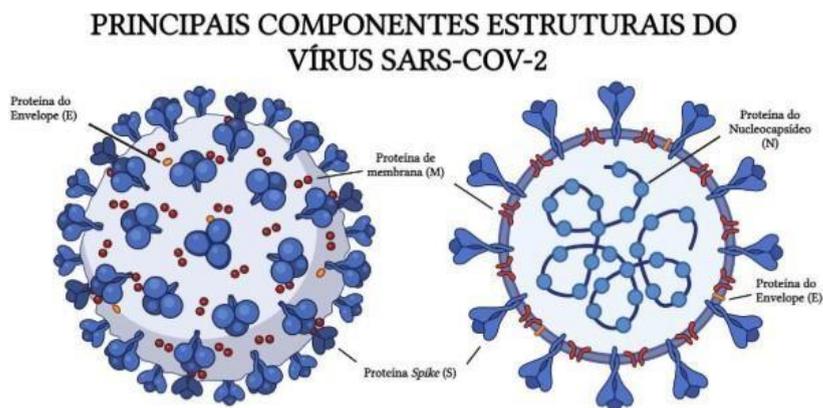
1. INTRODUÇÃO

Os coronavírus (família Coronaviridae) são uma família de vírus bem extensa, que pertence a ordem Nidovirales e da sub ordem Coronavirineae; é dividida em Letovirinae e Orthocoronavirinae. O Orthocoronavirinae é subdividido em: Alphacoronavirus (alfa-CoV), Betacoronavirus (beta-CoV), Gammacoronavirus (gama-CoV) e Deltacoronavirus (delta-CoV). Os Alphacoronavirus e os Betacoronavirus infectam exclusivamente espécies de mamíferos, os Gammacoronavirus e os Deltacoronavirus têm uma vasta escala de hospedeiros mais ampla que inclui espécies de aves. Seis espécies de coronavírus foram identificadas como infecciosas para o ser humano, sendo quatro delas do gênero Betacoronavirus e duas do gênero Alphacoronavirus. O Sars-Cov-2 (do inglês Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2), síndrome respiratória aguda grave 2, é classificado como Sarbecovírus, que é uma subdivisão dos Betacoronavirus.¹⁻¹⁰ A estrutura do sars-Cov-2 pode ser observada na Figura 1.

A COVID-19 é uma doença infecciosa respiratória aguda causada pelo vírus Sars-COV-2. A transmissão de pessoa para pessoa ocorre, comumente, através de tosses, espirros, inalação de gotículas, contato com mucosas orais, nasais e oculares. De acordo com o Ministério da Saúde os sintomas podem variar de pessoa a pessoa, pois algumas são assintomáticas e manifestações clínicas leves até quadros moderados, graves e críticos. Os sintomas mais comuns são: febre, tosse e falta de ar. ¹¹

Segundo o WHO, contendo as principais estatísticas desde o início da pandemia, os casos acumulados já são 775.917.102 com 7.058.381 óbitos confirmados. ¹² Sendo no Brasil de acordo com o ministério da saúde, 38.867.008 de casos confirmados e 712.957 de óbitos até a data de 27 de Agosto de 2024. ¹³

Figura 1: Principais componentes estruturais do vírus SARS-CoV-2.



Fonte: Arlene Almeida Lima (2022)¹⁴

O genoma do vírus é extenso de aproximadamente 30.000 bases, ele codifica duas poliproteínas, pp1a e pp1ab, que são clivadas pelas proteases virais Mpro (protease principal) e PLpro (protease tipo papaína) em 16 proteínas não estruturais (NSPs).² As proteínas não estruturais participam do processo de replicação viral, interagindo entre si e com proteínas do hospedeiro. Além das não estruturais, quatro proteínas estruturais sendo elas: a proteína estrutural do pico (S) que permite a entrada do vírus na célula hospedeira, a proteína do nucleocapsídeo (N) que regula o processo de replicação viral, a proteína da membrana (M), e a proteína do envelope (E), que são necessárias para produzir uma partícula viral estruturalmente completa são codificadas a partir do genoma viral e participam da estrutura do vírus e de funções como interação com receptores da célula hospedeira e interação com o sistema imunológico.^{15,16}

A proteína Mpro é importante para o vírus se duplicar e apresentou várias mutações em sua sequência de aminoácidos nas variantes detectadas e sequenciadas. Estas mutação pode ajudar o vírus ficar com alta transmissibilidade, patogenicidade e resistência a anticorpos neutralizantes.¹⁷

Foram encontradas diversas mutações no Sars-CoV-2 que estão relacionadas à maior transmissibilidade, patogenicidade e resistência a anticorpos neutralizantes.¹⁸

O processo de descoberta de drogas (*drug discovery*) é complexo e pode levar anos ou até mesmo décadas para ser concluído. Em geral, o processo é dividido em várias etapas representadas na Figura 2.

Figura 2 - Fluxo do *Drug Discovery and Design*.



Fonte: Adaptado de ¹⁹

Atualmente já existem algumas vacinas que estão sendo atualizadas devido ao surgimento de novas variantes do vírus, sendo que, também existem alguns fármacos disponíveis no mercado como por exemplo: Molnupiravir®, Remdesivir® e Paxlovid® (Nirmatrelvir® + Ritonavir®), porém seu custo é elevado.

1.1 Objetivos

Este trabalho busca compreender o mecanismo de ação dos fármacos aprovados para tratamento da COVID-19 - Molnupiravir®, Remdesivir® e Paxlovid® (Nirmatrelvir® + Ritonavir®) – comparando com o perfil farmacofórico das moléculas: NuBBe 120, NuBBe 567, NuBBe 1067 e NuBBe 1770 de produtos naturais.

2. DESENVOLVIMENTO

O presente trabalho consiste em análises *in-silico* utilizando os seguintes materiais e métodos.

2.1 Materiais e Métodos

2.1.1 Seleção da estrutura da proteína (pdb 7B3E)

Para a seleção da estrutura cristalográfica consultou-se o banco de dados Protein Data Bank (PDB)²⁰, verificou-se quais estruturas atendiam aos critérios: duas cadeias proteicas, presença de ligante cristalográfico, resolução cristalográfica até 2 Å com o método X-RAY diffraction, resultando na escolha do PDB ID: 7B3E ²¹.

2.1.2 Seleção das estruturas dos fármacos

Selecionou-se para o estudo os fármacos Molnupiravir®, Remdesivir®, Paxlovid® (Nirmatrelvir® + Ritonavir®) com ação antiviral disponível no Banco de dados PubChem ²².

2.1.3 Parametrização da proteína

A parametrização da proteína foi realizada no software SYBYL versão 8.1 ²³ com biopolymer onde foi adicionado os hidrogênios e calculadas as cargas parciais Gasteiger-Marsili.

2.1.4 Parametrização dos ligantes

A parametrização dos ligantes foi realizada no *software* Avogadro versão 1.95.1^{24,25}, na qual adicionou-se os hidrogênios, calculou-se as cargas parciais, otimizou-se a geometria pelo método *Steepest Descent* para posterior refinamento no programa SYBYL. No SYBYL, realizou-se o refinamento da otimização da geometria pelo método semi-empírico PM3 e carga ESP.

2.1.5 Docking molecular

A técnica de acoplamento molecular (*docking*), consistiu na simulação do acoplamento dos fármacos Molnupiravir®, Remdesivir®, Paxlovid® (Nirmatrelvir® + Ritonavir®) no sítio ativo da proteína Mpro do Sars-CoV-2 para compreender as interações intermoleculares que ocorrem na suas ações. Utilizou-se o programa GOLD versão 2024.1.0 ²⁶ , adotou-se a flexibilização dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cadeia A (HIS 41, MET 49, CYS 145, HIS 164, GLU 166, LEU 167, ASP 187 e GLN 189), onde estão presentes a díade catalítica (HIS 41 e CYS 145).

Primeiramente realizou-se o *redocking* do ligante cristalográfico MYC presente no pdb ID: 7B3E com as funções de score ASP, CHEMPLP, CHEMSCORE e GOLDScore, com geração de 100 conformações (poses) para cada molécula, e selecionou-se a conformação bioativa da molécula, as quais foram submetidas a verificação do RMSD (*Root Mean Square Deviation*) no *software* CHIMERA versão 1.17.3 ²⁷ para a seleção do parâmetro mais indicado. Prosseguiu-se com a utilização da função de score adequada no acoplamento dos fármacos Molnupiravir®, Remdesivir®, Paxlovid® (Nirmatrelvir® + Ritonavir®) no sítio ativo da Mpro do Sars-CoV-2 com geração de 100 conformações (poses) para cada sistema biológico.

2.1.6 Diagramas 2D das interações

Os diagramas 2D das interações para os complexos bioativos (Proteína-Ligante) foram plotados pela ferramenta PoseView 28,29. Para analisar as principais interações do complexo.

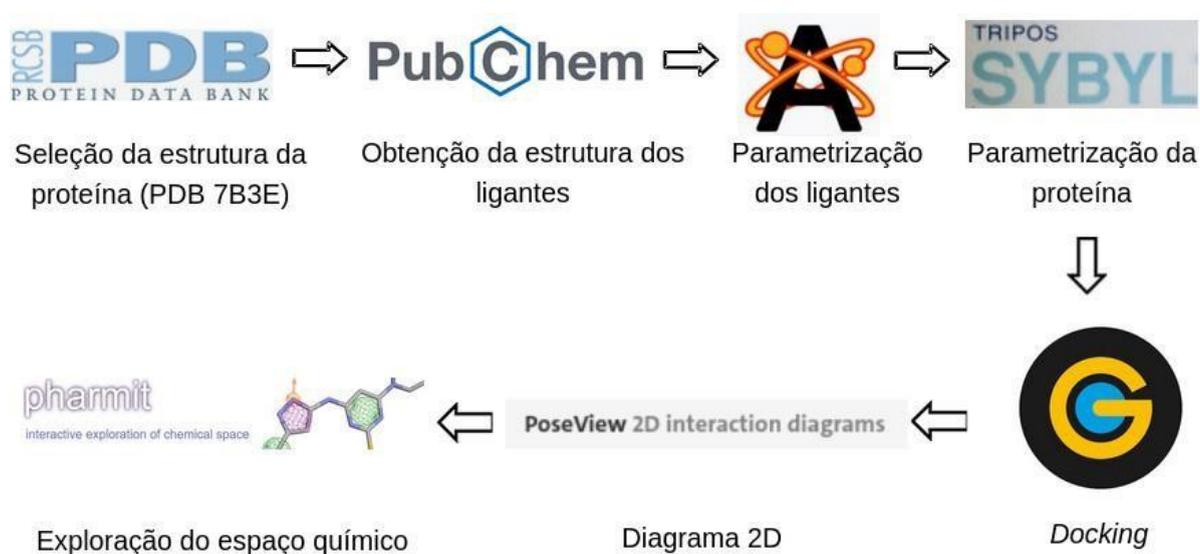
2.1.7 Exploração do espaço químico

As conformações bioativas provenientes do docking tiveram seu espaço químico explorado pela ferramenta pharmit30 para análise das regiões farmacofóricas, e também da verificação dos pontos de sinergia do Paxlovid® (Nirmatrelvir® + Ritonavir®).

2.2. Procedimento Experimental

O presente trabalho seguiu o protocolo ilustrado na Figura 3, planejado para atender as especificidades do sistema biológico, com o qual avaliou-se o tipo de estrutura da proteína Mpro e as principais características dos ligantes com atividade biológica.

Figura 3 - Representação dos passos adotados para a execução deste trabalho.



Fonte: Própria autoria

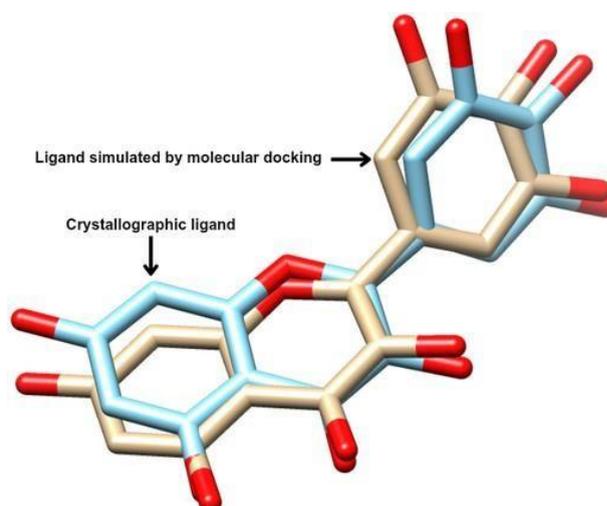
3. Resultados e Discussão

Primeiramente, para realizar o docking é necessário fazer o redocking no qual é feito a validação da função de score mais adequada para o sistema biológico. A tabela 1 encontra-se os valores de RMSD de acordo com a função de score, onde foi escolhida a função GOLDScore por ter o valor mais baixo na pose 53 do ligante. Na figura 4 está a demonstração da pose simulada em relação ao ligante cristalográfico, onde as características como orientação dos grupos químicos estão alinhados demonstrando que a função de score é apta a seguir com as análises.

Tabela 1. *Redocking* do ligante MYC da estrutura 7B3E (etapa de seleção da função de score e validação do *docking*)

Redocking – GOLD		
Função de score	melhor pose	RMSD (Å)
ASP	13	1.880
CHEMPLP	28	1.342
CHEMSCORE	50	1.278
GOLDScore	53	0.637

Figura 4- Redocking do ligante MYC da estrutura 7B3E obtido com a função GOLDScore (Pose 53), RMSD 0.637 Å



Realizou-se o *docking* para os fármacos: Molnupiravir®, Remdesivir® e Paxlovid® (Nirmatrelvir® + Ritonavir®), conforme ilustrado nas figuras 5, 6 e 7 respectivamente, em seguida as análises complementares, plotamos o diagrama 2D das principais interações moleculares e mapeamos os pontos farmacofóricos da molécula para análise das contribuições dos grupos químicos.

Figura 5 - (A) Acoplamento do Molnupiravir® pose 41 no sítio ativo da Mpro (energia de ligação: -2.1850 kJ/Mol) | (B) Diagrama 2D das interações moleculares; | (C) Representação farmacofórica dos ligantes.

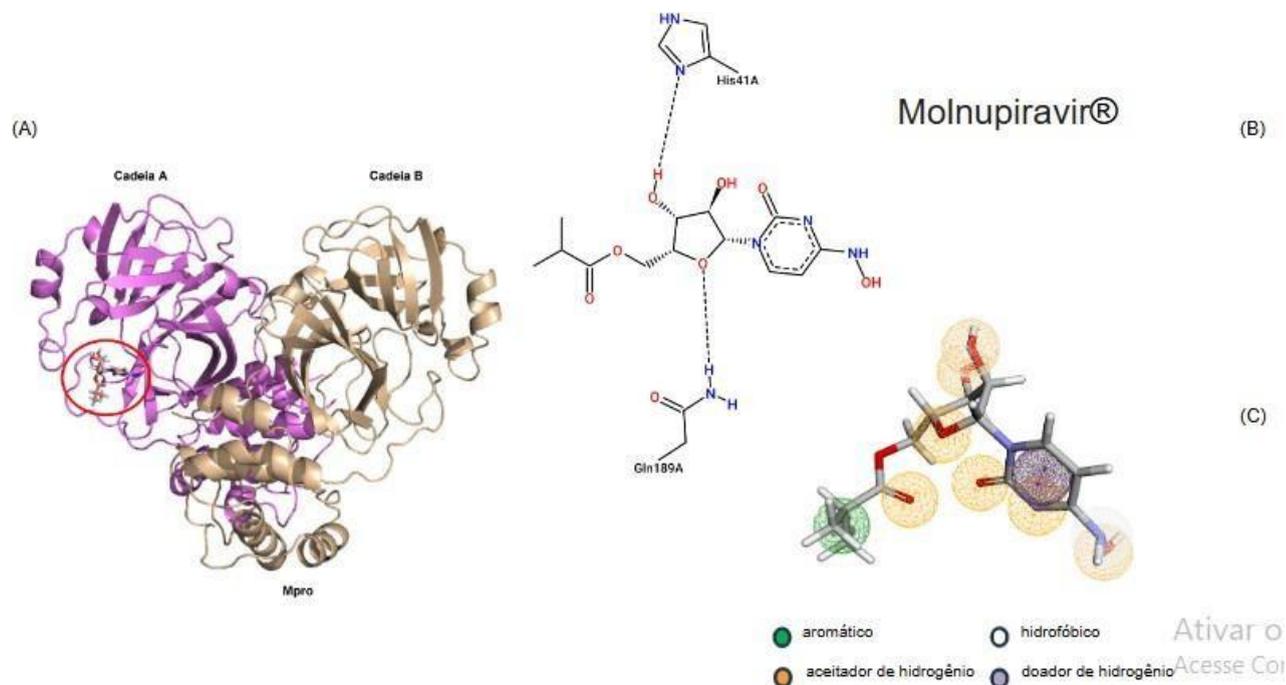


Figura 6 - (A) Acoplamento do Remdesivir® pose 94 no sítio ativo da Mpro (Energia de ligação: -5.0585 kJ/Mol) | (B) Diagrama 2D das interações moleculares; | (C) Representação farmacofórica dos ligantes.

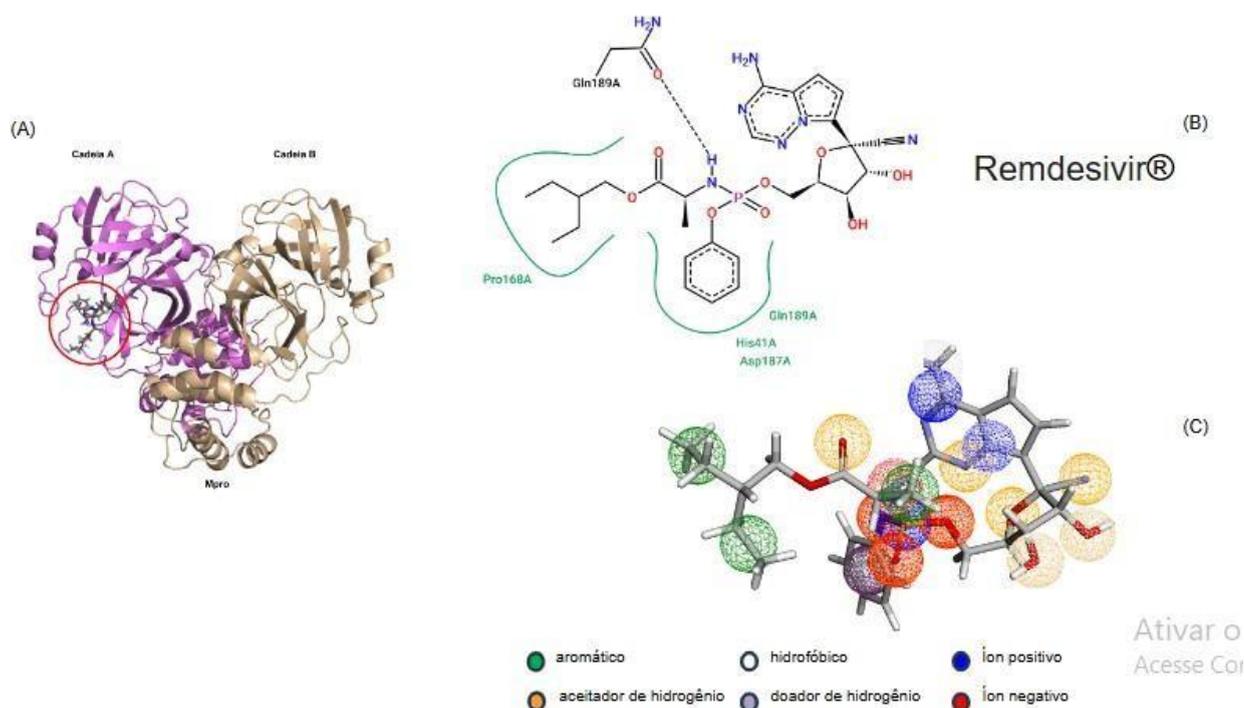
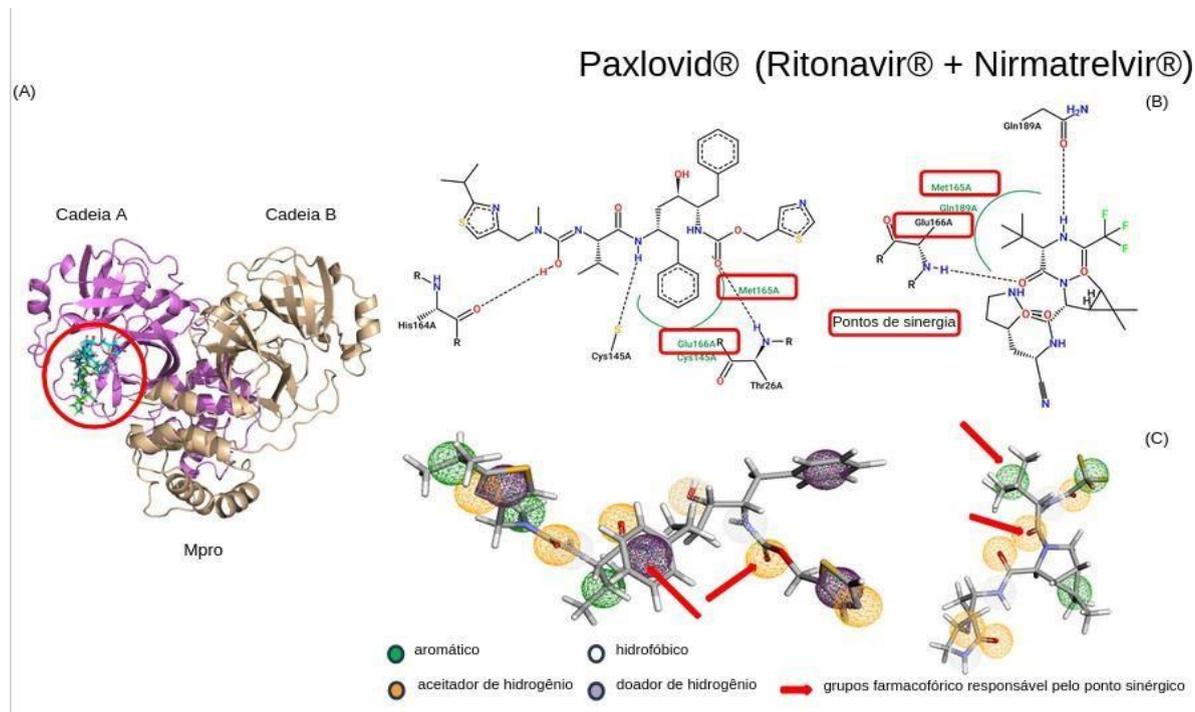
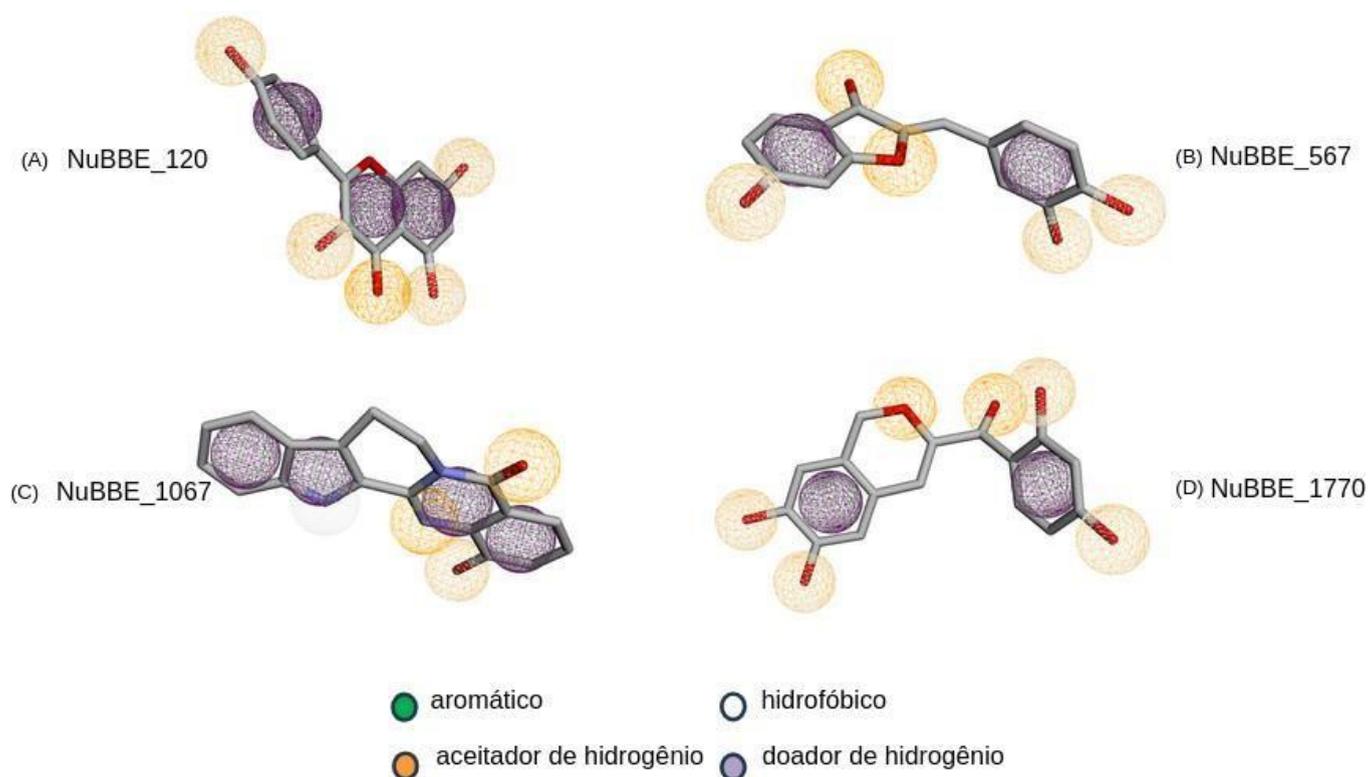


Figura 7 - (A) Acoplamento do Paxlovid® (Ritonavir® em ciano pose 43 e Nirmatrelvir® em verde pose 17) no sítio ativo da Mpro (Energia de ligação do Ritonavir: -4.9001 kJ/Mol e Nirmatrelvir: -2.3018 kJ/Mol) | (B) Diagrama 2D das interações moleculares; | (C) Representação farmacofórica dos ligantes.



Para finalizar comparou-se o perfil farmacofórico destes 4 ligantes com 4 ligantes estudados no laboratório LBBC da UFABC, para ponderar quais características dos grupos químicos são essenciais para a atividade biológica, no qual grupos aromáticos, hidrofóbicos, aceitador e doador de hidrogênio se mostraram importantes, conforme ilustrado na figura 8.

Figura 8 - Representação dos pontos farmacofóricos de moléculas de produtos naturais do NuBBE bioativas para Mpro estudadas no laboratório de pesquisa LBBC – UFABC, com características chave para inibição.



4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As principais características físico-químicas observadas para que uma molécula apresente atividade biológica na proteína Mpro são: conter grupo aromático, grupo hidrofóbico, grupo aceitador de ligação de hidrogênio e grupos doadores de ligação de hidrogênio. Também se observou que a ação de potencialização (pontos de sinergia) ocorre nas interações moleculares entre os resíduos: MET 165 e GLU 166 simultaneamente, sendo que, as interações moleculares estabelecidas entre os resíduos: HIS 41, GLN 189, CYS 145, MET 165 e GLU 166 são favorecidas. Tal projeto, possibilita ainda, uma fase futura de investigação aprofundada do comportamento dos complexos (proteína/fármacos) estudados.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos: As autoras gostariam de agradecer à FAPESP, CNPq e CAPES pelo financiamento.

6. REFERÊNCIAS

¹ SINGH, Devika, and Soojin V Yi. "On the origin and evolution of SARS-CoV-2." **Experimental & molecular medicine** vol. 53,4 (2021): 537-547. Acesso em: 15 de Junho 2024.

² V'KOVSKI, Philip *et al.* "Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2." **Nature reviews. Microbiology** vol. 19,3 (2021): 155-170. Acesso em: 15 de Junho 2024.

³ LAMERS, M.M., Haagmans, B.L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nat Rev Microbiol** 20, 270–284 (2022). Acesso em: 15 de Junho 2024.

⁴ ABDULMOHSEN H. A. R, Faisal A. O. "Novel SARS-CoV-2 outbreak and COVID19 disease; a systemic review on the global pandemic," **Genes & Diseases**, Volume 7, emissão 4, 2020. Acesso em: 15 de Junho 2024.

⁵ HASÖKSÜZ, M. *et al.* "Coronaviruses and SARS-COV-2." **Turkish journal of medical sciences** vol. 50,SI-1 549-556. 21 Apr. 2020, doi:10.3906/sag-2004-127. Acesso em: 15 de Junho 2024.

- ⁶ VLASOVA, Anastasia N et al. "Two-way antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and group 1 animal CoVs is mediated through an antigenic site in the N-terminal region of the SARS-CoV nucleoprotein." **Journal of virology** vol. 81,24 (2007): 13365-77. doi:10.1128/JVI.01169-07 Acesso em: 15 de Junho 2024.
- ⁷ DAFYDD R. Owen et al.,An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19.**Science** 374,1586-1593(2021) Acesso em: 15 de Junho 2024.
- ⁸ QIAO, Jingxin et al. "SARS-CoV-2 Mpro inhibitors with antiviral activity in a transgenic mouse model." **Science** (New York, N.Y.) vol. 371,6536 (2021): 1374-1378. Acesso em: 15 de Junho 2024
- ⁹ UZUNIAN, A. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, p. e3472020, 2020.Acesso em: 15 de Junho 2024.
- ¹⁰ GRÄF, T. Diversidade dos coronavírus, origem e evolução do SARS-COV-2. In: Barral-Netto, M.; Barreto, M. L.; Pinto Junior, E. P.; Aragão, E. (org.). Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais. Salvador: Edufba, 2020. v. 1. Acesso em 15 de Junho 2024.
- ¹¹ Ciotti, M., *et al.* "The COVID-19 pandemic. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences", 57(6), 365–388. 2020. Acesso em: 20 de Junho 2024.
- ¹² WHO. World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/>. Acesso em: 27 de Agosto 2024.
- ¹³ SUS. Ministério da Saúde - COVID-19 NO BRASIL. Disponível em: <https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html>. Acesso em: 27 de Agosto 2024.
- ¹⁴ LIMA, A. A. "Sorovigilância Da Prevalência De Igg Anti-Sars-Cov-2 em Doadores De Sangue no Ceará Em 2020 E 2021". Universidade Federal do Ceará, 2022. Acesso em 15 de Junho 2024.

- ¹⁵ TENCHOV, R. “As proteínas intrinsecamente desordenadas são a chave para tratar a Covid-19?”. **Information Scientist, CAS**. (2022) Disponível em: <https://www.cas.org/pt-br/resources/cas-insights/drug-discovery/intrinsically-disordered-proteins-covid-19> Acesso em: 19 de Junho de 2024.
- ¹⁶ UZUNIAN A. “Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19”. **J Bras Patol Med Lab**. 2020;56:e3472020. disponível em: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200053> Acesso em: 19 de Junho de 2024.
- ¹⁷ OLIVEIRA S. B. A. “Muscle biopsy with different levels of histological sections: an old procedure as a “still modern” approach.” **J. Bras. Patol. Med. Lab** Disponível em: DOI: 10.5935/1676-2444.20170026 Acesso em: 20 de Junho 2024
- ¹⁸ GASPARINI, P. *et al* “Unveiling mutation effects on the structural dynamics of the main protease from SARS-CoV-2 with hybrid simulation methods”. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. Volume 121,2023.15 de Junho 2024.
- ¹⁹ DUELEN, R., *et al*. Medicinal Biotechnology for Disease Modeling, Clinical Therapy, and Drug Discovery and Development. In: Matei, F., Zirra, D. (eds) Introduction to Biotech Entrepreneurship: From Idea to Business. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22141-6_5 Acesso em: 20 de Junho 2024
- ²⁰ BERMAN H. M, *et al*. The Protein Data Bank, Nucleic Acids Research, Volume 28, Issue 1, 1 January 2000, Pages 235–242, Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- ²¹ KUZIKOV M., *et al*. Identification of Inhibitors of SARS-CoV-2 3CL-Pro Enzymatic Activity Using a Small Molecule in Vitro Repurposing Screen. **ACS Pharmacol Transl Sci**. 2021;4(3):1096-1110. Published 2021 Mar 11. Disponível em doi:10.1021/acsptsci.0c00216
- ²² KIM, S., ET AL. (2023). PubChem 2023 update. **Nucleic Acids Res.**, 51(D1), D1373–D1380. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>
- ²³ S. H. R. SYBYL 8.1; Tripos Internacional. St. Louis, MO 63144 USA. Disponível em: www.tripos.com.
- ²⁴ Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1. Disponível em: <http://avogadro.cc/>.
- ²⁵ MARCUS D. H., *et al*. “Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform” **Journal of Cheminformatics** 2012, 4:17.
- ²⁶ CCDC. GOLD 5.0. The Cambridge Crystallographic Data Center. Disponível em: http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold.

²⁷ PETERSEN E.F., *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.** 2004 Oct;25(13):1605-12. doi: 10.1002/jcc.20084.

²⁸ FRICKER P., *et al.* Automated Generation of Structural Molecular Formulas under Constraints. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, 44, 1065-1078. 2004.

²⁹ RAREY M., *et al.* A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm, **Journal of Molecular Biology**, 261, 470-489. 1996.

³⁰ SUNSERI J., KOES D. R. Pharmit: interactive exploration of chemical space, *Nucleic Acids Research*, Volume 44, Issue W1, 8 July 2016, Pages W442–W448, Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw287>.