

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Química**

Maurício Jaeger Soares

**Estudo “in silico” dos Componentes do Medicamento Paxlovid na Ação
Conjunta como Inibidor da Proteína Humana CYP3A4 e da Proteína M^{pro} do
Vírus SARS-CoV-2**

Porto Alegre

2023

Maurício Jaeger Soares

**Estudo “in silico” dos Componentes do Medicamento Paxlovid na Ação
Conjunta como Inibidor da Proteína Humana CYP3A4 e da Proteína M^{pro} do
Vírus SARS-CoV-2**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em Química
do Instituto de Química da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Augusto Netz

Co-orientador: Guilherme Pinheiro da Silva

Porto Alegre

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Soares, Maurício Jaeger
Estudo "in silico" dos Componentes do Medicamento Paxlovid na Ação Conjunta como Inibidor da Proteína Humana CYP3A4 e da Proteína Mpro do Vírus SARS-CoV-2 / Maurício Jaeger Soares. -- 2023.
55 f.
Orientador: Paulo Augusto Netz.

Coorientador: Guilherme Pinheiro da Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Bacharelado em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. SARS-CoV-2. 2. Mpro. 3. Paxlovid. 4. nirmatrelvir. 5. ritonavir. I. Netz, Paulo Augusto, orient. II. Silva, Guilherme Pinheiro da, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maurício Jaeger Soares

Estudo “in silico” dos Componentes do Medicamento Paxlovid na Ação Conjunta como Inibidor da Proteína Humana CYP3A4 e da Proteína M^{PRO} do Vírus SARS-CoV-2

Trabalho de Conclusão de Curso

Aprovada em:Porto Alegre, 23 de agosto de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Paulo Augusto Netz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Hubert Stassen
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Silma Alberton Corrêa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedico este trabalho à memória de meu pai, pelo incentivo permanente quando os caminhos da vida exigiram elencar prioridades que se opunham à rotina acadêmica e me levaram a hesitar na busca pela graduação.

AGRADECIMENTOS

A condução deste trabalho não seria possível sem a contribuição incansável de meu co-orientador, Guilherme Pinheiro da Silva e do professor e orientador Dr. Paulo Augusto Netz, razão pela qual deixo registrado meu agradecimento pela disposição e coragem de seguirem ao meu lado na superação de cada obstáculo.

Agradeço também ao colega de grupo de pesquisa Thiago Garcia, doutorando nesta instituição, pela disposição, sensibilidade e indispensável apoio nas horas de maior angústia diante do desafio de aprender e compreender a área da Química Teórica e Computacional e suas potencialidades.

Não menos importante foram também minha mãe, Maria Helena, meu pai, Valdomiro (in memoriam), e meus irmãos Fernando, André e Marcus no incentivo, na tolerância e no apoio logístico para que eu pudesse terminar essa jornada sem que minha ausência compromettesse as demandas de uma rotina típica de quem, há muito tempo, abandonara a vida de estudante.

Por fim, agradeço à minha esposa, Jacqueline, e aos meus filhos, Vinicius e Gabriel pela paciência e pela capacidade de inverterem os “papéis” sempre que se tratava de iluminar a estrada para que eu pudesse chegar até o final dessa jornada.

RESUMO

O Paxlovid® é um medicamento desenvolvido por pesquisadores da indústria Pfizer Inc., composto pela administração combinada de um inibidor de protease, denominado nirmatrelvir, e um inativador de enzima CYP3A4, denominado ritonavir. De acordo com o fabricante, o ritonavir é utilizado para aumentar a concentração plasmática do nirmatrelvir, que desempenha o papel de inibidor da protease viral. Este trabalho foi executado utilizando-se as técnicas computacionais de docagem molecular para predição de afinidade dos componentes do medicamento Paxlovid®, os fármacos ritonavir e nirmatrelvir, com o objetivo de identificar as energias de ligação e as interações com a proteína M^{pro}, do vírus SARS-CoV-2. A docagem foi empregada também nas simulações entre o componente ritonavir e a enzima CYP3A4, citocromo responsável pelo metabolismo primário da maioria dos agentes xenobióticos. Para essa finalidade foram utilizados os programas AutoDock 4.2 e AutoDock Vina, sendo as análises executadas com os softwares AutoDock Tools (ADT), PyMol e Discovery Studio. Complementando os objetivos deste trabalho, foi realizada ainda a simulação de dinâmica molecular clássica em duplicata para as análises do comportamento dinâmico entre o inibidor nirmatrelvir e o receptor viral M^{pro}. Os resultados indicaram que, no período de 200 ns, o ligante permaneceu ancorado ao sítio ativo da protease M^{pro}, corroborando com o que já havia sido publicado na literatura recente.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, M^{pro}, COVID-19, Paxlovid, nirmatrelvir, ritonavir.

ABSTRACT

Paxlovid® is a drug developed by the pharmaceutical company Pfizer Inc., and is composed of the combined administration of a protease inhibitor, called nirmatrelvir, and an inactivator of the CYP3A4 enzyme, called ritonavir. According to the manufacturer, ritonavir is used to increase the plasma concentration of nirmatrelvir, which plays the role of viral protease inhibitor. This work was carried out using the computational techniques of molecular docking to predict the affinity of the components of the drug Paxlovid®, the drugs ritonavir and nirmatrelvir, with the aim of identifying the binding energies and interactions with the M^{pro} protein of the SARS-CoV-2 virus. The docking technique was also used in simulations between the ritonavir component and the CYP3A4 enzyme, the cytochrome responsible for the primary metabolism of most xenobiotic agents. For this purpose, the AutoDock 4.2 and AutoDock Vina softwares were used, and the analyzes were performed with the AutoDock Tools (ADT), PyMol and Discovery Studio softwares. Complementing the objectives of this work, the simulation of classic molecular dynamics was also carried out in duplicate for the analysis of the dynamic behavior between the inhibitor nirmatrelvir and the viral receptor M^{pro}. The results indicated that, in the period of 200 ns, the ligand remained anchored to the active site of the protease M^{pro}, corroborating what had already been published in the recent literature.

Keywords: SARS-CoV-2, Mpro, COVID-19, Paxlovid, nirmatrelvir, ritonavir

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da morfologia do coronavírus.....	16
Figura 2 - Representação da estrutura homodimérica da proteína M ^{pro} e seu sítio ativo.....	19
Figura 3 - Representação em 2D do inibidor da protease principal do vírus SARS-Cov PF - 00835231.....	23
Figura 4 – Estrutura 2D da molécula de nirmatrelvir com as alterações propostas em relação ao PF-00835231.....	24
Figura 5 – Representação em 2D da molécula do ritonavir.....	25
Figura 6 – Representação das interações moleculares entre o ligante nirmatrelvir e o receptor M ^{pro}	34
Figura 7 – Representação das interações moleculares entre o ligante ritonavir e o receptor M ^{pro}	35
Figura 8 – Representação das interações moleculares entre o ligante nirmatrelvir e o complexo M ^{pro} /ritonavir.....	36
Figura 9 – Representação das interações moleculares entre o ligante ritonavir e o complexo M ^{pro} /nirmatrelvir.....	37
Figura 10 – Representação das interações moleculares entre o ligante ritonavir e a proteína CYP3A4.....	39
Figura 11 - Gráficos do cálculo do RMSD para o sistema M ^{pro} e nirmatrelvir, sendo em A, a primeira replicata e em B, a segunda replicata.....	40
Figura 12 - Resultados gráficos do cálculo das distâncias entre o receptor M ^{pro} e o ligante nirmatrelvir, sendo em A o resultado de primeira replicata e em B, o resultado da segunda replicata.....	41
Figura 13 - Resultados gráficos do número de ligações de hidrogênio formadas durante o período de simulação, sendo a primeira replicata em A e a segunda, em B.....	41
Figura 14 - Gráficos de RMSF em relação ao esqueleto da cadeia sendo em A, a primeira replicata e em B, a segunda replicata.....	42
Figura 15 - Reprodução gráfica dos resultados dos cálculos de ΔG em cada uma das replicadas da DM.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT – AutoDock Tools

Arg – Arginina

Ala – Alanina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Cys – Cisteína

DM – Dinâmica molecular

Gln – Glutamina

Glu – Ácido glutâmico

Gly – Glicina

Hem – Grupo prostético férrico

Hys – Histidina

HIV – Human Immunodeficiency Virus

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses

Ile – Isoleucina

Leu – Leucina

MERS-CoV – Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus

Met – Metionina

M^{pro} – Proteína não estrutural Main Protease

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDB – Protein Data Bank

Phe – Fenilalanina

Pro – Prolina

RdRp – RNA dependente RNA polimerase

RNA – Ácido Ribonucleico

SARS – Severe Acute Respiratory Syndrome

SARS-CoV – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus

Ser – Serina

Thr – Treonina

Try – Triptofano

Tyr – Tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 O CORONAVÍRUS.....	16
3.2 O SARS-COV-2.....	17
3.3 A PROTEÍNA M ^{PRO}	18
3.4 A PROTEÍNA CYP3A4	20
3.5 O PAXLOVID®	22
3.6 A DOCAGEM E A DINÂMICA MOLECULAR COMO ESTRATÉGIA NO DESENHO RACIONAL DE FÁRMACOS BASEADO EM ESTRUTURA.....	25
4 METODOLOGIA DE TRABALHO	27
4.1 SIMULAÇÕES DE DOCAGEM COM O PROGRAMA AUTODOCK 4.2	29
4.2 SIMULAÇÕES DE DOCAGEM COM O PROGRAMA AUTODOCK VINA	31
4.3 ENSAIO DE DINÂMICA MOLECULAR PARA O LIGANTE NIRMATRELVIR E O RECEPTOR M ^{PRO}	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1 DOCAGEM DO LIGANTE NIRMATRELVIR COM O RECEPTOR M ^{PRO}	32
5.2 DOCAGEM DO LIGANTE RITONAVIR COM O RECEPTOR M ^{PRO}	34
5.3 DOCAGEM DO LIGANTE NIRMATRELVIR COM O COMPLEXO M ^{PRO} /RITONAVIR.....	35
5.4 DOCAGEM DO LIGANTE RITONAVIR COM O COMPLEXO M ^{PRO} /NIRMATRELVIR.....	36
5.5 DOCAGEM DO LIGANTE RITONAVIR COM O RECEPTOR CYP3A4	37
5.6 ANÁLISE DE DINÂMICA MOLECULAR DO COMPLEXO M ^{PRO} /NIRMATRELVIR	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE A — HISTOGRAMAS DE SIMULAÇÕES COM O AUTODOCK 4.2	49
APÊNDICE B – RELATÓRIOS DAS SIMULAÇÕES COM O AUTODOCK VINA ...	51

1 INTRODUÇÃO

No final de 2019, a humanidade começava a se deparar com um dos maiores desafios sanitários do, ainda infante, século XXI. A infecção respiratória grave que avançava em escala exponencial, denominada posteriormente como COVID-19, começava a fazer suas primeiras vítimas no continente asiático (RIOU; ALTHAUS, 2020). Naquele momento não era perceptível às organizações sanitárias a real dimensão do problema que viria a se impor como prioridade absoluta nas pesquisas em saúde humana pelos meses seguintes. Os médicos e cientistas chineses se ocupavam de tentar identificar o que poderia estar por trás daquela síndrome respiratória aguda e com características distintas das infecções respiratórias até então conhecidas. Com a declaração do estado de emergência sanitária global pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 30 de janeiro de 2020 (GHASEMLOU; USKOKOVIĆ; SEFIDBAKHT, 2022) e, dada a gravidade da situação, cientistas do mundo todo passaram a se dedicar ao estudo das variáveis envolvidas naquele cenário que, posteriormente, veio a ser popularmente conhecido como a pandemia de COVID-19 e que, até fevereiro de 2022, já atingia mais de 438 milhões de pessoas, com uma taxa de letalidade próxima de 1,4% (LI *et al.*, 2022).

Dentre as iniciativas de pesquisa voltadas a conter os efeitos econômicos e sociais desastrosos da pandemia, destacaram-se estudos e avanços no desenvolvimento e fabricação de vacinas que pudessem reduzir o ritmo do contágio. Este trabalho conjunto já resultava em 2021 em um total de 11 vacinas aprovadas para uso no combate à pandemia (ISTIFLI *et al.*, 2021). Enquanto o desenvolvimento das vacinas visava obstar a disseminação acelerada do vírus, a descoberta de novos medicamentos que pudessem mitigar os danos biológicos da infecção e recuperar as condições de saúde das pessoas acometidas pela forma mais grave da doença se impunha como única alternativa capaz de conter o crescente número de óbitos e recuperar as condições de normalidade de um sistema de saúde em colapso, inclusive nas nações mais desenvolvidas. Nesse contexto, a estratégia de reposicionamento de fármacos se apresentava como o caminho mais rápido e econômico para buscar a recuperação das pessoas infectadas pela forma mais grave daquela doença.

Originalmente idealizado para reduzir um “gap” de produtividade da indústria farmacêutica, o reposicionamento de fármacos pode ser definido como o processo de

busca por novas possibilidades de uso de um determinado fármaco, distinto daquele para o qual foi inicialmente planejado durante seu processo de desenvolvimento e aplicação. Este processo associa a redução de custos, riscos e prazos nos estudos relacionados à busca por soluções na área da saúde humana (ASHBURN; THOR, 2004).

A pandemia de COVID-19 e suas demandas reuniam condições de emergência suficientes para que a comunidade científica se mobilizasse sobre essa estratégia, aliando a construção do conhecimento sobre um vírus recentemente identificado às técnicas bioquímicas recentes envolvendo estrutura e síntese de proteínas, às ferramentas de química computacional e à farta disponibilidade de moléculas sintetizadas para fins terapêuticos.

Este trabalho apresenta os resultados de estudos “in silico” direcionados para a avaliação das condições de inibição relacionadas às duas substâncias químicas que compõem o medicamento Paxlovid[®], produzido pela empresa Pfizer Inc.. Na revisão bibliográfica são apresentados os principais conceitos relacionados à estrutura viral do Coronavírus, incluindo uma breve descrição da protease principal do SARS-CoV-2, a M^{pro}. Também é apresentada uma descrição das principais funções associadas à enzima CYP3A4, responsável pelo metabolismo da grande maioria dos agentes xenobióticos no ser humano. Na seção seguinte, sucintamente se descreve o emprego das técnicas de docagem e dinâmica molecular clássica aplicadas à abordagem para reposicionamento de fármacos e aos estudos preliminares para a aplicação do Paxlovid[®] em testes clínicos. Na seção de Materiais e Métodos estão descritos os protocolos utilizados para as análises de afinidade e conformações obtidas a partir dos métodos computacionais empregados. A seção Resultados e Discussões apresenta os resultados para as energias de ligação que envolvem a associação dos componentes do Paxlovid[®] individualmente com a proteína M^{pro} e de cada um deles com o complexo ligante/M^{pro}, avaliando possíveis interferências, os resíduos de aminoácidos que interagem com cada um dos componentes do fármaco e o comportamento dinâmico do complexo receptor/ligante, considerando o resultado mais promissor na simulação de docagem molecular. São apresentados ainda os resultados das análises de desvio quadrático médio da proteína e do complexo ligante/receptor, o número de ligações de hidrogênio formadas, o comportamento da distância entre o receptor e o ligante e o comportamento flexível dos resíduos ao longo do período de 200 ns. Nas considerações finais, apresentamos a análise decorrente

do desenvolvimento do trabalho, referenciando os resultados produzidos com a bibliografia recente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é estudar, através de técnicas computacionais de docagem e dinâmica molecular, as condições de ancoragem e de interação das moléculas que compõem o medicamento Paxlovid® com as proteínas alvo M^{pro}, do vírus SARS-CoV-2, e a proteína CYP3A4, do hospedeiro humano, buscando identificar, através de simulações “in silico”, as potencialidades daquele fármaco como inibidor na replicação viral e na contenção do agravamento no estado de saúde das pessoas infectadas. O Paxlovid® foi aprovado pela ANVISA para uso oral em pacientes sintomáticos pelo período de 3 a 5 dias, e sua administração busca reduzir os danos à saúde das pessoas infectadas pelo COVID-19, impedindo a progressão da doença para condições de maior gravidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Realizar o estudo de docagem do componente nirmatrelvir (PF-07321322) com a proteína viral M^{pro}, do vírus SARS-CoV-2, buscando identificar a energia de ligação e os resíduos de aminoácidos que interagem com a molécula;
- II) Realizar o estudo de docagem do componente ritonavir com a proteína viral M^{pro}, do vírus SARS-CoV-2, identificando a energia de ligação e as associações intermoleculares com os resíduos de aminoácidos da proteína, buscando identificar possíveis interferências sobre a ação inibidora do nirmatrelvir;
- III) Realizar o estudo de docagem de cada um dos componentes do medicamento Paxlovid® com as estruturas formadas a partir da simulação entre a proteína viral M^{pro} e o outro ligante;
- IV) Realizar o estudo “in silico” de docagem do componente ritonavir com a proteína do hospedeiro CYP3A4 identificando a energia de ligação, as interações intermoleculares e qual a sua relação para a elevação da biodisponibilidade do nirmatrelvir como inibidor viral;
- V) Realizar o estudo “in silico” utilizando a metodologia de dinâmica molecular clássica para avaliar a estabilidade temporal das interações intermoleculares do complexo nirmatrelvir/M^{pro};

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O CORONAVÍRUS

Embora não reconhecidos inicialmente pela denominação de “coronavírus”, estes patógenos foram identificados na década de 1960. O reconhecimento de uma nova família de vírus denominada *Coronaviridae* se deu formalmente no ano de 1975 pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (STURMAN; HOLMES, 1983).

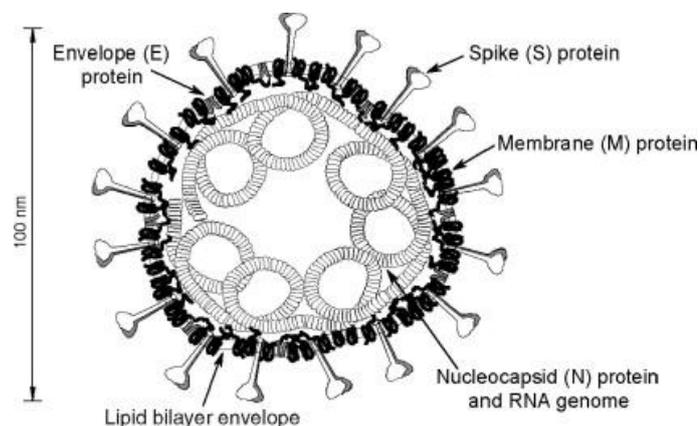
O coronavírus é classificado em sua taxonomia como uma das subfamílias que compreendem a família denominada *Coroviridae* (GORBALENYA *et al.*, 2020). Nesta classificação, a espécie SARS do coronavírus, daqui em diante expressa como SARS-CoV, pertence ao segundo de três grupos associados à esta subfamília. Segundo Zhao e outros (2021), os vírus do tipo CoV são subdivididos em quatro gêneros: alfa-coronavírus, beta-coronavírus, delta-coronavírus e gama-coronavírus. Seus hospedeiros incluem o ser humano e outros vertebrados (ZHAO *et al.*, 2021).

Na condição de vírion sua morfologia apresenta formato majoritariamente esférico, com diâmetro médio de 80 nm a 120 nm. Na superfície esférica se destacam picos em forma de pétalas denominados espículas ou peplômeros, que se projetam perpendicularmente com comprimento de 17 a 20 nm (MASTERS, 2006).

O coronavírus é um vírus de RNA de fita simples e senso positivo. Sua estrutura proteica compreende quatro proteínas estruturais: o envelope (E), a membrana (M), o nucleocapsídeo (N) e as espículas, denominadas “proteína Spike” (S).

A Figura 1 apresenta o desenho esquemático da estrutura de um coronavírus.

Fig. 1 – Representação esquemática da morfologia do coronavírus (MASTERS, 2006, p. 199);



A glicoproteína Spike (S) é a proteína que media a interação do vírus com o receptor humano, levando à entrada do vírus na célula através da membrana celular do hospedeiro. A membrana (M) é a proteína que dá a forma esférica ao vírion e, conforme Masters, é relativamente bem conservada dentro do mesmo grupo de *Coronaviridae*. A terceira proteína estrutural que compõe o envelope viral é a proteína envelope (E). Masters se refere à proteína E como o “constituente menor dos vírions” e, por esta condição, reconhecida posteriormente em relação às demais como componente independente na estrutura viral. A proteína N se liga o RNA do vírus para formar o nucleocapsídeo (MASTERS, 2006).

Os vírus da família *Coronaviridae* apresentam ainda no seu genoma várias proteínas não estruturais, entre as quais, a protease denominada M^{pro} (main protease).

Somente no início do século XXI já foram identificadas três cepas de coronavírus com potencial para infecção grave em seres humanos e que podem levar à condição clínica definida como Síndrome Respiratória Aguda Grave, SARG ou, como mais conhecida popularmente pela sua sigla em inglês, SARS. São elas o SARS-CoV-1, em 2003, o MERS-CoV, em 2009 e o SARS-CoV-2, em 2019 (WONG; SAIER, 2021).

3.2 O SARS-COV-2

De acordo com Gorbalenya e outros, a existência de uma grande variedade de vírus que circulam na natureza, não ainda fenotipicamente caracterizados, impõe a determinação da sequência genômica como estratégia indispensável na identificação e classificação de um vírus específico. O autor e colegas postulam que, enquanto os estudos experimentais se limitam a uma fração dos vírus conhecidos, os estudos computacionais de genômica são usados para caracterizar e classificar todos os vírus. Nesse sentido, afirmam os autores, “(...) a nomenclatura do vírus não está necessariamente ligada à doença, mas sim informada por outras características” (GORBALENYA *et al.*, 2020). A denominação de SARS-CoV-2 passou a ser adotada a partir de março de 2020 com o trabalho desenvolvido pelo CSG (Coronaviridae Study Group) sob supervisão do ICTV (GORBALENYA *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 se liga ao receptor da célula hospedeira através de interação da proteína estrutural Spike (S) com a enzima humana conversora de angiotensina 2 (ACE2), infectando principalmente as células epiteliais e alveolares no sistema

respiratório. A ACE2 é expressa nas células epiteliais do pulmão humano e em outros tecidos, permitindo com que o vírus possa causar outros danos sistêmicos à pessoa infectada (DEHELEAN *et al.*, 2020). Ainda, de acordo com Dehelean e outros (2020), após a fusão celular, o RNA traduz duas poliproteínas, denominadas pp1a e pp1ab, que formarão o complexo replicação-transcrição (RTC). O RTC irá replicar o RNA subgenômico e o processo de tradução formará as proteínas estruturais e não estruturais que se agruparão, em conjunto com o RNA genômico, em vesículas contendo os vírions capazes de infectar novas células no hospedeiro (DEHELEAN *et al.*, 2020).

As poliproteínas do tipo replicase pp1a e pp1ab são clivadas na região N-proximal pela protease tipo papaína protease e na região C-proximal pela protease principal denominada 3C-tipo cisteína protease (3CL^{PRO}) ou main protease (M^{PRO}) (HEGYI; ZIEBUHR, 2002).

De acordo com Li e outros (2022), enzimas e proteínas virais que estejam envolvidas no processo de replicação são alvos potenciais no desenvolvimento de drogas que possam conter o processo infeccioso. Em especial, a protease M^{PRO} apresenta alta taxa de conservação e não possui homólogo humano, o que reduziria o risco de inatividade em relação à novas mutações e diminuiria a possibilidade de efeitos colaterais (LI *et al.*, 2022). Assim, proteínas não estruturais do SARS-CoV-2, como a M^{PRO} e a RdRp (RNA dependente RNA polimerase) passaram à condição de alvo potencial nas pesquisas relacionadas à descoberta de fármacos que pudessem conter os efeitos clínicos da COVID-19 (ZHAO *et al.*, 2021).

3.3 A PROTEÍNA M^{PRO}

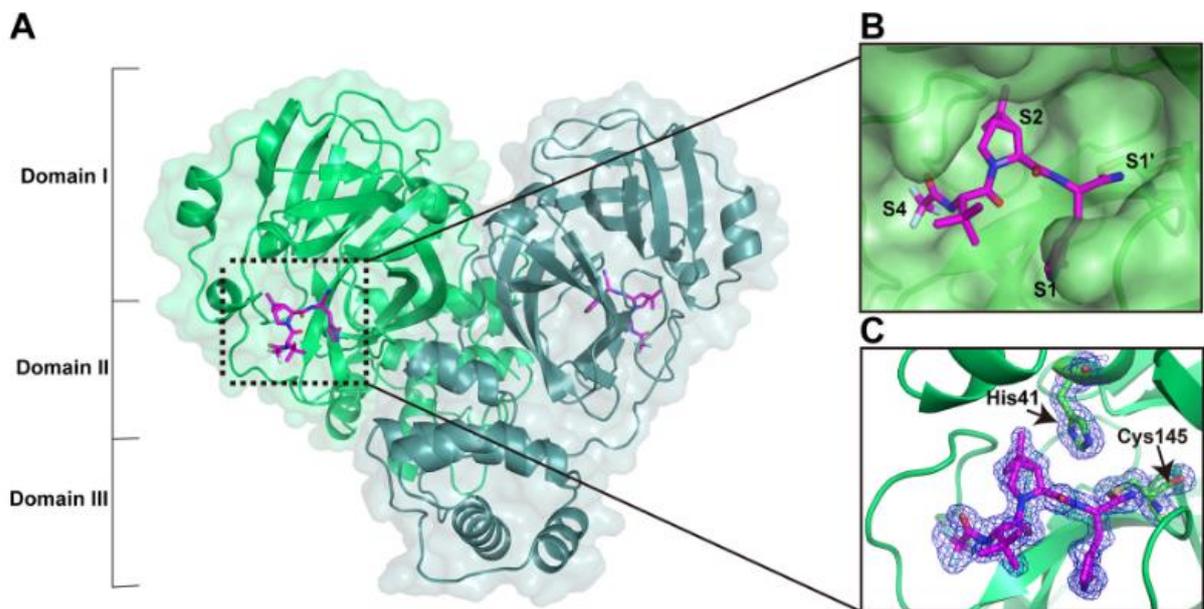
Conforme Zhao e outros (2022), após a entrada do vírus na célula do hospedeiro, as poliproteínas pp1a e pp1ab são traduzidas utilizando o ribossomo celular do hospedeiro. Estas replicases são clivadas em 16 proteínas não estruturais (nsp's) pela protease M^{PRO} e pela protease tipo papaína (PL^{PRO}) (ZHAO *et al.*, 2022). Esse processo é fundamental para que o vírus se multiplique nas células hospedeiras.

A M^{PRO} é uma protease de cisteína e, de acordo com Zhao e outros, se separa das poliproteínas através de autoclivagem formando um homodímero para, então, clivar as poliproteínas em um mecanismo ainda não bem determinado (ZHAO *et al.*, 2022). A estrutura proteica compreende um homodímero formado por 3 domínios e,

de acordo com Li e outros, a cavidade longa e estreita entre os domínios I e II apresenta múltiplos sítios de ligação para potenciais inibidores (LI *et al.*, 2022).

Li e colegas apresentam a estrutura cristalina de um complexo formado pela M^{pro} e o inibidor nirmatrelvir indicando os subsítios de interação, conforme representado na Figura 2.

Fig. 2 – Representação da estrutura homodimérica da M^{pro} com os 3 domínios e os dois protômeros (A), a região dos subsítios de interação com o nirmatrelvir (B) e os dois resíduos da díade catalítica (C). Fonte: (ZHAO *et al.*, 2022), p. 4.



O domínio I é formado pelos resíduos 8 até 101, e o domínio II pelos resíduos 102 até 184. Estes dois domínios formam uma estrutura secundária do tipo β -barril antiparalelo. O domínio III, compreendido pelos resíduos 201 até 303, apresenta 5 α -hélices majoritariamente antiparalelas formando uma estrutura terciária globular conectada ao domínio II por uma volta envolvendo os resíduos 185 a 200 (JIN *et al.*, 2020). De acordo com Ahmad e colegas, o sítio ligante compreende quatro subsítios denominados S1, S1', S2 e S4, relativamente bem conservados entre os coronavírus, de forma que um possível agente agonista poderia truncar o processo de clivagem, produzindo mínimos ou nenhum efeito colateral em razão da não existência de homólogo humano para esta protease e impedindo a replicação do vírus (AHMAD *et al.*, 2021).

Em artigo publicado em 2005, Yang e colegas indicam que as regiões mais susceptíveis às mutações estão concentradas nas hélices do domínio III e nas voltas superficiais, enquanto a cavidade do sítio catalítico, localizada entre os domínios I e II, apresenta forte conservação entre as M^{PRO}s nos vírus do tipo CoV. Segundo os autores, estas proteases apresentam uma díade catalítica His-Cis de orientação relativamente bem conservada, onde a histidina atua como acceptor de próton, enquanto a cisteína atacaria o carbono carbonílico de um possível inibidor, formando uma ligação covalente semelhante ao intermediário formado no processo de clivagem (YANG *et al.*, 2005).

3.4 A PROTEÍNA CYP3A4

O citocromo P450 é formado por um conjunto de enzimas que possuem o grupo prostético heme, e tem a função de mediar o metabolismo de substâncias químicas endógenas e/ou xenobióticos, tornando-as mais hidrofílicas e facilitando a sua excreção. De acordo com Manikandan e Nagini, o termo CYP refere-se às proteínas onde o grupo heme férrico age como cofator, e os algarismos arábicos 450 indicam o comprimento de onda máximo de absorção quando a proteína está no estado reduzido na presença de monóxido de carbono. Ainda, segundo Manikandan e Nagini, esta superfamília de enzimas incluem mais de treze mil genes com mais de quatrocentas famílias de genes presentes em todos os reinos biológicos (MANIKANDAN; NAGINI, 2018).

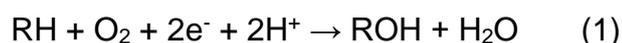
Para efeitos de designação, o termo CYP é seguido por um algarismo indicando a família, uma letra indicando a subfamília e outro algarismo especificando o gene. Assim, o termo CYP3A4 define a proteína traduzida pelo gene 4, da subfamília A e família 3 (MANIKANDAN; NAGINI, 2018).

As enzimas CYP catalisam reações de oxidação e hidroxilação, e são classificadas em duas grandes classes: aquelas que metabolizam os agentes xenobióticos e aquelas envolvidas no metabolismo de compostos endógenos. De acordo com Manikandan e Nagini, as proteínas CYP ligadas à membrana estão majoritariamente presentes nos eucariotos, enquanto as formas solúveis estão presentes nos procariotos (MANIKANDAN; NAGINI, 2018). Conforme indicam Loos, Beijnen e Schinkel (2022, p. 1), existem 57 enzimas CYP identificadas em humanos, as quais estão classificadas em 18 famílias com funções fisiológicas específicas.

Destas famílias, as mais relevantes para o metabolismo de fármacos são as CYP1, CYP2 e CYP3, responsáveis por metabolizar aproximadamente 80% dos medicamentos utilizados atualmente, sendo a CYP3A responsável pelo metabolismo primário de 50% destes xenobióticos devido à amplitude de especificidade de seus substratos. Ainda, segundo Loos, Beijnen e Schinkel, a atividade de inibição ou indução da CYP3A pode variar bastante entre indivíduos ou mesmo em um único indivíduo em razão da amplitude de substratos. Esta condição está associada à origem dos problemas de subexposição ou superexposição, que impactam nas diversas reações possíveis nos indivíduos para um mesmo agente xenobiótico (LOOS; BEIJNEN; SCHINKEL, 2022).

Na subfamília das enzimas CYP3 encontram-se a CYP3A4 e CYP3A5. Ambas dividem uma identidade de 83% entre os aminoácidos que as constituem. Embora apresentem grande sobreposição em seus substratos, cada uma possui suas especificidades e, de acordo com Loos, Beijnen e Schinkel (2022), a CYP3A5 possui sua cavidade catalítica mais alta e estreita em relação à CYP3A4, o que faz com que algumas drogas sejam preferencialmente metabolizadas por uma ou outra, produzindo também metabólitos de natureza distintas. A CYP3A5 é mais abundante nos rins e pulmões, e é expressa no fígado de forma altamente dependente do genótipo e etnia individuais, razão pela qual medicamentos que sejam metabolizados por esta enzima possam impactar de forma distinta em diferentes indivíduos (LOOS; BEIJNEN; SCHINKEL, 2022).

As reações de monooxigenase mediadas pelas CYP3A4 e CYP3A5 ocorrem pela interação do substrato com o átomo de Fe do grupo heme e modificam o substrato através de elétrons recebidos pelo grupo NADPH, reduzindo o O₂ à H₂O e produzindo a hidroxilação no substrato. A reação geral é expressa pela Equação 1.



A CYP3A4 tem como substrato majoritário substâncias xenobióticas, e sua inibição pode produzir efeitos que variam de reações adversas e indesejadas à elevação da biodisponibilidade sanguínea de moléculas que competem pelo mesmo sítio enzimático (MANIKANDAN; NAGINI, 2018). Esta condição permite que a estratégia de associação de dois fármacos distintos possa se tornar mais eficaz no processo terapêutico quando comparada ao uso de um único medicamento. As

pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de antivirais para mitigação da infecção por SARS-CoV-2, não raramente, se alicerçam nessa estratégia para identificar potenciais substâncias capazes de conter a doença. O fármaco Paxlovid[®], desenvolvido pela empresa Pfizer Inc., se utiliza da competição entre duas moléculas distintas, o nirmatrelvir e o ritonavir, para elevar a biodisponibilidade plasmática do primeiro, permitindo sua administração oral em doses seguras e eficazes no combate à COVID-19 (OWEN *et al.*, 2021).

Em trabalho publicado em 2022, Ridhwan e colegas apresentam 76 estruturas depositadas no Protein Data Bank para a CYP3A4, das quais, somente 4 estão na forma de apo proteína. Os resíduos de aminoácidos elencados para a simulação de docagem entre o ligante ritonavir e o receptor CYP3A4 foram compilados deste trabalho (RIDHWAN *et al.*, 2022).

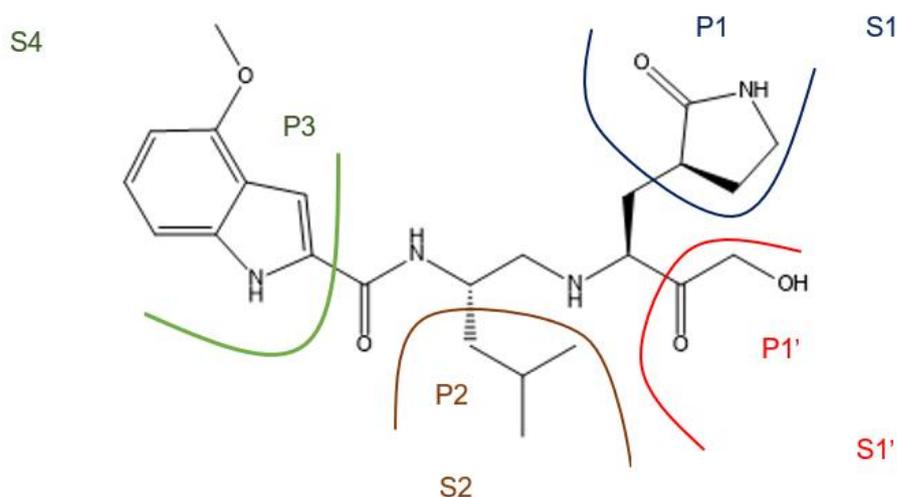
3.5 O PAXLOVID[®]

O uso de medicamentos de fácil manejo e que permitam a administração oral poderia reduzir as internações hospitalares em grandes epidemias, como a que assolou o planeta a partir de janeiro de 2020. Particularmente, para combater a infecção pelo SARS-CoV-2, entre outras moléculas de antivirais largamente testadas, aquelas que objetivam bloquear a ação da protease M^{pro} despertaram grande interesse da comunidade científica pelo seu alto grau de conservação e a não existência de homólogo humano (AHMAD *et al.*, 2021). Dentre os possíveis inibidores virais estudados com o objetivo de conter os prejuízos sanitários relacionados à COVID-19 destacam-se o molnupiravir, o remdesivir, o baricitinib e o Paxlovid[®].

O Paxlovid[®] é um medicamento que contém nirmatrelvir e é administrado em conjunto com outro fármaco, utilizado inicialmente como agente antirretroviral em tratamentos contra a infecção pelo HIV e denominado ritonavir (HULL; MONTANER, 2011). O nirmatrelvir tem como precursor o inibidor de protease de cisteína utilizado para combater a epidemia de SARS-CoV no ano de 2002, identificado pela Pfizer como PF-00835231 e que, de acordo com Owen e colegas, apresentou eficácia nos testes “in vitro” contra o SARS-CoV-2 (OWEN *et al.*, 2021). No entanto, a necessidade de administração intravenosa tornava sua utilização restrita aos ambientes hospitalares, que já apresentavam sinais de colapso à medida que a pandemia avançava pelos continentes asiático, europeu e americano.

Na Figura 3 está representada a estrutura 2D do PF-00835231. O fragmento P1' é descrito por Dai e colegas como uma "ogiva", cujo objetivo seria estabelecer uma ligação covalente com o fragmento lateral tiol do resíduo Cys145, localizado no subsítio S1' do sítio catalítico da M^{pro}. Ainda, o fragmento P1, um anel γ -lactama, ocuparia o subsítio S1, enquanto o fragmento P2 se encaixaria no subsítio lipofílico S2 e o grupo indol (P3) ocuparia o subsítio S4 (DAI *et al.*, 2020).

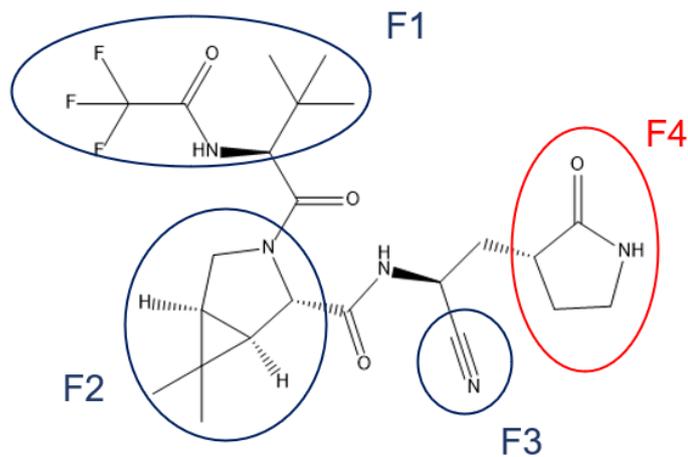
Fig. 3 – Representação em 2D do inibidor PF-00835231 (OWEN *et al.*, 2021), adaptado pelo autor.



Owen e colegas apresentaram em seu trabalho, publicado em 2021, um estudo comparativo entre seis diferentes estruturas moleculares, partindo do PF-00835231, e propondo alternativas concentradas no fragmento que se ligaria à cisteína na fração lipofílica que ocuparia o subsítio S2 e no grupo indol que se encaixaria ao subsítio S4. Os autores argumentam que a presença de grupos doadores de hidrogênio impactaria negativamente na biodisponibilidade oral, e, para melhorar esta condição, propuseram a substituição do fragmento α -hidroximetil cetona (P1') por uma nitrila. O fragmento P2 foi modificado pela proposição de substituição por outro fragmento do tipo 6,6-dimetil-3-azabicyclo hexano, que ocuparia de forma efetiva a cavidade lipofílica formada pelos resíduos His41, Met49, Met169 e Gln189 que compreendem o subsítio S2. A substituição do grupo indol pelo fragmento trifluoroacetamida levou à formulação final do PF-07321332 como candidato potencial para os ensaios clínicos posteriores (OWEN *et al.*, 2021).

A estrutura 2D do nirmatrelvir com as modificações propostas por Owen e colegas está representada na Figura 4.

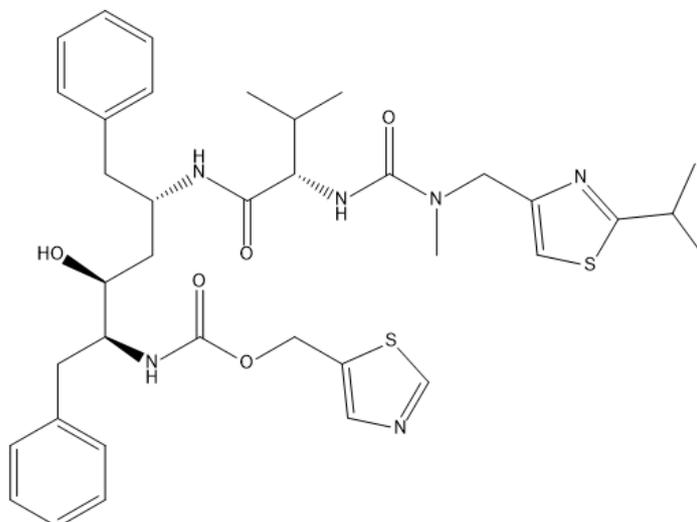
Fig. 4 – Estrutura 2D da molécula de nirmatrelvir com as alterações propostas por Owen e colegas (2021) em relação ao PF-00835231. Os fragmentos modificados estão identificados como F1, F2 e F3 e sinalizados em azul. O grupo γ -lactama, identificado como F4 e sinalizado em vermelho, é comum às duas estruturas.



Os ensaios clínicos de Fase 1 investigaram o uso do nirmatrelvir isoladamente e em ação conjunta com o inibidor da proteína CYP3A4, ritonavir, objetivando avaliar o potencial incremento na biodisponibilidade sanguínea do inibidor da M^{pro}. A utilização das duas substâncias associadas resultou em concentrações sanguíneas maiores e mais prolongadas do nirmatrelvir possibilitando a condução dos ensaios clínicos de Fases 2 e 3 (FOCOSI *et al.*, 2023).

A estrutura 2D do ritonavir está representada na Figura 5.

Fig. 5 – Representação em 2D da molécula do ritonavir.



3.6 A DOCAGEM E A DINÂMICA MOLECULAR COMO ESTRATÉGIA NO DESENHO RACIONAL DE FÁRMACOS BASEADO EM ESTRUTURA

O método de docagem molecular representa um caminho mais rápido e econômico na prospecção de moléculas candidatas a “hits”, ou mesmo na otimização, através de pequenas mudanças estruturais, como a proposta por Owen e colegas para o PF-00835231 (OWEN *et al.*, 2021), tanto mais, em emergências sanitárias como a que foi vivenciada nos últimos três anos. De acordo com Morgon e Coutinho, os métodos computacionais direcionados ao desenho racional de fármacos baseado na estrutura (DRBE) estão integrados à pesquisa nas áreas de Química Medicinal e Química Computacional (MORGON; COUTINHO, 2007).

A docagem molecular é um método computacional pelo qual é possível analisar a conformação e orientação de uma molécula pequena, o ligante, quando ligada ao sítio ativo de uma macromolécula, o receptor, que pode ser ou não a cavidade de uma proteína enzimática. Os programas de docagem se estruturam basicamente em dois aspectos cruciais ao processo: o algoritmo de busca e a função de pontuação.

Segundo Torres e colegas, o algoritmo de busca analisa e gera a conformação do ligante ancorado ao sítio ativo do receptor com base nos graus de liberdade de rotação e translação internos da molécula, enquanto a função de pontuação, através de sucessivos sinais de entrada, identifica a melhor condição de ancoragem pela minimização da energia de ligação total entre o ligante e o receptor. Os algoritmos de

busca podem ser do tipo sistemático, estocástico ou determinístico. Os algoritmos sistemáticos dependem de pequenos incrementos nos graus de liberdade da molécula ligante. Algoritmos estocásticos estão baseados na geração de alterações aleatórias nos graus de liberdade do ligante. Já os algoritmos determinísticos fundamentam a busca pela melhor orientação e conformação na condição de ligação obtida por um estado anterior, objetivando um estado de energia menor ou igual ao anterior (TORRES *et al.*, 2019).

As funções de pontuação podem ser do tipo campo de força, empíricas ou baseadas em conhecimento. As funções de pontuação baseadas no campo de força utilizam as equações da mecânica clássica e as interações atômicas para obter as energias de ligação. Funções de pontuação empíricas derivam das relações quantitativas entre a estrutura formada e a atividade baseadas em dados experimentais conhecidos. Já as funções de pontuação baseadas no conhecimento buscam seus resultados nas frequências das interações interatômicas de estruturas tridimensionais de complexos ligante-receptor obtidas experimentalmente (TORRES *et al.*, 2019).

O sítio de ligação do receptor pode ou não ser previamente conhecido. Quando o sítio não é conhecido, é possível se produzir o que se denomina como “docking cego”. Quando o sítio ativo for previamente conhecido, a docagem pressupõe o uso da representação de uma “caixa” que inclua os resíduos de aminoácidos sujeitos às interações com o ligante de forma a tornar o processo mais rápido e menos oneroso em termos de custos computacionais (TORRES *et al.*, 2019).

As estruturas tridimensionais do ligante e receptor podem ser obtidas através de bancos de dados atualmente disponíveis, notadamente o PubChem e o PDB (Protein Data Bank), entre outros.

No que se refere ao desenho racional de drogas baseado na estrutura (DRBE), os ensaios “in silico” podem representar um caminho mais rápido e econômico no desenvolvimento de um fármaco. Torres e colegas sinalizam esta condição, por exemplo, quando o objetivo da pesquisa é a preparação de um fármaco a partir de uma molécula já estudada e exaustivamente testada, isto é, o que a Química Medicinal denomina de estratégia “hit-to-lead”. Essa estratégia se utiliza de uma série de moléculas previamente propostas, a partir de um composto “hit”, que serão analisadas através dos métodos “in silico” buscando-se identificar a que melhor se encaixa no sítio ativo de um determinado alvo (receptor). Torres e colegas ressaltam, no entanto,

o problema da rigidez das estruturas nos métodos de docagem molecular como uma dificuldade a ser superada quando se trata dos algoritmos de busca. Os autores apontam a construção de “ensembles” conformacionais como um caminho possível na otimização dos resultados obtidos. Por outro lado, as simplificações adotadas para a viabilidade, em termos de custos computacionais, das funções de pontuação durante o processamento de uma biblioteca de compostos também contribuem para a produção de resultados eventualmente questionáveis. As simulações de dinâmica molecular (DM) são métodos que possibilitam a geração desses “ensembles” conformacionais, contornando o problema da rigidez das estruturas, enquanto o uso de bancos de dados com informações experimentais representam um caminho de validação para os resultados de energia de ligação obtidos pelo pesquisador em seus ensaios “in silico” (TORRES *et al.*, 2019).

Hall-Swan e colegas citam a protease M^{pro} como exemplo de receptor maleável cuja flexibilidade estrutural durante o processo de interação com o ligante continua sendo um enorme desafio no desenvolvimento de inibidores eficazes no tratamento da COVID-19. De acordo com os autores, combinar a flexibilidade do receptor e do ligante adiciona complexidade e aumento no custo computacional, podendo inviabilizar o ensaio. Ainda, segundo os autores, a construção de um conjunto de conformações do receptor para a condução de docagem pode implicitamente contornar o obstáculo representado pela rigidez do ligante (HALL-SWAN *et al.*, 2021).

4 METODOLOGIA DE TRABALHO

Os estudos das interações entre os componentes do medicamento Paxlovid[®], o nirmatrelvir e o ritonavir, e os receptores M^{pro}, no SARS-CoV-2, e CYP3A4 no hospedeiro humano, foram conduzidos utilizando os métodos de docagem molecular, isto é, utilizando dimensões previamente configuradas de restrição na região de análise dos resultados produzidos no processo, e de dinâmica molecular clássica. O trabalho desenvolvido compreendeu as etapas de obtenção das estruturas dos ligantes e receptores, as simulações de docagem, a simulação da dinâmica molecular e a análise dos resultados. Todas as etapas foram realizadas no laboratório do Grupo de Química Teórica da UFRGS.

As estruturas 2D do nirmatrelvir (CID 155903259) e ritonavir (CID 392622) foram obtidas no banco de dados PubChem, desenhadas utilizando-se o programa

ChemDraw e salvas no formato .sdf. Posteriormente foram convertidas em formato 3D utilizando-se o programa MarvinSketch (*3D-clean-up*). Os arquivos em formato .pdb foram submetidos ao servidor Automatic Topology Builder (ATB) (MALDE *et al.*, 2011) para minimização de energia utilizando o método QM Semi-Empirical/SCF. Após a otimização da geometria, os arquivos “all atom” das estruturas tridimensionais foram empregados nas simulações de docagem e na dinâmica molecular.

A estrutura da proteína M^{pro} foi selecionada no banco de dados Protein Data Bank (ID: 6LU7, resolução de 2,16 Å), depositada no banco de dados por Jin e colegas. Os autores determinaram a estrutura cristalina da proteína M^{pro} complexada com o peptidomimético denominado N3 com o objetivo de tentar elucidar o mecanismo de inibição daquela protease. De acordo com os autores, a estrutura fornece um modelo para a identificação de novos inibidores nos ensaios “in silico” (JIN *et al.*, 2020). O arquivo em formato .pdb foi então submetido à otimização através do servidor on-line CHARMM-GUI (JO *et al.*, 2008), onde um único protômero foi mantido com o objetivo de restringirmos a interação a somente um único sítio ativo. Para eliminarmos a interferência do ligante N3 na estrutura selecionada sua estrutura foi removida nas simulações de docagem e DM.

A estrutura da proteína CYP3A4 foi obtida através do banco de dados PDB (ID: 1TQN, resolução de 2,05 Å), depositada por Yano e colegas (YANO *et al.*, 2004). De acordo com Ridhwan e colegas, o banco de dados PDB atualmente apresenta 76 estruturas relacionadas à proteína CYP3A4. Destas, 72 se apresentam na forma complexada com três diferentes classes de ligantes: fármacos, fitoquímicos ou substâncias utilizadas no processo de purificação (RIDHWAN *et al.*, 2022). Entre as quatro restantes, a estrutura escolhida foi a que apresentava resolução intermediária. O arquivo em formato .pdb foi então submetido à otimização utilizando-se o servidor CHARMM-GUI (JO *et al.*, 2008), onde foi selecionada a cadeia A e o grupo prostético Heme para as simulações de docagem.

Primeiramente, as simulações conduzidas seguiram a sequência adotada para a análise da interação independente de cada um dos ligantes com a proteína M^{pro}. Posteriormente, a estrutura do complexo formado pela proteína viral e o ligante nirmatrelvir foi utilizada como receptor para a simulação de docagem com o ligante ritonavir e, na etapa seguinte, a estrutura do complexo formado pela M^{pro} com o ritonavir foi utilizada como receptor para a simulação de docagem com o nirmatrelvir. Os resultados das simulações realizadas com o AutoDock 4.2 (MORRIS *et al.*, 2009)

e o AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009) estarão resumidos na Tabela 1. O Apêndice A apresenta os histogramas obtidos nas simulações executadas com o AutoDock 4.2. Nos histogramas, as conformações menos energéticas estão sinalizadas em vermelho. O Apêndice B apresenta os relatórios obtidos nas simulações com o AutoDock Vina.

Considerando o objetivo farmacocinético do ritonavir, que é elevar a biodisponibilidade plasmática do nirmatrelvir, foi realizado um estudo de docagem molecular entre o receptor CYP3A4 e o ligante ritonavir, também utilizando os softwares AutoDock 4.2 e AutoDock Vina.

Para a apresentação dos resultados na Tabela 1, as seguintes definições foram adotadas e assim expressas:

- **MPRO_NIR**: complexo resultante da interação entre o ligante nirmatrelvir e a proteína viral M^{pro} que resultou na energia de ligação mais negativa;
- **MPRO_RIT**: complexo resultante da interação entre o ligante ritonavir e a proteína viral M^{pro} que apresentou a energia de ligação mais negativa;
- **COMP_RIT_NIR**: complexo resultante da interação entre o ligante nirmatrelvir e o receptor MPRO_RIT que apresentou a energia de ligação mais negativa;
- **COMP_NIR_RIT**: complexo resultante da interação entre o ligante ritonavir e o complexo MPRO_NIR que apresentou a energia de ligação mais negativa;
- **CYP3A4_RIT**: complexo resultante da interação entre o ligante ritonavir e a proteína humana CYP3A4 que apresentou a energia de ligação mais negativa;

As interações intermoleculares entre ligante e receptor foram analisadas utilizando-se o programa Discovery Studio Visualizer (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2023).

4.1 SIMULAÇÕES DE DOCAGEM COM O PROGRAMA AUTODOCK 4.2

As simulações com o programa AutoDock Tools (ADT) seguiram o seguinte protocolo:

- a. Adição dos átomos de Hidrogênio;
- b. Adição das cargas de Gasteiger-Marsili;
- c. Exclusão dos átomos de Hidrogênio não polares;

Para as simulações de docagem molecular do componente nirmatrelvir com os receptores M^{pro} e complexo M^{pro}/ritonavir, os resíduos de aminoácidos do sítio de

ligação da proteína M^{pro}, previamente consultados na literatura (GARG *et al.*, 2020), (JIN *et al.*, 2020), (KHAERUNNISA *et al.*, 2020), (LI *et al.*, 2022), (SOULÈRE; BARBIER; QUENEAU, 2021), foram utilizados como base para a construção do “grid box”. Os resíduos selecionados foram Thr24, Thr26, His41, Cys44, Met49, Tyr54, Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, Ser144, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166, Leu167, Pro168, His172, Phe185, Asp187, Gln189, Thr190, Ala191 e Gln192.

Os parâmetros do “grid box” no ADT para este sistema foram:

- Resolução de 0,375 Å (resolução padrão no ADT 4.2);
- 52 x 76 x 80 pontos para docagem;
- Off-set: X = -13.806
Y = 16.762
Z = 67.108

Nas simulações de docagem do ligante ritonavir com o receptor M^{pro} e complexo M^{pro}/nirmatrelvir, os seguintes parâmetros no ADT foram adotados na construção do “grid box”:

- Resolução de 0,375 Å;
- 74 x 82 x 90 pontos para docagem;
- Off-set: X = -14.768
Y = 15.451
Z = 67.867

Para a simulação do ligante ritonavir com o receptor CYP3A4, os resíduos de aminoácidos obtidos da literatura e utilizados como referência para a construção do “grid box” foram Tyr53, Phe57, Phe108, Ser119, Leu210, Leu211, Phe213, Phe215, Leu221, Ile301, Phe304, Ala305, Thr309, Ala370, Arg372, Cys442 e o grupo Heme (RIDHWAN *et al.*, 2022).

Os parâmetros do “grid box” no ADT para este sistema foram:

- Resolução de 0,375 Å;
- 84 x 70 x 72 pontos para docagem;
- Off-set: X = -24.077
Y = - 17.689
Z = -12.641

Para todas as simulações com o AutoDock 4.2, foi selecionado o algoritmo de busca LGA (Lamarckian Genetic Algorithm), o número de corridas fixado em 100 e o número máximo de avaliações selecionado como “long”. Os demais parâmetros foram mantidos conforme o padrão do programa.

4.2 SIMULAÇÕES DE DOCAGEM COM O PROGRAMA AUTODOCK VINA

Para as simulações com o programa AutoDock Vina, utilizou-se os arquivos no formato .pdbqt dos ligantes nirmatrelvir e ritonavir e dos receptores M^{PRO}, complexo M^{PRO}/ritonavir, complexo M^{PRO}/nirmatrelvir e CYP3A4, otimizados conforme descrito anteriormente. Cada simulação foi realizada em triplicata, e os valores médios de cada uma das replicatas estão compilados na Tabela 1.

No AutoDock Vina, os parâmetros do “grid box” para a docagem entre o ligante nirmatrelvir e os receptores M^{PRO} e complexo M^{PRO}/ritonavir foram ajustados em 19.5 x 28.5 x 30 e o centro ajustado em X = -13.806, Y = 16.762 e Z = 67.108. O parâmetro de exaustividade foi ajustado em 10.

Para as simulações entre o ligante ritonavir e os receptores M^{PRO} e complexo M^{PRO}/nirmatrelvir, os parâmetros do “grid box” foram ajustados em 27.75 X 30.75 X 33.75, com o centro ajustado em X = -14.768, Y = 15.451 e Z = 67.867. O parâmetro de exaustividade foi ajustado em 10.

Já para as simulações de docagem do ligante ritonavir com o receptor CYP3A4, os parâmetros do “grid box” foram ajustados com a proporção de pontos de 31.50 X 26.25 X 27.00. As coordenadas do centro foram ajustadas em X = -24.077, Y = -17.689 e Z = -12.641, e o parâmetro de exaustividade foi ajustado em 10.

4.3 ENSAIO DE DINÂMICA MOLECULAR PARA O LIGANTE NIRMATRELVIR E O RECEPTOR M^{PRO}

A simulação de dinâmica molecular (DM) representa um caminho para a análise de sistemas cujas energias envolvidas estejam na ordem de $k_B T$, sendo k_B a constante de Boltzman e T, a temperatura em Kelvin. A DM permite a simulação de sistemas de interesse que envolvam interações entre átomos, moléculas e íons em uma ampla faixa de temperatura em torno da temperatura ambiente. Mais especificamente,

sistemas em temperaturas entre 100 K e 800 K podem ser modelados através de métodos clássicos (MORGON; COUTINHO, 2007).

As coordenadas da proteína foram convertidas em formato .pdb e preparadas para a dinâmica molecular clássica utilizando-se o campo de força CHARMM (BROOKS *et al.*, 1983).

Neste trabalho a simulação em duplicata foi conduzida utilizando-se o pacote GROMACS (ABRAHAM *et al.*, 2023). O ligante nirmatrelvir foi preparado utilizando-se o ADT com a adição dos hidrogênios e conversão para o formato .pdb.

Os arquivos do complexo do ligante e receptor foram submetidos ao servidor on-line CHARMM-GUI para a inclusão das moléculas de água do tipo TIP3P (23737 moléculas), dos íons Na⁺ (71) e Cl⁻ (67) e a construção da caixa, com as faces distantes 9,3 nm do receptor.

O sistema foi então minimizado utilizando-se o método Steepest Descent (ABRAHAM *et al.*, 2023) e submetido à simulação de produção em duplicata pelo período de 200 ns. As simulações foram realizadas no ensemble NPT empregando o método Nose-Hoover para a temperatura controlada em 303,15 K e barostato Parrinello-Rahman com a pressão mantida em 1 atm. As posições e velocidades foram determinadas utilizando-se o algoritmo de Verlet. Os arquivos gerados foram então, agrupados em um único arquivo para as análises.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DOCAGEM DO LIGANTE NIRMATRELVIR COM O RECEPTOR M^{PRO}

Conforme observado na Tabela 1, as simulações de docagem do nirmatrelvir com o receptor M^{PRO} indicaram energia de ligação de -7,84 kcal/mol e -7,60 kcal/mol com AutoDock 4.2 e com o AutoDock Vina, respectivamente. Estas energias de ligação representam o valor mais negativo entre todas as simulações com aquele receptor. O menor valor de energia de ligação registrado por Dawood, utilizando o programa AutoDock Vina e a estrutura do receptor M^{PRO} ID: 6Y2E (ZHANG *et al.*, 2020), obtida no banco de dados Protein Data Bank, foi de -8,1 kcal/mol (DAWOOD, 2023), enquanto Ghasemlou e colegas registraram o valor de -7,96 kcal/mol para o tipo nativo da proteína identificado no PDB com ID 5R82 (GHASEMLOU; USKOKOVIĆ; SEFIDBAKHT, 2022).

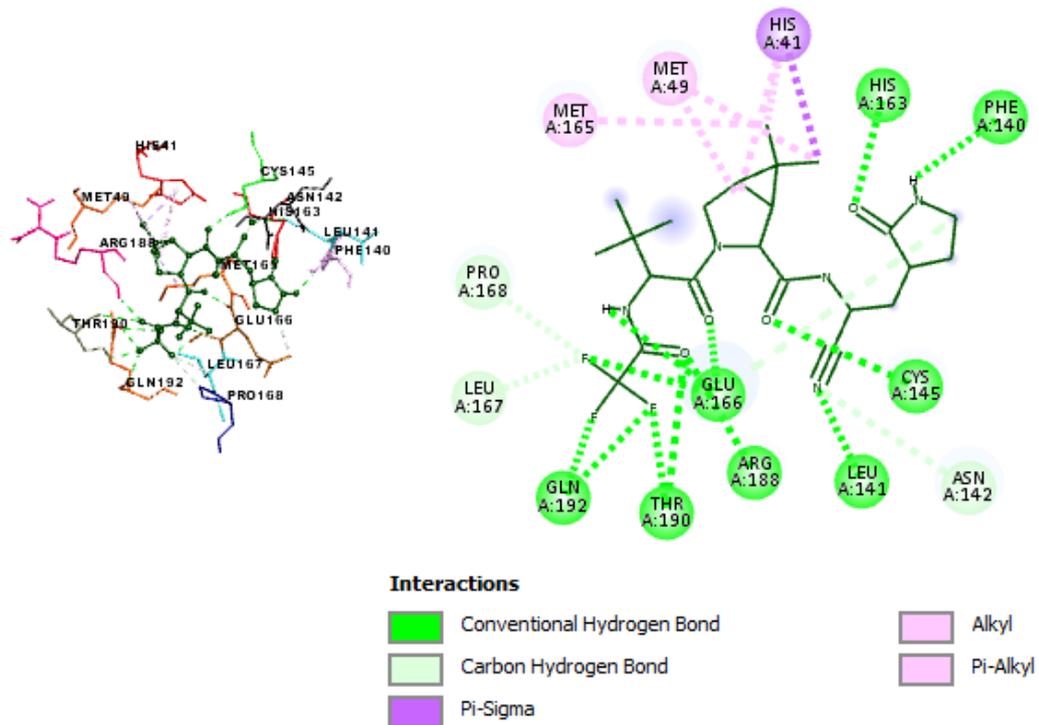
Tabela 1 – Resultados das energias de ligação e resíduos de interação nas etapas de docagem.

Ligante	Receptor	AutoDock 4.2			AutoDock Vina
		Energia de ligação (kcal/mol)	Interações		Energia de ligação* (kcal/mol)
			Resíduos	Lig. H	
Nirmatrelvir	M ^{pro}	-7,84	His41, Met49, Phe140, Leu141, Asn142, Cys145, His163, Met165, Glu166, Lis167, Pro168, Arg188, Thr190, Glu192	13	-7,60
Ritonavir	M ^{pro}	-5,93	Thr25, Thr26, His 41, Met49, Gly143, Cys145, His164, Met165, Gln189, Thr190	7	-6,57
Nirmatrelvir	M ^{pro} _Rit	-6,30	Phe140, Asn142, Pro168	5	-6,03
Ritonavir	M ^{pro} _Nir	-4,41	Thr118, Ser139, Leu141, Glu166, Thr169, Gly170 e nirmatrelvir	3	-5,37
Ritonavir	CYP3A4	-10,92	Phe57, Arg105, Ser119, Ile120, Glu122, Arg212, Phe215, Ile301, Ala305, Ala370, Met371, Arg372, Glu374, Leu482, Hem508	0	-11,13

* Valor médio de 3 replicatas

As interações com os resíduos His41, Met49, Phe140, Leu141, Cys145, His163, Met165, Glu166, Leu167, Phe168, Asn187, Arg188, Thr190 e Glu192 estão representadas na Figura 6, e são majoritariamente do tipo ligações de H. Observa-se ainda a formação de interações hidrofóbicas com os resíduos His41, Met49 e Met165. Yang e colegas, utilizando outras 5 estruturas distintas disponíveis no banco de dados PDB, indicam interações comuns à todas elas envolvendo as regiões proteicas entre os resíduos 40 a 44, 45 a 51, 140 a 146, 163 a 169 e 186 a 192 (YANG *et al.*, 2022), o que corrobora com os resultados obtidos nas simulações realizadas neste trabalho. Os mesmos autores, no entanto, citam o resíduo de His172 como crítico para a interação com o fragmento compreendido pela terceira ligação peptídica na cadeia principal, o que não se identificou no ensaio realizado.

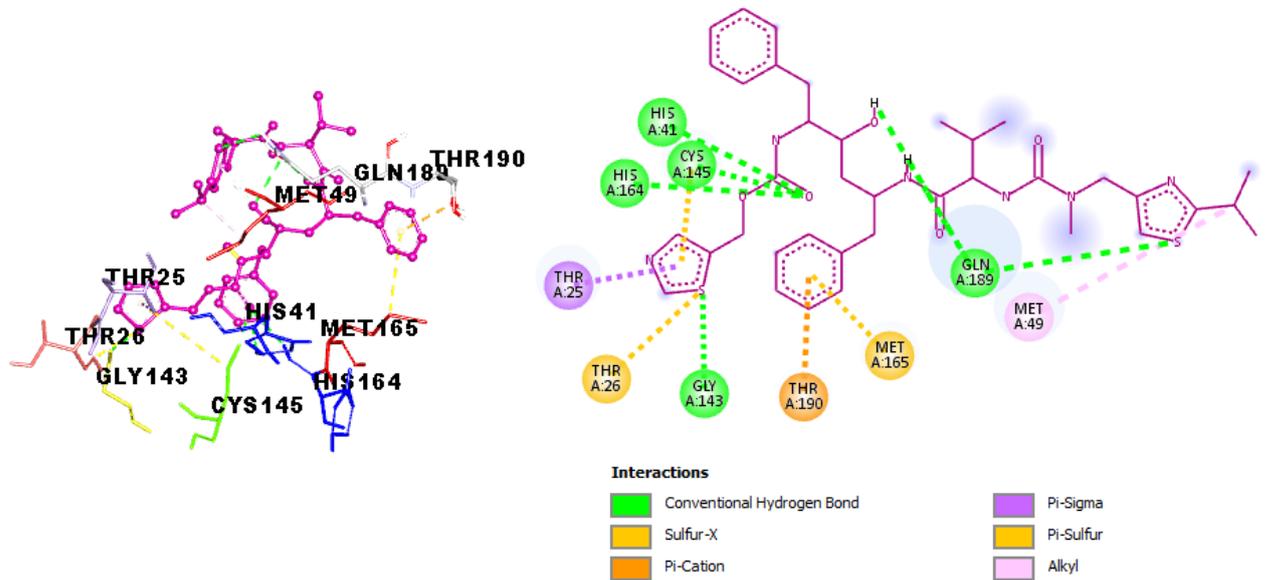
Fig. 6 – Resíduos de interação do receptor M^{PRO} com o ligante nirmatrelvir.



5.2 DOCAGEM DO LIGANTE RITONAVIR COM O RECEPTOR M^{PRO}

Embora o resultado médio obtido nas triplicatas para o ritonavir com utilizando o software AutoDock Vina tenha apresentado energia mais negativa em relação ao obtido com o AutoDock 4.2, as duas simulações apresentaram energias de ligação menos negativas em relação aos resultados obtidos com a docagem do ligante nirmatrelvir. Conforme observado na Tabela 1, o resultado médio obtido com o AutoDock Vina neste trabalho apresentou o valor de -6,57 kcal/mol, enquanto o resultado obtido com o AutoDock 4.2 foi de -5,43 kcal/mol. Dawood registrou uma energia de ligação de -6,9 kcal/mol utilizando a estrutura de código 6Y2E do PDB (DAWOOD, 2023). Os resíduos de aminoácidos que interagiram com o ritonavir estão listados na Tabela 1 e são ilustrados na Figura 7. Formaram-se 7 ligações de H, além de interações hidrofóbicas e eletrostáticas.

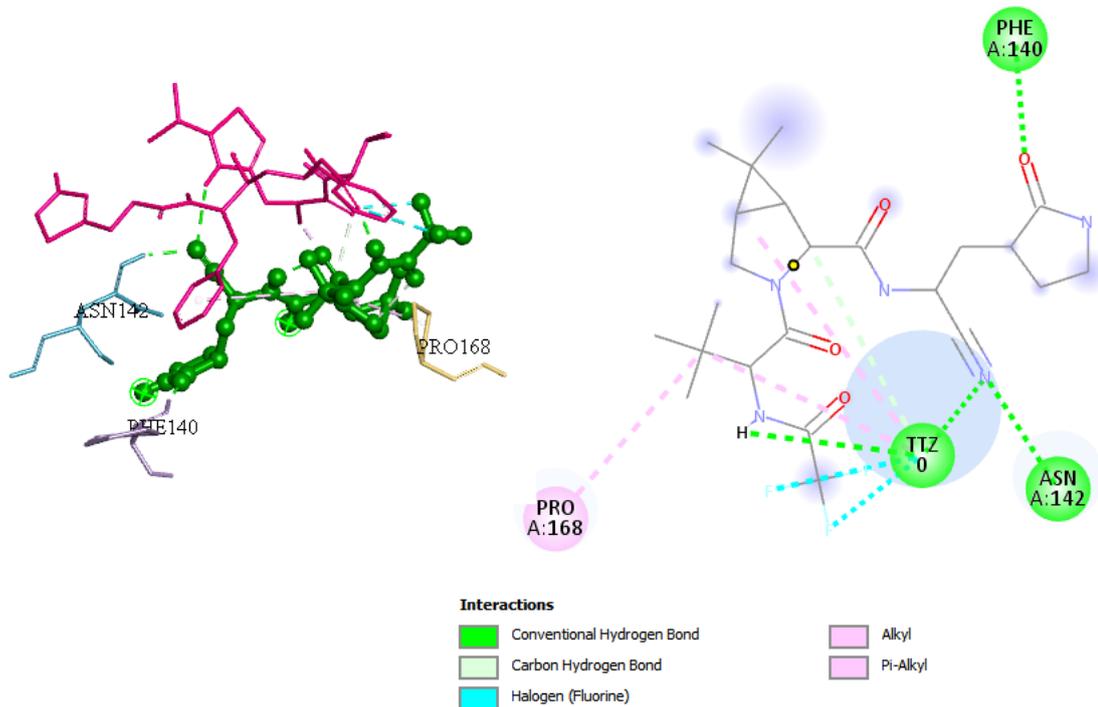
Fig. 7 - Resíduos de interação entre o ligante ritonavir e o receptor M^{PRO}.



5.3 DOCAGEM DO LIGANTE NIRMATRELVIR COM O COMPLEXO M^{PRO}/RITONAVIR

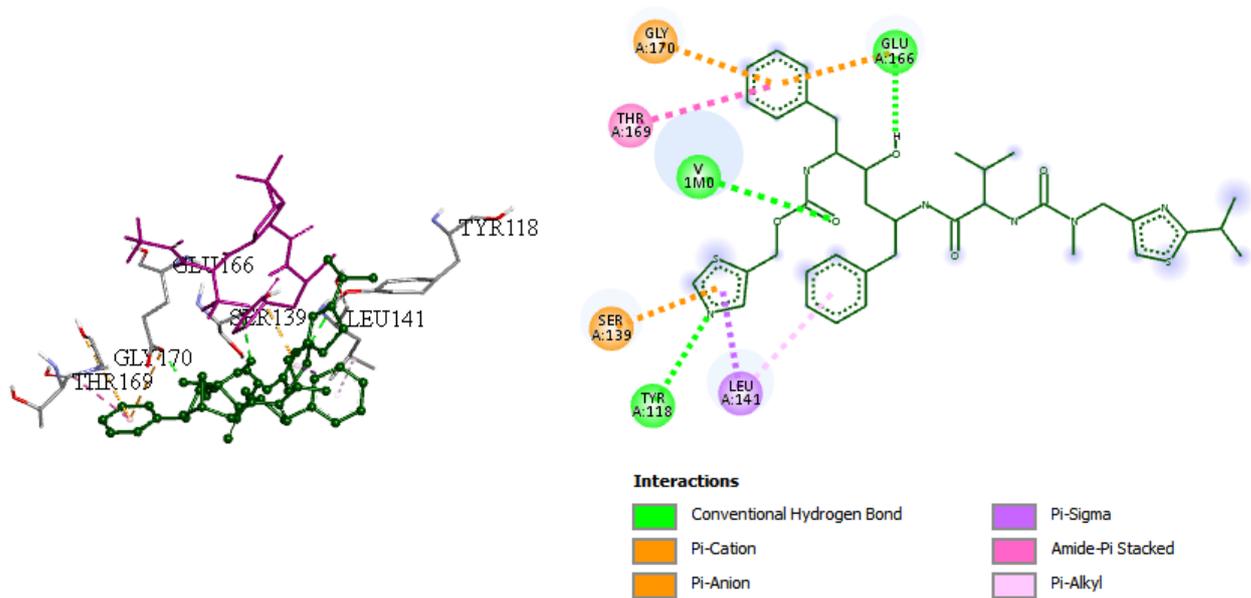
As simulações de docagem do ligante nirmatrelvir com o complexo formado pela proteína viral M^{PRO} e o componente ritonavir apresentaram um aumento na energia de ligação de aproximadamente 20%, tanto na simulação com o AutoDock 4.2 quanto no valor médio obtido com o AutoDock Vina, o que sugere a condição de interferência negativa do ritonavir na interação do nirmatrelvir com a proteína viral. A energia de ligação resultou em um valor mais positivo (-6,3 kcal/mol) quando comparada ao valor registrado quando da docagem com o receptor não complexado (-7,84 kcal/mol), e o número de ligações de H formadas reduziu de 13 para 5. Entre os resíduos que, na docagem com o receptor isolado, interagiram com o ligante, somente três (Phe140, Asn142 e Pro168) apresentaram interações, sendo elas de ligações de H, halogênio, C-H e hidrofóbicas, conforme observado na Figura 8.

Fig. 8 - Interações entre o ligante nirmatrelvir e o complexo M^{PRO}/ritonavir.



5.4 DOCAGEM DO LIGANTE RITONAVIR COM O COMPLEXO M^{PRO}/NIRMATRELVIR

A docagem entre o ligante ritonavir e o complexo M^{PRO}/nirmatrelvir apresentou energia de ligação de -4,41 kcal/mol (menos negativa em 26%) quando simulada com o AutoDock 4.2, enquanto na simulação com o AutoDock Vina a energia foi de -5,37 kcal/mol (acrésimo de 18%). O ligante ritonavir formou ligações de H com os resíduos Tyr118 e Glu166 e com a molécula de nirmatrelvir, interações eletrostáticas com os resíduos Ser139, Glu166 e Gly170 e interações hidrofóbicas com os resíduos Leu141 e Thr169, conforme mostra a Figura 9. Estes resultados mostram a interferência negativa do nirmatrelvir na ancoragem do ritonavir na proteína viral.

Fig. 9 – Interações entre o ligante ritonavir e o complexo M^{PRO}/nirmatrelvir.

5.5 DOCAGEM DO LIGANTE RITONAVIR COM O RECEPTOR CYP3A4

Como parte dos objetivos deste trabalho, foi realizada a simulação de docagem molecular do ligante ritonavir com a proteína humana CYP3A4, buscando relacionar sua condição de reforço na biodisponibilidade sanguínea do inibidor viral nirmatrelvir.

Do ponto de vista clínico, segundo Loos, Beijnen e Schinkel, a inibição de uma enzima da família CYP3A pode ser problemática, elevando subitamente a concentração de um agente xenobiótico e produzindo reações adversas. Por outro lado, a inibição pode também ser benéfica, já que alguns fármacos podem ser degradados muito rapidamente, impedindo que se atinja níveis de concentração plasmática terapeuticamente eficazes. Ainda, de acordo com Loos, Beijnen e Schinkel, o ritonavir foi originalmente desenvolvido como inibidor de protease do HIV e é frequentemente coadministrado clinicamente devido à sua eficácia na inibição da oxi-redutase CYP3A4 (LOOS; BEIJNEN; SCHINKEL, 2022).

Loos, Beijnen e Schinkel relacionam a perspectiva de uso do ritonavir como inibidor da enzima CYP3A4 aos estudos iniciais na inibição de protease do HIV, onde doses maiores apresentavam acentuados efeitos colaterais e o rápido desenvolvimento de resistência viral, com consequente redução de eficácia terapêutica. Sua eficácia como intensificador na biodisponibilidade de outro fármaco combinado foi identificada a partir dos teste no desenvolvimento de outro inibidor, o

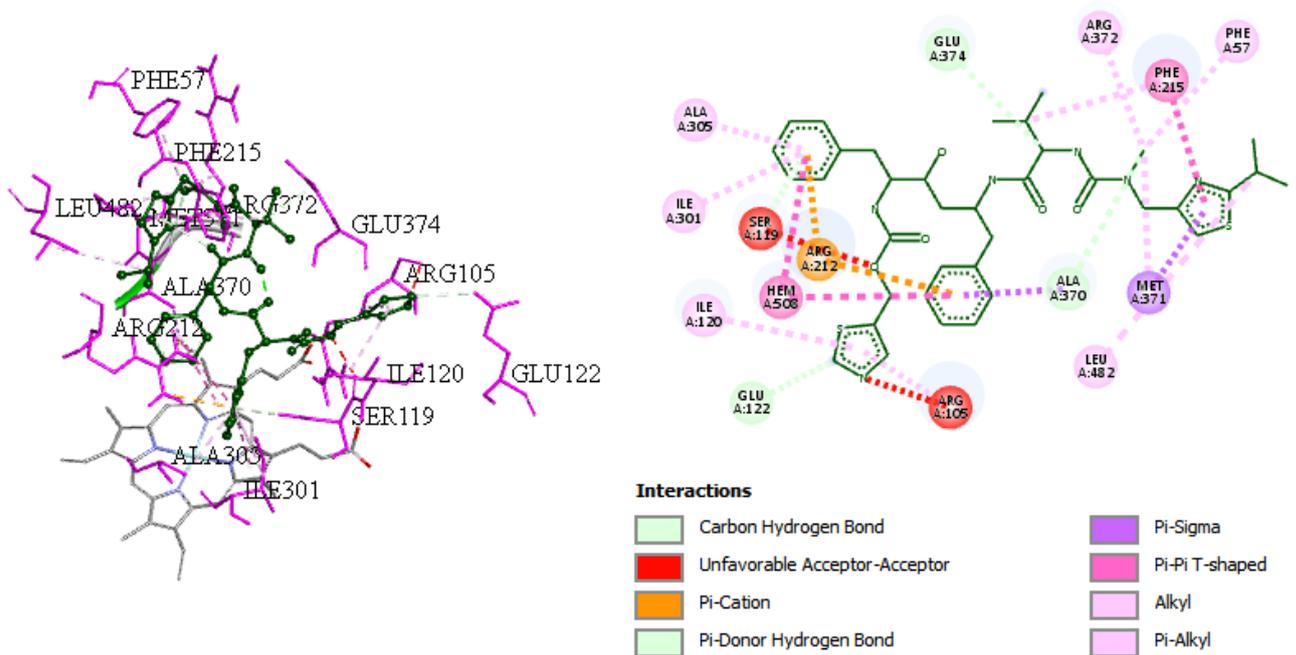
lopinavir (LOOS; BEIJNEN; SCHINKEL, 2022). Este mesmo princípio foi aplicado nos estudos de desenvolvimento do Paxlovid®.

Os resultados obtidos com as simulações pelo AutoDock 4.2 e pelo AutoDock Vina apresentaram energias de ligação mais negativas em relação às interações do ritonavir com o receptor M^{pro}, sendo -10,92 kcal/mol e -11,13 kcal/mol, respectivamente. A energia de ligação do ritonavir com a proteína M^{pro} calculada foi de -5,93 kcal/mol pelo AutoDock 4.2 e -6,57 kcal/mol pelo AutoDock Vina.

Os mecanismos de inibição da enzima CYP3A4 pelo ritonavir ainda não foram completamente elucidados e, de acordo com Loos, Beijnen e Schinkel, devido à possibilidade de metabólitos primários contribuírem também para a inibição desta enzima, uma combinação de quatro diferentes mecanismos contribuiriam para a inativação enzimática, podendo ser do tipo parcialmente irreversível, com tempo estimado de três dias e meio para que o paciente recupere sua condição metabólica em relação aos agentes xenobióticos (LOOS; BEIJNEN; SCHINKEL, 2022). A recomendação terapêutica indicada na bula do Paxlovid® limita o tempo de tratamento ao período máximo de 5 dias.

Conforme observado na Figura 10, o ligante apresentou interações do tipo hidrofóbicas com os resíduos Phe57, Ile120, Phe215, Ile301, Ala305, Met371, Arg372, Leu482 e com o grupo prostético Heme. Apresentou ainda interações eletrostáticas do tipo Pi-cátion com o resíduo Arg212, e ligações de hidrogênio com os resíduos Glu122, Ala370 e Glu374. Também foram observadas duas interações desfavoráveis com os resíduos Arg105 e Ser119.

Fig. 10 – Interações entre o ligante ritonavir e a proteína humana CYP3A4.



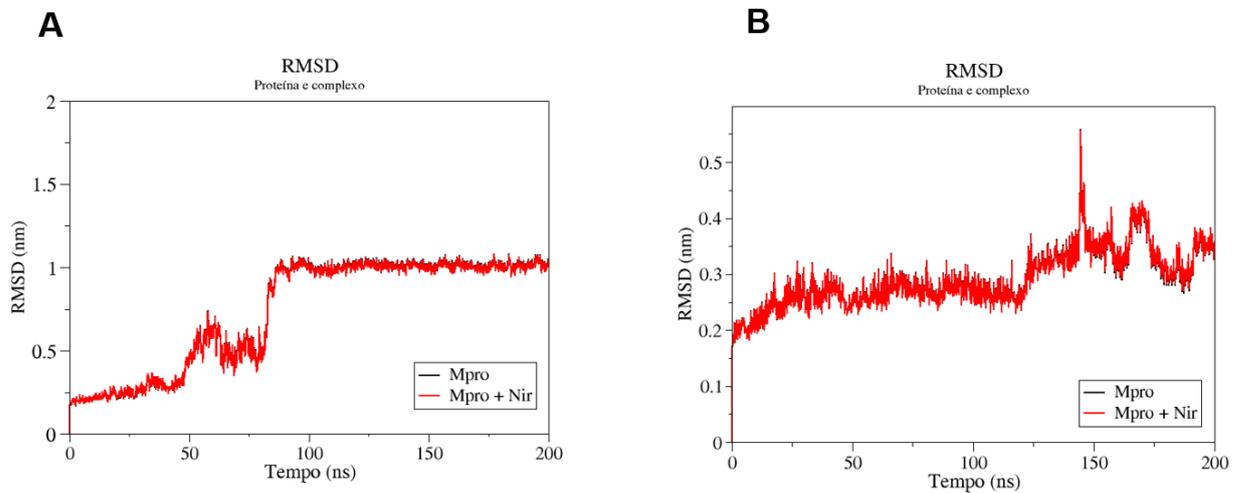
5.6 ANÁLISE DE DINÂMICA MOLECULAR DO COMPLEXO M^{PRO}/NIRMATRELVIR

O estudo da dinâmica molecular objetivou obter dados de estabilidade temporal na formação do complexo formado na docagem do componente nirmatrelvir com a proteína viral que apresentou a energia de ligação mais negativa, ou seja, de maior estabilidade. As simulações foram realizadas em duplicata. A duplicata foi gerada pela alteração de “seed” e da geração de velocidades nos primeiros 50 ns de cada simulação. Os arquivos gerados em cada etapa foram agrupados em um único arquivo, corrigindo a trajetória em relação à posição da proteína na caixa de simulação para avaliação do comportamento do sistema. As análises executadas foram de RMSD, de distância ligante/receptor, das ligações de hidrogênio formadas, de RMSF e da energia livre.

A simulação de trajetória do sistema M^{PRO} e nirmatrelvir apresentou, no gráfico de RMSD (Figura 11, A), grande variação nos primeiros 90 ns da primeira replicata, indicando grande mobilidade do complexo na caixa de solvatação. Identificou-se súbita elevação no RMSD a partir de 80 ns de simulação, com estabilização no

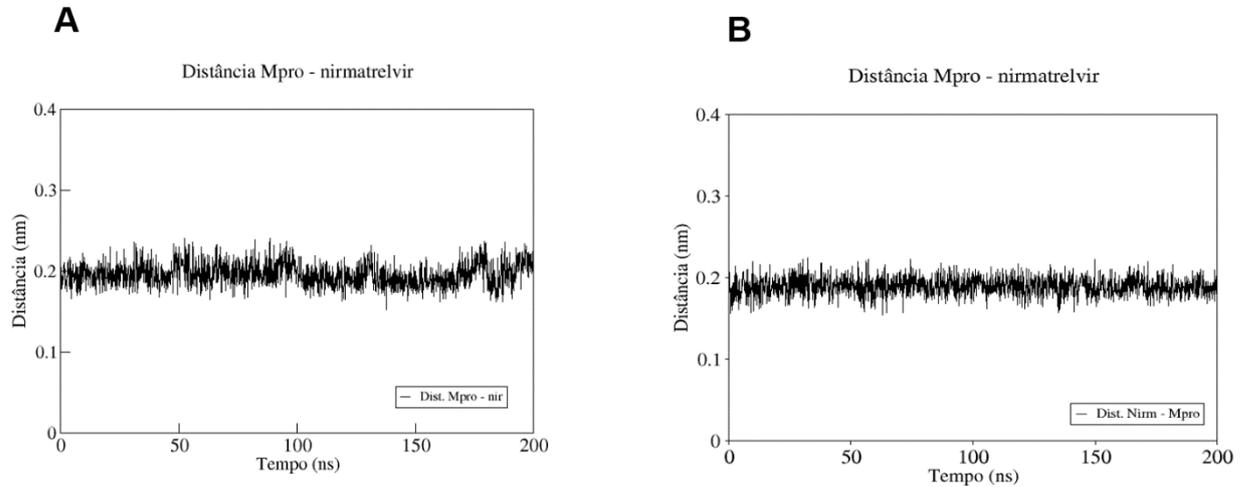
patamar aproximado de 1,1 nm. Esta oscilação é comum ao complexo e à proteína, indicando que está associada à flexibilidade de regiões que não interagem com o ligante, que permanece apresentando boa afinidade com o receptor até o final do período simulado. A segunda replicada (Figura 11, B) apresentou maior oscilação a partir dos 120 ns de simulação, porém, sem sinais de afastamento entre ligante e receptor, indicando que a flexibilidade do receptor não afetou a condição de ancoragem no período de simulação.

Fig. 11 – Gráficos do cálculo do RMSD para o sistema M^{pro} e nirmatrelvir. Em A, a primeira replicata e em B, a segunda.



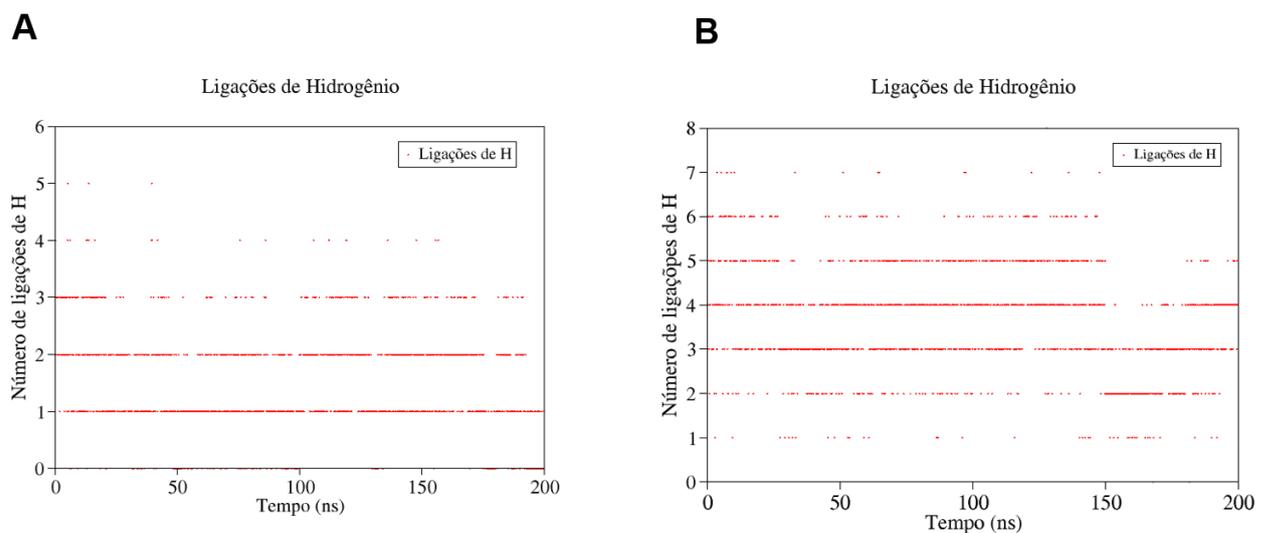
Os gráficos com os resultados das distâncias entre o ligante e receptor mostraram estabilidade durante todo o período de simulação, com pequena oscilação em torno do valor de 0,2 nm nas duas replicatas (Figura 12). Estes resultados indicam a manutenção das interações favoráveis no período simulado nas duas simulações realizadas.

Fig. 12 – Resultados gráficos do cálculo das distâncias entre o receptor M^{pro} e o ligante nirmatrelvir, sendo em A o resultado de primeira replicata e em B, o resultado da segunda replicata.



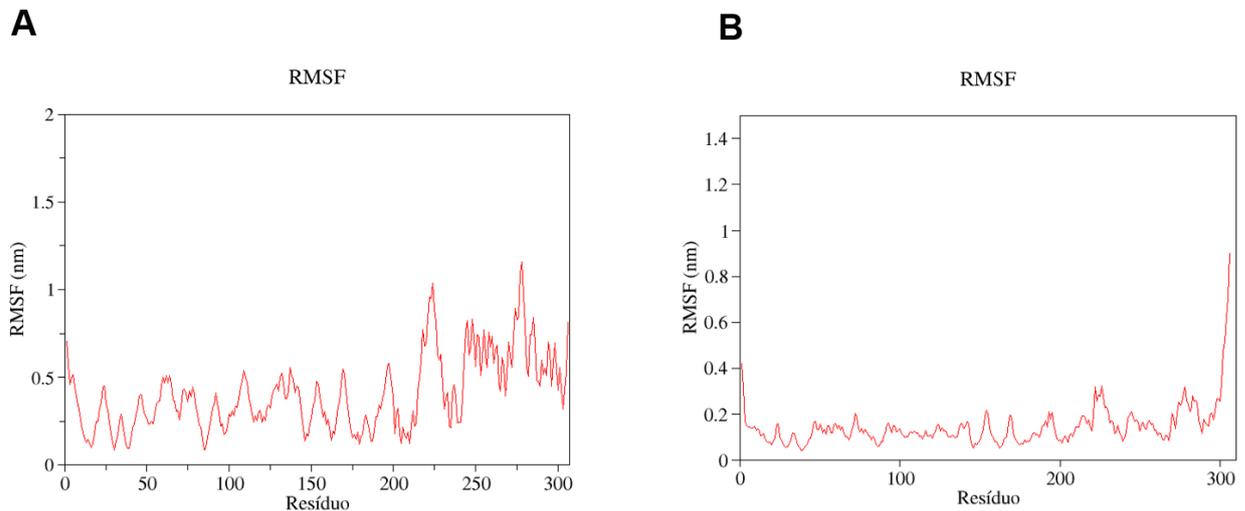
Na Figura 13, os gráficos resultantes do número de ligações de hidrogênio apresentam, na primeira replicata, a formação de 5 ligações, reduzindo para 2 ao longo da simulação, sendo o resíduo Glu166 o mais recorrente. Já para a segunda replicata, o número de ligações de hidrogênio formadas é 7, estabilizando entre 3 e 4 no período de simulação. Novamente, o resíduo Glu166 é o mais recorrente.

Fig. 13 – Representação gráfica do número de ligações de hidrogênio formadas durante o período de simulação, sendo a primeira replicata em A e a segunda, em B.



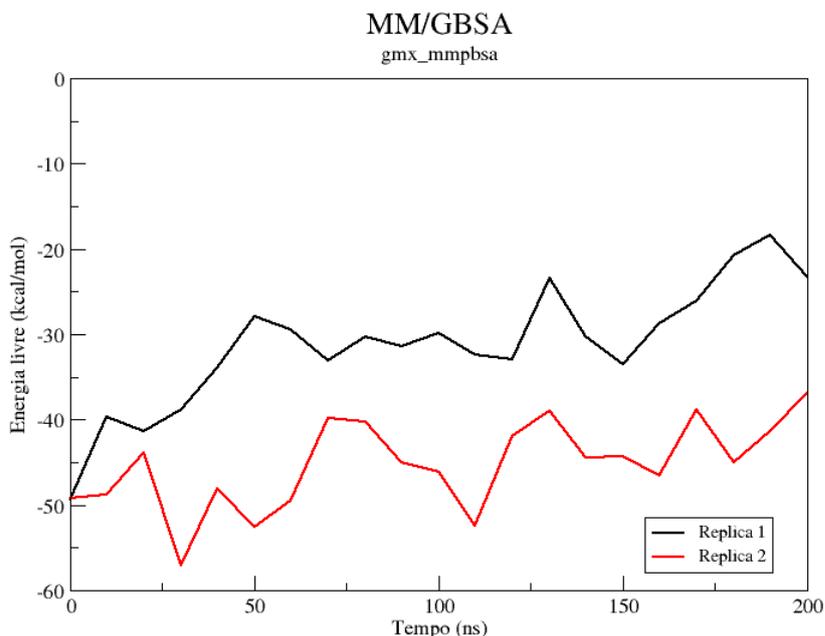
Os gráficos dos resultados de RMSF (raiz quadrada da flutuação quadrática média) foram gerados com base nos cálculos do desvio quadrático médio dos resíduos em relação ao esqueleto da cadeia, referenciado pelos átomos de C α . Observa-se no gráfico da primeira replicata (Figura 14, A) a maior variação a partir do resíduo Asn214 até a região C terminal no resíduo Gln306. Esta região compreende um conjunto de α -hélices, sugerindo uma mudança de conformação no período simulado. O RMSF da segunda replicata (Figura 14, B) não reproduz a mudança conformacional observada na primeira replicata sendo, porém, o desvio maior no resíduo C terminal (Gln306).

Fig. 14 – Gráficos de RMSF em relação ao esqueleto da cadeia sendo em A, a primeira replicata e em B, a segunda replicata.



Com os cálculos de energia livre é possível relacionar o ΔG com a constante de dissociação (K_d), estabelecendo-se assim um parâmetro de afinidade do ligante ao receptor. Os cálculos de energia livre podem apresentar pouca acurácia em relação aos dados experimentais e, em razão disso, devem ser analisados com alguma cautela. O gráfico da energia livre (Figura 15) apresenta os dados de ΔG para 20 estados termodinâmicos macroscópicos do complexo M^{Pro}/nirmatrelvir em cada uma das replicatas. Pode-se inferir, a partir do gráfico, oscilações na direção da redução dessa afinidade no período simulado, porém, ainda com energia de ligação favorável à ancoragem.

Fig. 15 – Reprodução gráfica dos resultados dos cálculos de ΔG em cada uma das replicadas da DM.



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram realizadas simulações de docagem molecular para os componentes do medicamento Paxlovid® considerando sua função clínica como inibidor na replicação do vírus SARS-CoV-2. Inicialmente, foi simulada a docagem de forma isolada de cada um dos ligantes, nirmatrelvir e ritonavir, com o receptor viral M^{pro} e, no segundo momento, utilizando-se cada um dos complexos formados na docagem individual. Os resultados ratificaram o que já se conhecia na literatura em seus aspectos de menor energia de ligação do nirmatrelvir em relação ao ritonavir. Dada a especificidade de cada um dos componentes, foi também conduzida uma simulação de docagem do antirretroviral ritonavir com o receptor CYP3A4, apresentando uma energia de ligação de -11,13 kcal/mol frente à uma energia de ligação com a proteína viral de -6,57 kcal/mol.

Especificamente em relação aos ensaios de docagem com o complexo formado com cada um dos ligantes, foi verificado que a ancoragem do ritonavir interfere de forma negativa na afinidade do nirmatrelvir com a proteína viral. Ressalva-se, no entanto, que o resultado de energia de ligação obtido na docagem do ritonavir com a proteína humana CYP3A4 corrobora com os estudos anteriores conduzidos no

desenvolvimento do Paxlovid® no que diz respeito a sua função de potencializar a biodisponibilidade sanguínea do nirmatrelvir.

Para complementar a análise foi executado também simulação de dinâmica molecular em duplicata utilizando-se a estrutura energética mais favorável entre o ligante nirmatrelvir e o receptor M^{pro}. Os resultados revelaram a condição de interação efetiva do ligante no complexo formado no período de simulação, condição compatível com nossas expectativas dado o fato de que o Paxlovid® já está em uso clínico.

No futuro, novos ensaios “in sílico” capazes de abranger diferentes conformações do receptor podem trazer mais detalhes, aprofundando nossas conclusões no que concerne à ação conjunta dos componentes do Paxlovid® como recurso clínico contra a infecção por Covid-19.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. *et al.* GROMACS 2023.2 Manual. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://zenodo.org/record/8134388>. Acesso em: 23 jul. 2023.
- AHMAD, B. *et al.* Exploring the Binding Mechanism of PF-07321332 SARS-CoV-2 Protease Inhibitor through Molecular Dynamics and Binding Free Energy Simulations. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 17, p. 9124, 2021.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 673–683, 2004.
- BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER. **BIOVIA Dassault Systèmes**. San Diego, 2023.
- BROOKS, B. R. *et al.* CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 187–217, 1983.
- DAI, W. *et al.* Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. **Science**, [s. l.], v. 368, n. 6497, p. 1331–1335, 2020.
- DAWOOD, A. A. The efficacy of Paxlovid against COVID-19 is the result of the tight molecular docking between Mpro and antiviral drugs (nirmatrelvir and ritonavir). **Advances in Medical Sciences**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 1–9, 2023.
- DEHELEAN, C. A. *et al.* SARS-CoV-2: Repurposed Drugs and Novel Therapeutic Approaches—Insights into Chemical Structure—Biological Activity and Toxicological Screening. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 2084, 2020.
- FOCOSI, D. *et al.* Nirmatrelvir and COVID-19: development, pharmacokinetics, clinical efficacy, resistance, relapse, and pharmacoeconomics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 106708, 2023.
- GARG, S. *et al.* Molecular docking analysis of selected phytochemicals against SARS-CoV-2 Mpro receptor. **Vegetos**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 766–781, 2020.
- GHASEMLOU, A.; USKOKOVIĆ, V.; SEFIDBAKHT, Y. Exploration of potential inhibitors for SARS-CoV-2 Mpro considering its mutants via structure-based drug design, molecular docking, MD simulations, MM/PBSA, and DFT calculations. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], n. April, p. 1–19, 2022.

- GORBALENYA, A. E. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020.
- HALL-SWAN, S. *et al.* DINC-COVID: A webserver for ensemble docking with flexible SARS-CoV-2 proteins. **Computers in Biology and Medicine**, [s. l.], v. 139, p. 104943, 2021.
- HEGYI, A.; ZIEBUHR, J. Conservation of substrate specificities among coronavirus main proteases. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 595–599, 2002.
- HULL, M. W.; MONTANER, J. S. G. Ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV therapy. **Annals of Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 375–388, 2011.
- ISTIFLI, E. S. *et al.* Understanding the molecular interaction of SARS-CoV-2 spike mutants with ACE2 (angiotensin converting enzyme 2). **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–12, 2021.
- JIN, Z. *et al.* Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, [s. l.], v. 582, n. 7811, p. 289–293, 2020.
- JO, S. *et al.* CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 1859–1865, 2008.
- KHAERUNNISA, S. *et al.* Potential Inhibitor of COVID-19 Main Protease (M pro) from Several Medicinal Plant Compounds by Molecular Docking Study. **Preprints**, [s. l.], n. March, p. 1–14, 2020.
- LI, J. *et al.* Structural Basis of the Main Proteases of Coronavirus Bound to Drug Candidate PF-07321332. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 96, n. 8, 2022.
- LOOS, N. H. C.; BEIJNEN, J. H.; SCHINKEL, A. H. The Mechanism-Based Inactivation of CYP3A4 by Ritonavir: What Mechanism?. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 17, 2022.
- MALDE, A. K. *et al.* An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 4026–4037, 2011.
- MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. **Current Drug Targets**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2018. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/149505/article>. Acesso em: 23 jun. 2023.
- MASTERS, P. S. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Em*: **ADVANCES IN VIRUS RESEARCH**. [S. l.]: Elsevier, 2006. v. 66, p. 193–292. *E-book*. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352706660053>. Acesso em: 9 maio 2023.

MORGON, NELSON H.; COUTINHO, KALINE. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. 1. ed. São Paulo: [s. n.], 2007. v. 1

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

OWEN, D. R. *et al.* An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. **Science**, [s. l.], v. 374, n. 6575, p. 1586–1593, 2021.

RIDHWAN, M. J. M. *et al.* A Comprehensive Analysis of Human CYP3A4 Crystal Structures as a Potential Tool for Molecular Docking-Based Site of Metabolism and Enzyme Inhibition Studies. **Journal of Computational Biophysics and Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 259–285, 2022.

RIOU, J.; ALTHAUS, C. L. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 1–5, 2020.

SOULÈRE, L.; BARBIER, T.; QUENEAU, Y. Docking-based virtual screening studies aiming at the covalent inhibition of SARS-CoV-2 MPro by targeting the cysteine 145. **Computational Biology and Chemistry**, [s. l.], v. 92, n. February, p. 1–8, 2021.

STURMAN, L. S.; HOLMES, K. V. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Em*: LAUFFER, M. A.; MARAMOROSCH, K. (org.). **Advances in Virus Research**. [S. l.]: Academic Press, 1983. v. 28, p. 35–112. *E-book*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352708607216>.

TORRES, P. H. M. *et al.* Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], p. NA-NA, 2009.

WONG, N. A.; SAIER, M. H. The SARS-Coronavirus Infection Cycle: A Survey of Viral Membrane Proteins, Their Functional Interactions and Pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 1308, 2021.

YANG, H. *et al.* Design of Wide-Spectrum Inhibitors Targeting Coronavirus Main Proteases. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 3, n. 10, p. e324, 2005.

YANG, K. S. *et al.* Evolutionary and Structural Insights about Potential SARS-CoV-2 Evasion of Nirmatrelvir. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], 2022.

YANO, J. K. *et al.* The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 37, p. 38091–38094, 2004.

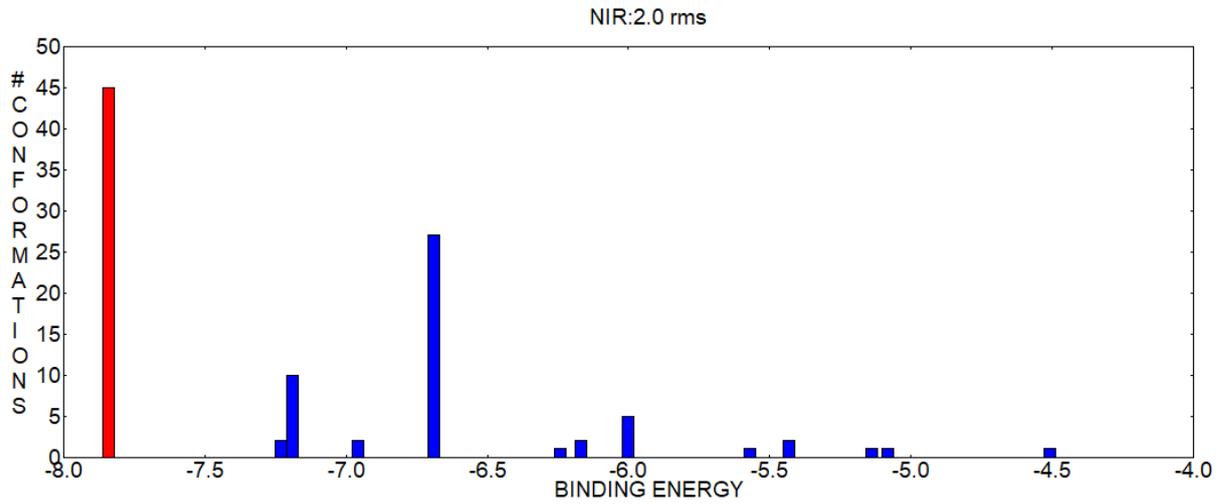
ZHANG, L. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. **Science**, [s. l.], v. 368, n. 6489, p. 409–412, 2020.

ZHAO, Z. *et al.* New Insights from Chemical Biology: Molecular Basis of Transmission, Diagnosis, and Therapy of SARS-CoV-2. **CCS Chemistry**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1501–1528, 2021.

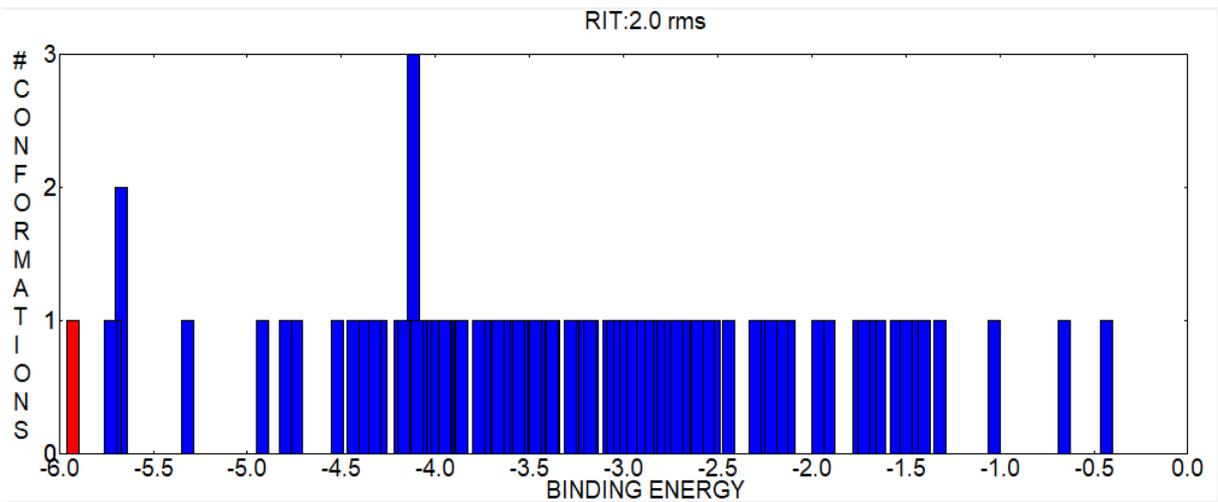
ZHAO, Y. *et al.* Structural basis for replicase polyprotein cleavage and substrate specificity of main protease from SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 119, n. 16, p. e2117142119, 2022.

APÊNDICE A — HISTOGRAMAS DE SIMULAÇÕES COM O AUTODOCK 4.2

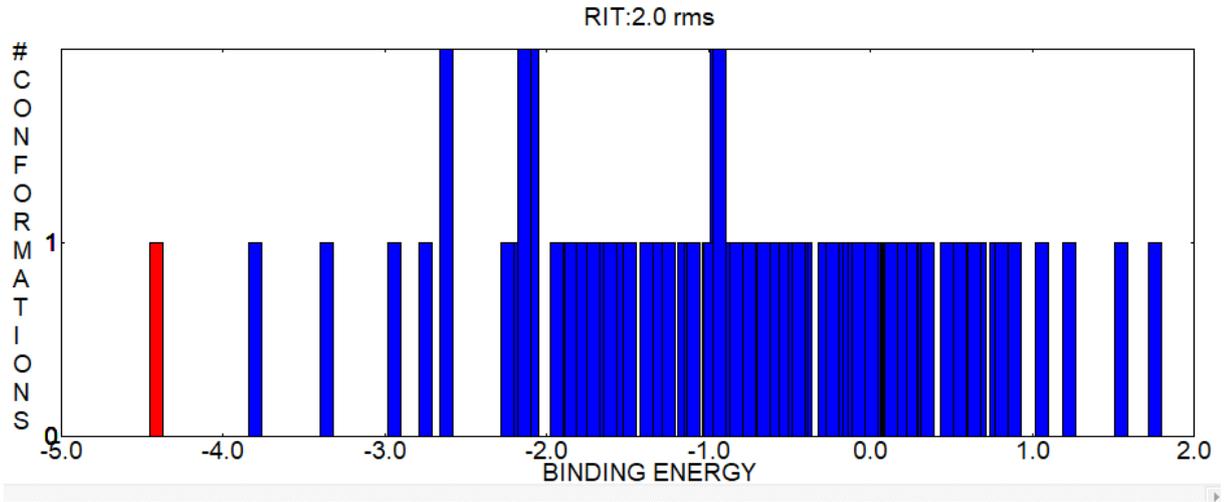
1) Histograma da simulação entre o receptor M^{pro} e o ligante nirmatrelvir.



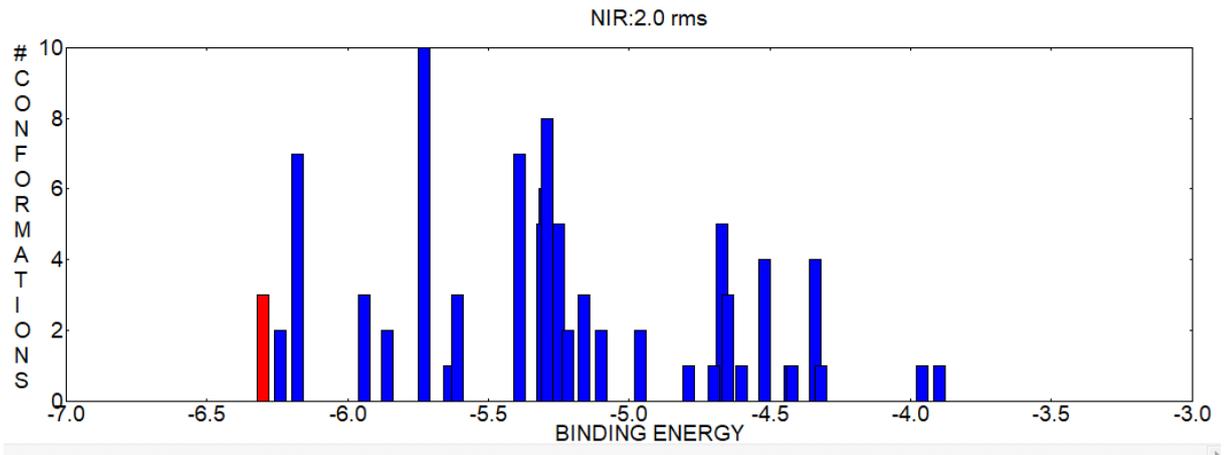
2) Histograma da simulação entre o receptor M^{pro} e o ligante ritonavir.



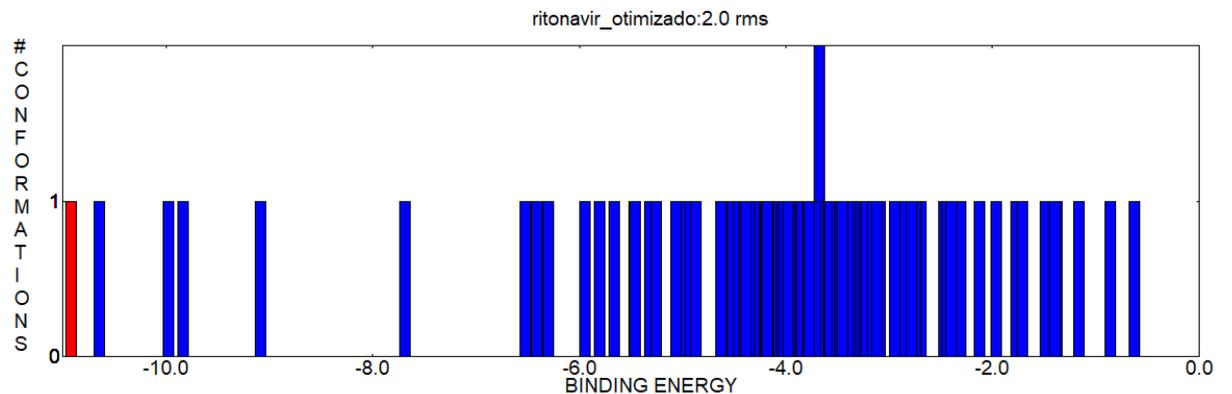
3) Histograma da simulação entre o complexo M^{pro}/NIR e o ligante ritonavir.



4) Histograma da simulação entre o complexo M^{pro}/RIT e o ligante nirmatrelvir.



5) Histograma da simulação entre o receptor CYP3A4 e o ligante ritonavir.



APÊNDICE B – RELATÓRIOS DAS SIMULAÇÕES COM O AUTODOCK VINA

- 1) Relatórios 1, 2 e 3 das simulações de docagem entre o ligante nirmatrelvir e o receptor M^{pro} conduzidas pelo programa AutoDock Vina.

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-7.5	0.000	0.000
2	-6.8	1.788	2.496
3	-6.7	1.210	1.580
4	-6.6	1.340	1.751
5	-6.5	4.413	8.040
6	-6.5	3.721	8.184
7	-6.4	3.645	6.661
8	-6.3	3.462	7.451
9	-6.3	4.107	8.058

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-7.7	0.000	0.000
2	-7.7	1.130	1.311
3	-7.1	1.645	2.633
4	-6.8	4.240	8.017
5	-6.6	3.939	8.093
6	-6.5	2.773	5.149
7	-6.4	2.059	3.103
8	-6.3	2.198	4.884
9	-6.1	4.226	7.203

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-7.6	0.000	0.000
2	-7.1	1.444	2.148
3	-6.7	1.594	2.125
4	-6.7	3.808	8.130
5	-6.4	2.711	5.299
6	-6.3	3.719	6.597
7	-6.3	4.407	7.546
8	-6.2	2.108	5.469
9	-6.2	2.545	5.778

2) Relatórios 1, 2 e 3 das simulações de docagem entre o ligante ritonavir e o receptor M^{pro} conduzidas pelo programa AutoDock Vina.

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-6.3	0.000	0.000
2	-6.0	3.420	7.481
3	-6.0	2.968	6.127
4	-5.8	1.849	3.265
5	-5.7	4.386	8.626
6	-5.7	2.407	5.146
7	-5.6	2.162	4.386
8	-5.6	2.307	3.274
9	-5.6	2.140	4.006

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-6.3	0.000	0.000
2	-5.9	2.806	6.397
3	-5.9	3.870	7.933
4	-5.8	3.760	7.615
5	-5.7	3.640	7.227
6	-5.7	3.066	6.760
7	-5.7	3.006	7.684
8	-5.6	4.849	8.152
9	-5.6	2.909	6.298

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-7.1	0.000	0.000
2	-6.8	2.470	4.695
3	-6.7	2.268	3.411
4	-6.7	2.833	5.566
5	-6.7	2.799	6.259
6	-6.6	2.341	4.391
7	-6.6	3.333	8.726
8	-6.6	3.036	6.795
9	-6.6	2.922	8.233

- 3) Relatórios 1, 2 e 3 das simulações de docagem entre o ligante nirmatrelvir e o complexo M^{pro}/ritonavir conduzidas pelo programa AutoDock Vina.

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-6.1	0.000	0.000
2	-5.8	3.746	5.701
3	-5.8	2.464	4.993
4	-5.8	1.828	3.033
5	-5.5	4.378	6.032
6	-5.4	4.653	6.303
7	-5.4	5.100	6.823
8	-5.4	20.389	22.941
9	-5.3	15.174	17.804

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-6.0	0.000	0.000
2	-5.9	2.610	4.957
3	-5.9	3.717	5.677
4	-5.8	18.842	22.228
5	-5.7	1.721	2.429
6	-5.7	4.541	6.283
7	-5.5	2.916	5.595
8	-5.5	20.605	23.184
9	-5.4	2.368	3.673

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-6.0	0.000	0.000
2	-5.8	2.476	5.004
3	-5.8	4.718	6.527
4	-5.7	2.276	3.506
5	-5.6	5.309	8.708
6	-5.5	4.590	6.263
7	-5.4	2.055	3.155
8	-5.4	20.410	23.021
9	-5.4	4.030	5.954

- 4) Relatórios 1, 2 e 3 das simulações de docagem entre o ligante ritonavir e o complexo M^{pro}/nirmatrelvir conduzidas pelo programa AutoDock Vina.

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-5.4	0.000	0.000
2	-5.3	3.304	10.379
3	-5.1	6.580	10.804
4	-5.0	3.520	9.788
5	-5.0	2.530	5.520
6	-5.0	2.008	4.913
7	-5.0	2.137	4.771
8	-5.0	2.801	11.013
9	-4.9	3.615	10.322

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-5.5	0.000	0.000
2	-5.4	3.446	8.538
3	-5.2	2.802	8.745
4	-5.1	3.490	6.151
5	-5.0	3.298	9.556
6	-5.0	2.220	3.890
7	-5.0	3.712	6.554
8	-4.9	2.336	3.366
9	-4.9	2.727	9.019

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-5.2	0.000	0.000
2	-5.1	1.742	2.857
3	-5.1	3.706	10.174
4	-5.0	2.111	3.062
5	-4.9	1.514	2.058
6	-4.9	2.842	10.902
7	-4.8	7.199	12.634
8	-4.7	2.677	3.477
9	-4.6	7.896	13.452

- 5) Relatórios 1, 2 e 3 das simulações de docagem entre o ligante ritonavir e o receptor CYP3A4 conduzidas pelo programa AutoDock Vina.

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-10.8	0.000	0.000
2	-10.8	2.471	6.263
3	-10.8	2.468	9.245
4	-10.8	2.418	6.260
5	-10.1	2.004	4.616
6	-9.7	2.654	9.145
7	-9.7	2.777	8.656
8	-9.7	2.452	8.700
9	-9.6	3.002	6.457

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-11.5	0.000	0.000
2	-11.0	2.597	9.422
3	-10.3	2.385	8.167
4	-10.3	2.546	8.064
5	-10.2	2.480	8.752
6	-9.9	2.684	8.938
7	-9.8	1.400	2.087
8	-9.4	2.368	9.157
9	-9.3	3.711	9.022

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-11.1	0.000	0.000
2	-10.7	2.331	6.332
3	-10.6	2.905	7.006
4	-10.6	3.137	7.279
5	-10.0	2.864	9.256
6	-9.8	2.789	7.816
7	-9.8	2.808	7.573
8	-9.8	2.550	4.186
9	-9.6	2.926	9.641