

**Universidade do Grande Rio “Prof. Jose de Souza Herdy”
UNIGRANRIO**

LORENNA MOREIRA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL (M_{pro})
DO SARS-CoV-2 SELECIONADOS POR INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL**

DUQUE DE CAXIAS

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. Jose de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

LORENNNA MOREIRA SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Rafael Ferreira Dantas

DUQUE DE CAXIAS

2025

CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL (Mpro) DO SARS-CoV-2 SELECIONADOS POR INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Rafael Ferreira Dantas

Aprovado em: Duque de Caxias, 23 de junho de
2025

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rafael Ferreira Dantas (Orientador)

 Documento assinado digitalmente
CRISTIANE MARTINS CARDOSO DE SALLES
Data: 27/06/2025 17:24:06-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dra. Cristiane Martins Cardoso de Salles



Prof. Dra. Natália de Moraes Cordeiro

Duque de Caxias - RJ 2025

AGRADECIMENTOS

Neste momento de conclusão, gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para a realização deste trabalho e que, de alguma forma, me ajudaram a alcançar a minha formação.

Primeiramente, agradeço a minha família. Sem o apoio e incentivo de vocês, nada disso seria possível. Agradeço a minha irmã Lorayne, que sempre se disponibilizou a me auxiliar em cada etapa da graduação, me tranquilizando e estendendo sua mão para me ajudar sempre que precisei. Também agradeço aos meus pais, Paulo Roberto e Karina Kelly, que correram para que hoje eu pudesse caminhar tranquilamente.

Agradeço também ao meu orientador, Dr. Rafael Ferreira Dantas, que, durante todo esse processo, me ensinou muito além da ciência. Sua dedicação e amizade me inspiram diariamente a ser uma profissional melhor. Agradeço por não apenas me orientar, mas por caminhar ao meu lado em cada etapa do projeto.

Sou grata também ao Dr. Luiz Saramago por todo conhecimento e aprendizado que, hoje, me tornam mais apta para exercer aquilo que escolhi para seguir profissionalmente.

Aos meus amigos do LaBECFar, agradeço por nunca me deixarem sozinha. Sempre estiveram dispostos a ajudar, tornando essa caminhada mais leve e colaborativa. Sou grata por toda troca e conhecimento adquirido.

Sou imensamente grata a todos os amigos que a vida se encarregou de colocar no meu caminho, sem dúvidas cada um deles faz parte da minha história e me incentivam diariamente.

Meus agradecimentos se estendem ainda aos órgãos de fomento PIBIC e CNPq, cujo apoio financeiro foi fundamental para a execução das atividades propostas e para o êxito deste trabalho.

Por fim, agradeço aos professores da Unigranrio, que contribuíram com seus conhecimentos e orientações ao longo dessa jornada. Seus ensinamentos foram essenciais para minha formação acadêmica e para o desenvolvimento das habilidades que levo comigo como pesquisadora.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do vírus SARS-CoV-2	9
Figura 2: Estrutura tridimensional da protease principal do SARS-CoV-2	11
Figura 3: Mecanismo da reação de hidrólise catalisada pela Mpro	12
Figura 4: Inibidores de Mpro usados na clínica para o tratamento de COVID-19.....	13
Figura 5: Estrutura tridimensional da Mpro de SARS-CoV-2 ligada ao composto nirmatrelvir	14
Figura 6: Principais tipos de mecanismos de inibição de compostos ativos sobre a Mpro de SARS-CoV-2	17
Figura 7: Estrutura molecular do composto MolPort-000-145-183.....	18
Figura 8: Fluxo de trabalho para a obtenção da proteína Mpro de SARS-CoV-2.....	19
Figura 9: Mapa do plasmídeo pGEX-4T-1 contendo o gene de Mpro de SARS-CoV-2.....	21
Figura 10: Ensaio FRET para avaliar a atividade de Mpro com o substrato fluorogênico MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH2	23
Figura 11: Representação dos tipos de curvas de progressão da reação para cada perfil de inibição obtidos após o teste de reversibilidade	24
Figura 12: Cromatograma gerado após cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados com a Mpro selvagem.....	26
Figura 13: Eletroforese em gel (SDS-PAGE) das frações 68-79 coletadas após cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados com a Mpro selvagem	27
Figura 14: Cromatograma indicando a eluição da Mpro selvagem por cromatografia de afinidade reversa	28
Figura 15: Eletroforese em Gel (SDS-PAGE) da cromatografia de afinidade reversa.....	28
Figura 16: Teste de reversibilidade com o composto 183.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 A pandemia da COVID-19 e o desenvolvimento de fármacos	8
1.2 O vírus SARS-CoV-2	9
1.3 Protease principal do SARS-CoV-2.....	10
1.4 A protease principal como alvo terapêutico contra a COVID-19.....	12
1.5 Abordagens experimentais e computacionais para a descoberta de novos inibidores da Mpro	15
1.6 Classificação dos inibidores de Mpro	16
2 MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 Compostos químicos	19
2.2 Expressão e purificação da Mpro.....	19
2.2.1 Construção do plasmídeo recombinante contendo os genes de Mpro selvagem e mutantes (H172Y, Q192V e E166N)	19
2.2.2 Transformação bacteriana com o plasmídeo contendo o gene da Mpro (selvagem e mutante).....	21
2.2.3 Expressão da Mpro.....	21
2.2.4 Purificação da Mpro.....	22
2.3 Ensaio da atividade enzimática de Mpro.....	22
2.4 Teste de reversibilidade	23
3 RESULTADOS.....	25
3.1 Produção de Mpro recombinante de SARS-CoV-2.....	25
3.1.1 Expressão da proteína e purificação.....	25
3.2 Ensaios enzimáticos com o inibidor 183 de Mpro predito por IA: teste de reversibilidade	29
4 DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO	33

CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL (Mpro) DO SARS-CoV-2 SELECIONADOS POR INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Lorena Moreira Santos¹

Rafael Ferreira Dantas²

RESUMO

A COVID-19, causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda severa 2 (SARS-CoV-2), é responsável por milhões de mortes no mundo. Um dos fármacos usados no tratamento dessa doença é o Paxlovid (nirmatrelvir + ritonavir), que apresenta como alvo molecular a protease principal (Mpro), uma enzima essencial para o ciclo de vida do vírus. Contudo, a ocorrência de variantes mutantes de Mpro menos sensíveis ao nirmatrelvir e o possível aparecimento de novas mutações justificam a busca por novos inibidores dessa enzima. Anteriormente nosso grupo identificou, a partir modelos de inteligência artificial generativos, fragmentos moleculares inibidores de Mpro. Neste trabalho, iniciou-se a caracterização da atividade inibitória de um desses fragmentos, o composto 183. Para isso, foram expressas as formas recombinantes selvagem e mutantes (E166N, Q192V e H172Y) de Mpro de SARS-CoV-2 na cepa Rosetta 2 (DE3) de *Escherichia coli*. Em seguida, a versão selvagem da enzima foi purificada através da técnica de cromatografia de afinidade, apresentando peso molecular e atividade catalítica compatíveis com a Mpro viral. Com a enzima pura, foi realizado um teste de reversibilidade com o composto 183, permitindo determinar seu perfil de inibição como irreversível, o que está de acordo com dados cristalográficos obtidos pelo nosso grupo. O próximo passo deste trabalho é finalizar o processo de purificação das mutantes, além de determinar parâmetros cinéticos de inibição, como K_i e k_{inact} , para melhor caracterizar a interação entre a Mpro e o composto 183.

Palavras-chave: COVID-19. SARS-CoV-2. Mpro. Inibidores. Fragmentos moleculares.

ABSTRACT

COVID-19, caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), is responsible for millions of deaths worldwide. One of the drugs used to treat this disease is Paxlovid (nirmatrelvir + ritonavir), which targets the main protease (Mpro), an essential enzyme in the viral life cycle. However, the emergence of Mpro mutant variants that are less sensitive to nirmatrelvir and the potential appearance of new mutations justify the search for novel inhibitors of this enzyme. Previously, our group identified Mpro-inhibiting molecular fragments using generative artificial intelligence models. In this study, we initiated the characterization of the inhibitory activity of one of these fragments, compound 183. For this purpose, the wild-type and mutant forms (E166N, Q192V, and H172Y) of SARS-CoV-2 Mpro were expressed in *Escherichia coli* strain Rosetta 2 (DE3). The wild-type enzyme was then purified by affinity chromatography, exhibiting a molecular weight and catalytic activity consistent with viral Mpro. Using the purified enzyme, a reversibility assay with compound 183 was performed, revealing an irreversible inhibition profile, in agreement with crystallographic data obtained by our group. The next step of this work involves completing the purification of the mutant enzymes and determining kinetic inhibition parameters, such as K_i and k_{inact} , to better characterize the interaction between Mpro and compound 183.

Keywords: COVID-19. SARS-CoV-2. Mpro. Inhibitors. Molecular fragments.

¹ Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

² Biomedico (UNIRIO), mestre e doutor em biociências (UERJ).

1 INTRODUÇÃO

1.1 A pandemia da COVID-19 e o desenvolvimento de fármacos

A COVID-19 é uma doença infectocontagiosa causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda severa 2 (SARS-CoV-2), cuja transmissão ocorre entre pessoas através de gotículas orais ou nasais contendo o vírus (OMS, 2021). A COVID-19 foi inicialmente detectada na cidade de Wuhan (República Popular da China) no final de 2019, se espalhando rapidamente pelo mundo, até alcançar o status de pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março de 2020 (Cucinotta e Vanelli, 2020).

A maioria dos pacientes com COVID-19 é assintomática ou apresenta uma forma leve da doença, com sintomas como febre e tosse seca. Contudo, a doença pode ser mais grave em indivíduos acima de 60 anos ou que apresentam alguma comorbidade, levando a sintomas como dispneia e síndrome do desconforto respiratório agudo, podendo demandar internação hospitalar ou, em casos extremos, levar a morte (Carabelli *et al.*, 2023; Hu *et al.*, 2021; Long *et al.*, 2022). De acordo com a OMS (11 de maio de 2025), foram notificados 777.825.189 milhões de casos confirmados de COVID-19 (OMS, 2025). No Brasil, cerca de 716.216 mortes foram associadas a esta doença até o momento (29 de maio de 2025) desde o início da pandemia (Ministerio da Saúde, 2025).

A urgência da COVID-19 tem fomentado o desenvolvimento de uma variedade de terapias, destacando-se, entre elas, as vacinas. Estima-se que 13,72 bilhões de doses tenham sido aplicadas até o momento no mundo todo (Our World In Data, 2025). A maioria das vacinas tem como base a proteína S, presente na superfície viral e de essencial importância para entrada do vírus na célula hospedeira (Mistry *et al.*, 2022). Contudo, o surgimento de novas variantes com mutações na proteína S representa um risco para a efetividade das vacinas e a imunidade a longo prazo, demandando um contínuo monitoramento (Mistry *et al.*, 2022).

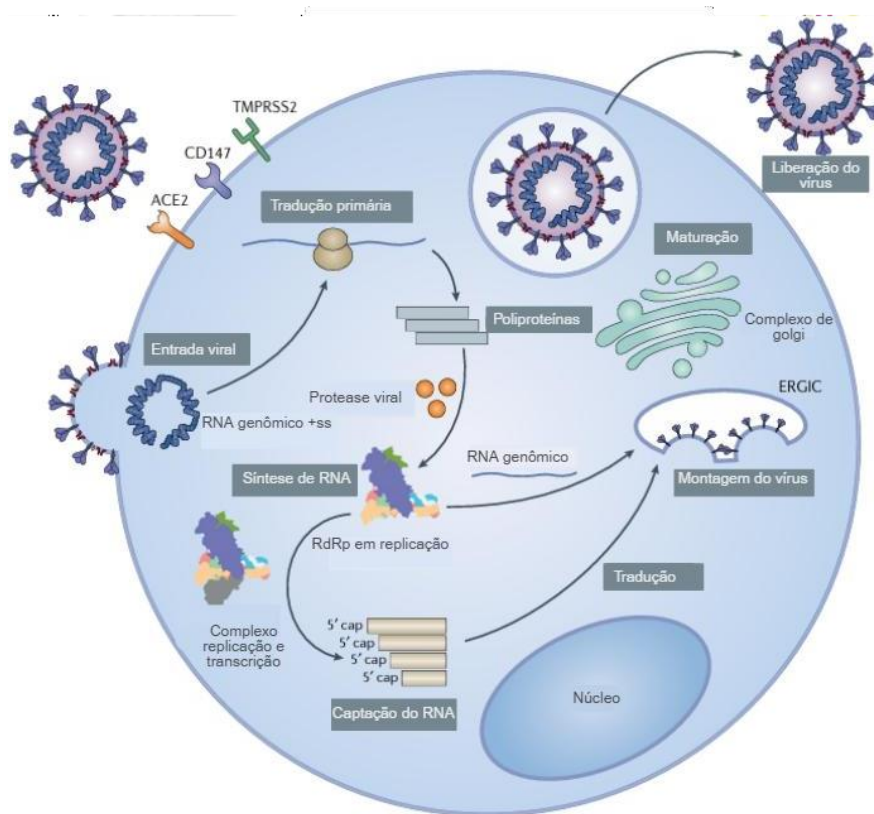
A administração de fármacos tem sido considerada uma outra abordagem terapêutica, uma vez que, a princípio, seus efeitos não seriam alterados por conta de mutações na proteína S, visto que podem atuar sobre outras proteínas (Kneller *et al.*, 2022). Este método vem sendo utilizado no controle de doenças virais que não possuem vacinas efetivas, tais como: AIDS e hepatite C. Para ser considerado um fármaco ideal, ele deve apresentar as seguintes características: ser administrado por via oral, prevenir a progressão da doença para condições mais severas, ter baixo custo e fácil acesso para residentes de países de baixa renda e atuar sobre diferentes variantes do vírus e potencialmente sobre vírus relacionados, como o da

síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o da síndrome respiratória do Oriente Medio (MERS-CoV) (Kim, 2022).

1.2 O vírus SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA fita simples sentido positivo e envelopado, pertencente a família *Coronaviridae* e ao gênero betacoronavírus. Por meio da microscopia eletrônica foi revelado que o vírion SARS-CoV-2 possui um diâmetro de 60 a 140 nm, além de um aspecto esférico ou pleomórfico, contendo espículas (proteína S) de 9-12 nm em sua superfície que se assemelham a coroa solar, por isso o termo coronavírus (Senger *et al.*, 2020). A proteína S é responsável pelo reconhecimento da célula hospedeira pelo vírus, processo que marca o início do seu ciclo replicativo (Figura 1).

Figura 1: Ciclo de vida do vírus SARS-CoV-2



A infecção viral se inicia a partir da ligação da proteína S do vírus com os receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). Após a fusão entre as membranas do vírus e da célula, o RNA genômico viral é liberado no citoplasma e traduzido nas poliproteínas pp1a e pp1ab. Após serem sintetizadas, pp1a/pp1ab são clivadas extensivamente pelas proteases virais em proteínas não estruturais (NSPs), como a RdRP, que replica o RNA genômico viral. As NSPs podem formar os complexos de replicação e transcrição (RTC) que utilizam os RNAm subgenômicos do vírus como molde para gerar as proteínas estruturais do vírus (exemplo: S, M, E e N). As proteínas estruturais em conjunto com o RNA genômico se associam no retículo endoplasmático para a formação dos vírions que posteriormente são liberados da célula por exocitose

Fonte: Adaptado de H. Yang e Rao, 2021

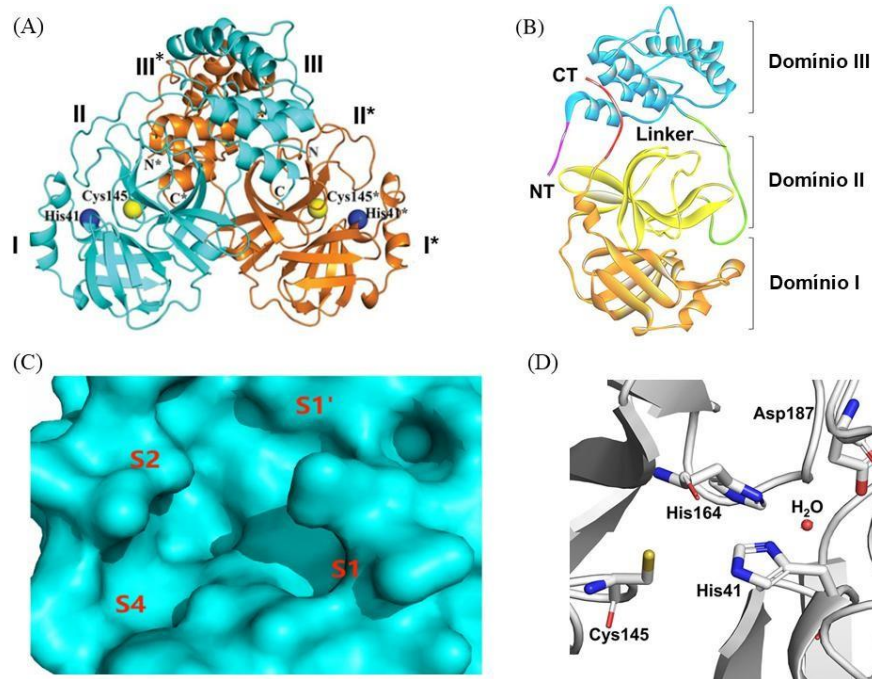
O SARS-CoV-2 possui um genoma que compreende cerca de 30.000 nucleotídeos, contendo um número variável de *open reading frames* (ORFs). ORF1a e ORF1b representam mais de 2/3 de todo genoma e codificam duas poliproteínas sobrepostas – pp1a (440-500 kDa) e pp1ab (740-810 kDa), as quais originam proteínas necessárias para iniciar o processo de formação da partícula viral. O genoma deste vírus compartilha cerca de 82% de identidade na sequência com os dois betacoronavírus responsáveis pelos surtos de doenças respiratórias que ocorreram em 2002-2003 (SARS-CoV) e 2012 (MERS-CoV) (da Costa *et al.*, 2020; Naqvi *et al.*, 2020).

1.3 Protease principal do SARS-CoV-2 (Mpro)

A clivagem das poliproteínas pp1a e pp1ab virais é realizada predominantemente pela protease principal (Mpro) (também conhecida como protease do tipo 3C ou 3CLPro). A Mpro é uma cisteína protease que atua em pelo menos 11 sítios conservados da pp1a/pp1ab com sequências de aminoácidos que geralmente seguem o padrão Leu-Gln*(Ser, Ala, Gly) (* marca o ponto de clivagem). Para que isto ocorra é necessário que primeiro a própria Mpro sofra uma clivagem autolítica para sua liberação das poliproteínas (Senger *et al.*, 2020).

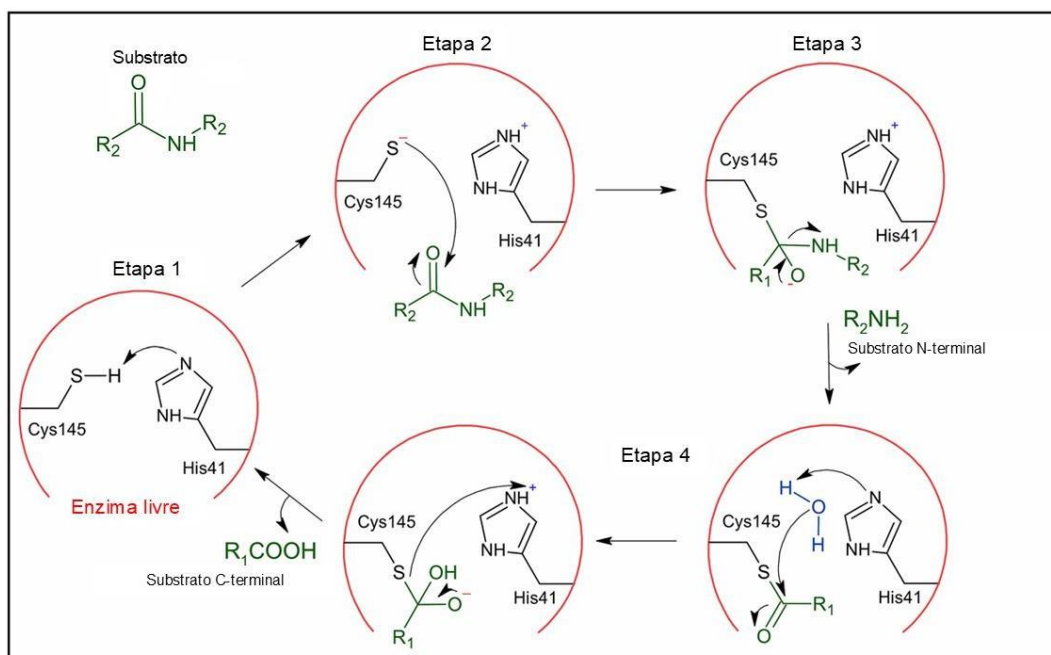
Foram realizados estudos cristalográficos que revelaram que a Mpro é um homodímero (306 aa) (Figura 2A). Cada protômero (33,8 kDa) consiste em três domínios: domínio I (resíduos 8-101), domínio II (resíduos 102-184) e domínio III (resíduos 201-303) (Figura 2B). Entre os domínios I e II, encontra-se o sítio ativo da enzima (Figura 2C). Esse, por sua vez, pode ser dividido em 4 subsítios principais (S1, S1', S2 e S4), os quais participam em interações de alta afinidade com fragmentos específicos (P1, P1', P2 e P3) de inibidores. Nessa região encontra-se a díade Cys145 – His41, responsável pela sua atividade catalítica (Figura 2D) Yang *et al.*, 2024). A reação catalisada pela Mpro está representada na Figura 3.

Figura 2: Estrutura tridimensional da protease principal do SARS-CoV-2



(A) Um protômero do dímero é mostrado em azul claro, o outro em laranja. Os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico são indicados como esferas amarelas para Cys 145 e esferas azuis para His 41. Asteriscos marcam os resíduos do protômero identificado pela cor laranja. (B) Identificação dos domínios I, II e III na estrutura de um dos protômeros da proteína. As porções N-terminal e C-terminal da cadeia do protômero estão identificadas como NT e CT, respectivamente. (C) Estrutura da cavidade de ligação do substrato da Mpro mostrando as regiões dos subsítios S1, S1', S2 e S4. (D) Díade catalítica formada por Cys145 e His41 e outros resíduos importantes para a catálise. Fonte: Adaptado de Zhang *et al.*, 2020; Yang, *et al.*, 2024; Q. Hu *et al.*, 2022

Figura 3: Mecanismo da reação de hidrólise catalisada pela Mpro.



(Etapa 1) desprotonação do grupo -SH da Cys145 pela His41, levando a formação do íon tiolato ativado. (Etapa 2) Em seguida, há um ataque nucleofílico pelo íon tiolato no carbono da carbonila do substrato, resultando na formação de um aduto tetraédrico. (Etapa 3) Liberação do produto peptídico hidrolisado com o N-terminal livre e regeneração da His41 catalítica. (Etapa 4) Hidrólise da ligação tioéster, resultando na liberação do fragmento de peptídeo remanescente com o C-terminal livre. Fonte: Atatreh *et al.*, 2025.

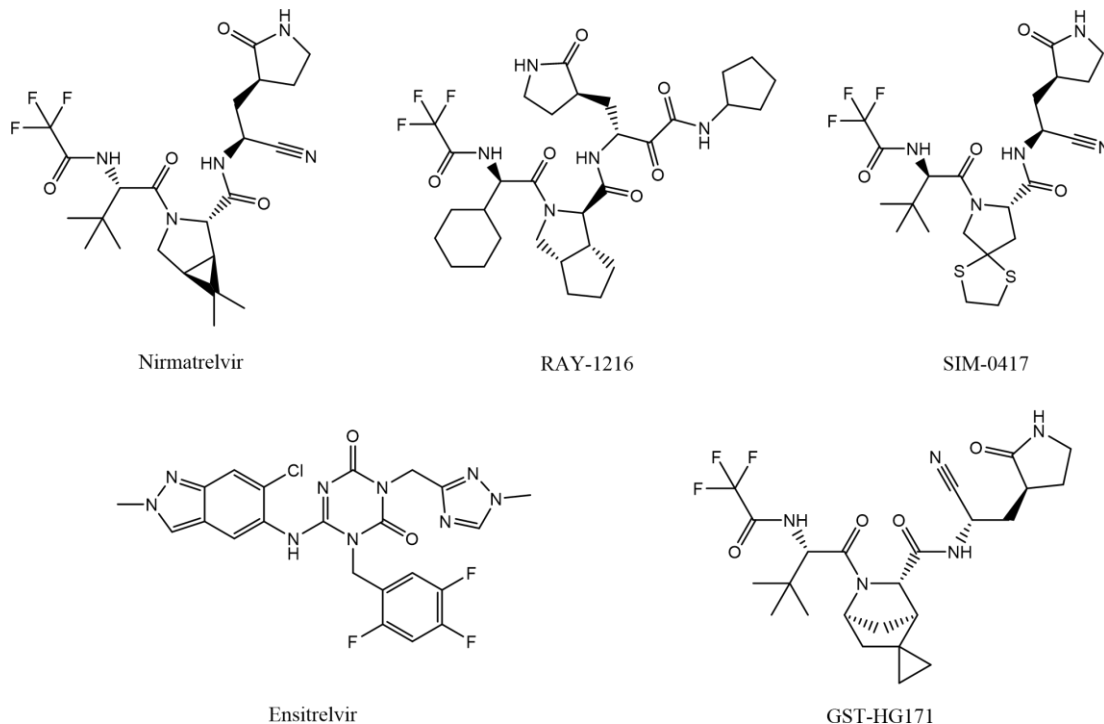
1.4 A protease principal como alvo terapêutico contra a COVID-19

A Mpro de SARS-CoV-2 apresenta várias características que a tornam um potencial alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos contra a COVID-19. Dentre elas incluem o fato de ser essencial para o ciclo da vida do vírus (alvo molecular validado), além de não existir nenhuma proteína homóloga em humanos, logo, as chances de aparecimento de efeitos colaterais são reduzidas. Ainda é possível citar a disponibilidade da enzima recombinante pura e sua estrutura cristalográfica resolvida, tornando possível realizar estudos de docking molecular (Senger *et al.*, 2020).

No final de 2021, a aplicação da Mpro como alvo terapêutico foi comprovada com o lançamento do medicamento PAXLOVID™ (Pfizer), um inibidor covalente reversível desta enzima usado no tratamento de COVID-19 leve a moderada (U.S. Food and Drug Administration, 2022). O medicamento é uma combinação do nirmatrelvir, agente que tem como alvo a enzima Mpro do SARS-CoV-2, e ritonavir, que vai atuar como inibidor do citocromo P450 3A4, diminuindo o metabolismo do nirmatrelvir e aumentando seus níveis séricos (Najjar-Debbiny *et al.*, 2023). Posteriormente, outros inibidores de Mpro foram

aprovados para uso clínico, mas seu uso por enquanto ainda é restrito a poucos países (Figura 4) (Y. Yang *et al.*, 2024).

Figura 4: Inibidores de Mpro usados na clínica para o tratamento de COVID-19.



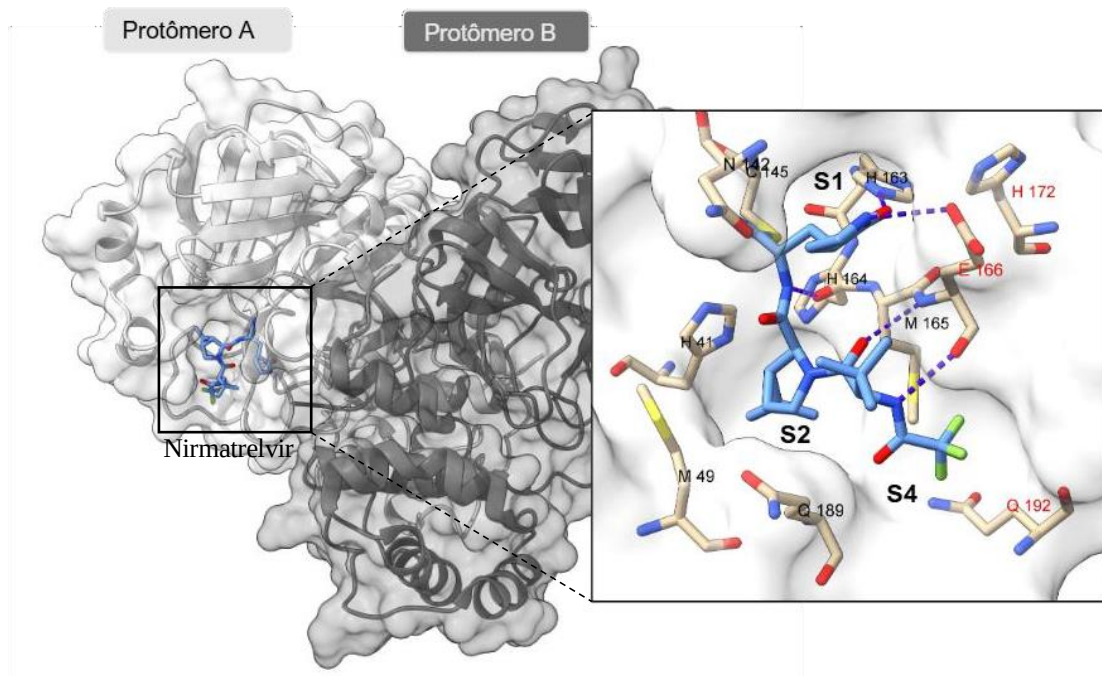
Fonte: Adaptado de Y. Yang *et al.*, 2024.

Na literatura já existem relatos de Mpro que apresentam mutações em resíduos que participam na interação da enzima com o nirmaltrevir, reduzindo a atividade inibitória do composto (Huang *et al.*, 2023). Como resultado, as cepas virais que abrigam essas mutações podem ser mais resistentes ao fármaco, permitindo que continuem a se replicar e se disseminar no hospedeiro humano. Até o momento foram descritas mais de 20 Mpro mutantes com menor sensibilidade ao nirmaltrevir. As Mpro mutantes E166N, Q192V e H172Y, por exemplo, apresentam valores de IC_{50} para o fármaco 336, 25 e 31 vezes superiores que a Mpro selvagem, respectivamente (Huang *et al.*, 2023).

Na figura 5 é mostrado o sítio de ligação do nirmaltrevir a Mpro destacando os resíduos associados as mutações E166N, Q192V e H172Y. A forma como as mutações E166N, Q192V e H172Y interferem na função da Mpro é variada. O resíduo E166, localizado no subsítio S1, possui um oxigênio na cadeia lateral que forma uma ligação de hidrogênio crucial com o anel lactâmico do nirmaltrevir. A substituição desse resíduo por asparagina (E166N) compromete essa interação, reduzindo a afinidade pelo inibidor (Huang *et al.*, 2023).

A mutação H172Y, por sua vez, altera a conformação N-terminal do protômero adjacente no dímero biológico, que está próximo ao sítio ativo. A substituição de histidina por tirosina reduz a atividade enzimática. Por fim, o resíduo Q192, localizado no bolso S4, forma uma interação hidrofóbica com o grupamento trifluorometil do nirmatrelvir. Sua mutação por valina (Q192V) resulta numa diminuição no grau de estabilização proteica (Y. Hu *et al.*, 2022). Tais mutações representam um desafio terapêutico para o tratamento da COVID-19, justificando a busca por novos inibidores de Mpro, além da necessidade de se estar preparado para futuras cepas do vírus.

Figura 5: Estrutura tridimensional da Mpro de SARS-CoV-2 ligada ao composto nirmatrelvir.



Os resíduos da proteína localizados a 6 Å do sítio de ligação do nirmatrelvir estão representados como bastões na cor bege, enquanto o composto na cor azul. Os resíduos associados as mutações E166N, Q192V e H172Y estão identificados pela cor vermelha, enquanto os demais pela cor preta. As linhas azuis pontilhadas indicam a formação de ligações de hidrogênio. O modelo foi gerado com o programa Chimera X (Meg et al., 2023). Fonte: Adaptado de Hu *et al.*, 2023 e Duan *et al.*, 2023.

1.5 Abordagens experimentais e computacionais para a descoberta de novos inibidores da Mpro

Diversas técnicas experimentais e computacionais têm sido usadas na identificação de novos inibidores de Mpro (Song *et al.*, 2024). Dentre as abordagens experimentais destaca-se a triagem em alta vazão (*High-throughput screening* - HTS) na qual um grande número de compostos (normalmente na ordem de milhares) são testados de forma automatizada sobre a atividade de Mpro (Jin *et al.*, 2020). De forma semelhante, a triagem virtual (*Virtual Screening* – VS) avalia grandes bibliotecas químicas virtuais com o objetivo de identificar potenciais compostos ativos sobre a Mpro que posteriormente podem ser sintetizados e testados sobre o alvo biológico. Desta forma, é possível priorizar quais compostos serão avaliados experimentalmente, diminuindo o tempo e custo. Existem dois tipos principais de VS: um baseado no alvo molecular (*Structure-Based Virtual Screening* – SBVS) e outro baseado no ligante (*Ligand-Based Virtual Screening* – LBVS). O SBVS requer a estrutura tridimensional da proteína-alvo, e a triagem é realizada, em geral, por meio de docking molecular (abordagem que prevê a posição e orientação de ligação de pequenas moléculas a proteínas) (de Souza Neto *et al.*, 2020; Clyde *et al.*, 2022). Já a LBVS identifica potenciais compostos ativos tendo como base sua similaridade a ligantes conhecidos da proteína. Essa abordagem tem sido implementada principalmente por meio de algoritmos de aprendizado de máquina (Ferreira *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2021).

Além das abordagens citadas anteriormente, outras duas técnicas recentes também têm se destacado na descoberta de novos fármacos, inclusive inibidores de Mpro. Uma delas é a modelagem generativa baseada em redes neurais profundas (*deep learning*) (Gangwal e Lavecchia, 2024). Ela utiliza diferentes tipos de redes neurais para propor novos dados a partir de um processo de treinamento que aprende os padrões presentes em conjuntos de dados já existentes. Essa técnica já possibilitou a geração de novas moléculas que se mostraram de fato inibidoras de Mpro (Sun *et al.*, 2025).

Outra estratégia que vem sendo explorada é a descoberta de fármacos baseada em fragmentos moleculares. Estes apresentam algumas características específicas que os diferenciam de fármacos ou moléculas semelhantes a fármacos (*drug-like*) como: baixo peso molecular (≤ 300 Da), presença de até 3 grupos doadores de hidrogênio e 3 aceptores, ClogP menor que 3 e a área de superfície polar (PSA) menor que $60 \text{ \AA}^2$ (Congreve *et al.*, 2003). Nessa técnica, uma biblioteca de fragmentos é utilizada para identificar aqueles que se ligam com o alvo. Uma de suas vantagens é que, quando comparado com o tamanho de compostos *drug-like*, os fragmentos são menores, o que torna mais favorável a realizações de

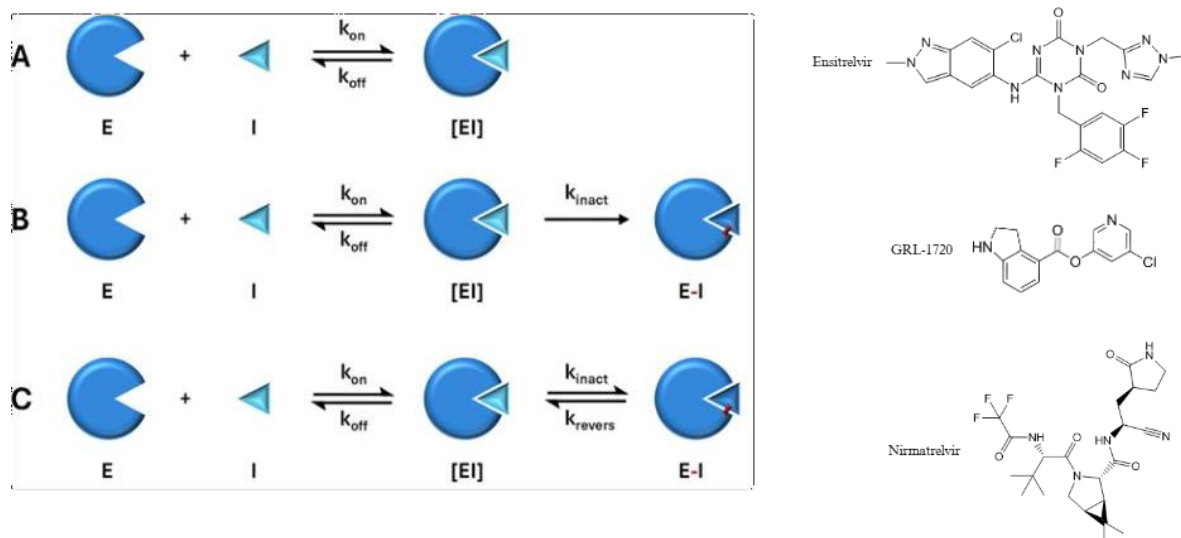
modificações na sua estrutura química (Teli *et al.*, 2022). Além disso, em comparação com os milhares ou milhões de compostos que podem ser triados em campanhas de HTS, as bibliotecas de fragmentos apresentam geralmente um número inferior a 1.000 fragmentos (de Souza Neto *et al.*, 2020).

1.6 Classificação dos inibidores de Mpro

Os inibidores de Mpro identificados até o momento têm sido classificados de diferentes formas. Dentre elas incluem o tipo de cinética de ligação, a origem (naturais ou sintéticos) e a estrutura química (peptidomiméticos ou pequenas moléculas) (Zagórska *et al.*, 2024; Shawky *et al.*, 2024).

Em relação a cinética de ligação, os inibidores demonstram se ligar a Mpro de maneira não covalente, covalente irreversível ou covalente reversível (Figura 6). Os inibidores não covalentes ligam-se de forma reversível a enzima através de ligações de hidrogênio e interações não polares, podendo ligar-se e dissociar-se da enzima diversas vezes. Tais interações podem gerar distorções nos sub-bolsos do sítio de ligação do substrato ocasionando o deslocamento de moléculas de água essenciais, e finalmente bloqueando o acesso ao sítio catalítico. O fármaco ensitrelvir é um exemplo de inibidor de Mpro que apresenta este tipo de mecanismo de inibição. Para os inibidores covalentes, a interação ocorre em duas etapas: primeiro, há uma interação reversível entre a enzima e o inibidor, em seguida, o grupo tiol (-SH) da Mpro ataca um átomo de carbono do inibidor, resultando numa nova ligação que, a depender de sua força, poderá ser reversível ou irreversível. Neste último caso, inibidores covalentes irreversíveis vão formar uma ligação covalente com a enzima alvo, inativando permanentemente a atividade da enzima. Como exemplo, inibidores como cinanserina, GRL-1720 e ebselen demonstraram inibição da Mpro por meio de ligação covalente irreversível ao resíduo de cisteína catalítica. Há ainda aqueles que formam uma ligação covalente com a enzima alvo, mas que sob certas condições, pode ser quebrada, permitindo a recuperação da atividade enzimática (inibidor covalente reversível), como o boceprevir e o lufotrelvir (Zagórska *et al.*, 2024).

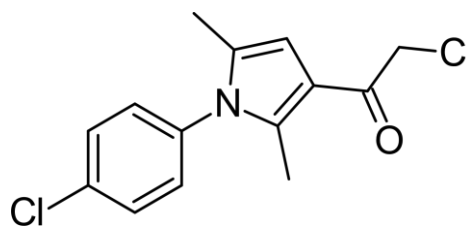
Figura 6: Principais tipos de mecanismos de inibição de compostos ativos sobre a Mpro de SARS-CoV-2.



(A) Interação de um inibidor reversível não covalente com uma enzima. Interação de inibidores covalentes irreversíveis (B) e reversíveis (C) com uma enzima. À direita da imagem estão representadas as estruturas químicas dos compostos referentes a cada classe de inibidores. Fonte: Adaptado de Zagórska *et al.*, 2024.

Anteriormente nosso grupo implementou uma técnica de modelagem generativa por inteligência artificial (aprendizado profundo) para gerar novas moléculas com potencial inibitório da Mpro de SARS-CoV-2 (Santana e Silva-Jr, 2021). Recentemente o protocolo foi adaptado para gerar apenas moléculas com características de fragmento com o intuito de facilitar sua aquisição por fontes comerciais. Parte dessas moléculas já foi comprada da empresa Molport (<https://www.molport.com/>) e testada sobre a atividade de Mpro recombinante na concentração de 100 μ M. No total, 5 de 36 compostos foram capazes de inibir a atividade enzimática em mais de 30%. Posteriormente, seus valores de IC_{50} (concentração do composto que inibe 50 % da atividade enzimática), foram calculados. Dentre eles, o composto MolPort-000-145-183 (Figura 7) apresentou um IC_{50} para a Mpro de 116,8 μ M. Além de ser ativo sobre a enzima, tal composto também foi capaz de reduzir a taxa replicativa viral em modelos celulares de infecção por SARS-CoV-2, sugerindo seu potencial farmacológico para o tratamento da COVID-19 (Saramago *et al.*, 2023).

Figura 7: Estrutura molecular do composto MolPort-000-145-183



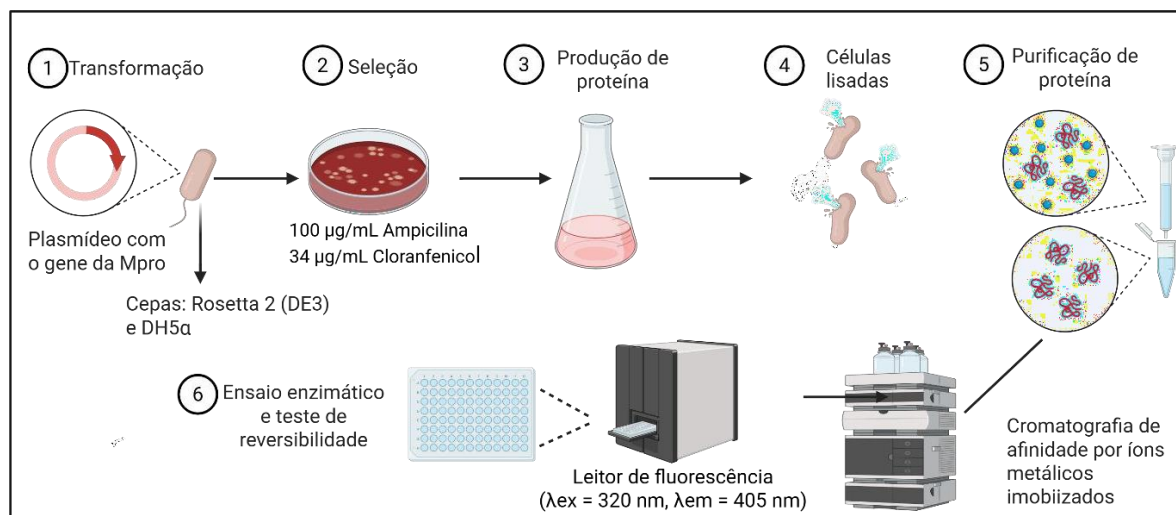
Fonte: Saramago *et al.*, 2023.

Este projeto tem como objetivo caracterizar os efeitos inibitórios de compostos ativos sobre a Mpro do SARS-CoV-2 selecionados por inteligência artificial, tendo como foco a interação da proteína com o composto MolPort-000-145-183. Para isso será necessário expressar e purificar a Mpro recombinante de SARS-CoV-2 em *Escherichia coli*. Também temos como objetivo expressar e purificar as versões mutantes (E166N, Q192V e H172Y). Com a obtenção da proteína pura, será realizado um teste de reversibilidade com o composto 183 para determinar se o composto teste é um inibidor do tipo reversível ou irreversível. Esperamos que os resultados gerados neste trabalho nos auxiliem no desenvolvimento de novos inibidores de Mpro e suas variantes mutantes com potencial farmacológico para o tratamento da COVID-19.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em várias etapas que estão ilustradas na Figura 8. Cada uma delas será detalhada nos tópicos seguintes.

Figura 8: Fluxo de trabalho para a obtenção da proteína Mpro de SARS-CoV-2.



(1) incorporação do plasmídeo recombinante contendo o gene da Mpro em cepas de *E. coli* e (2) seleção das células bacterianas que sofreram a transformação. (3) Posteriormente, houve indução da expressão de Mpro por IPTG. (4) Em seguida, as células bacterianas foram lisadas e, após a centrifugação da suspensão, o sobrenadante contendo a Mpro foi coletado. (5) A proteína foi isolada do sobrenadante após duas etapas de cromatografia de afinidade: uma convencional e outra reversa. Por fim, a proteína selvagem pura foi utilizada para a realização de testes enzimáticos (6).

2.1 Compostos químicos

Neste trabalho foi avaliado 1 dos 5 fragmentos previamente preditos como inibidores da Mpro de SARS-CoV-2 por um modelo de inteligência artificial (Saramago *et al.*, 2023). Ele foi adquirido da empresa Molport (<https://www.molport.com/shop/index>) e possui o código MolPort-000-145-183. Ao longo do texto ele será identificado como 183. O composto foi solubilizado em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenado a -30°C na concentração estoque de 10 mM.

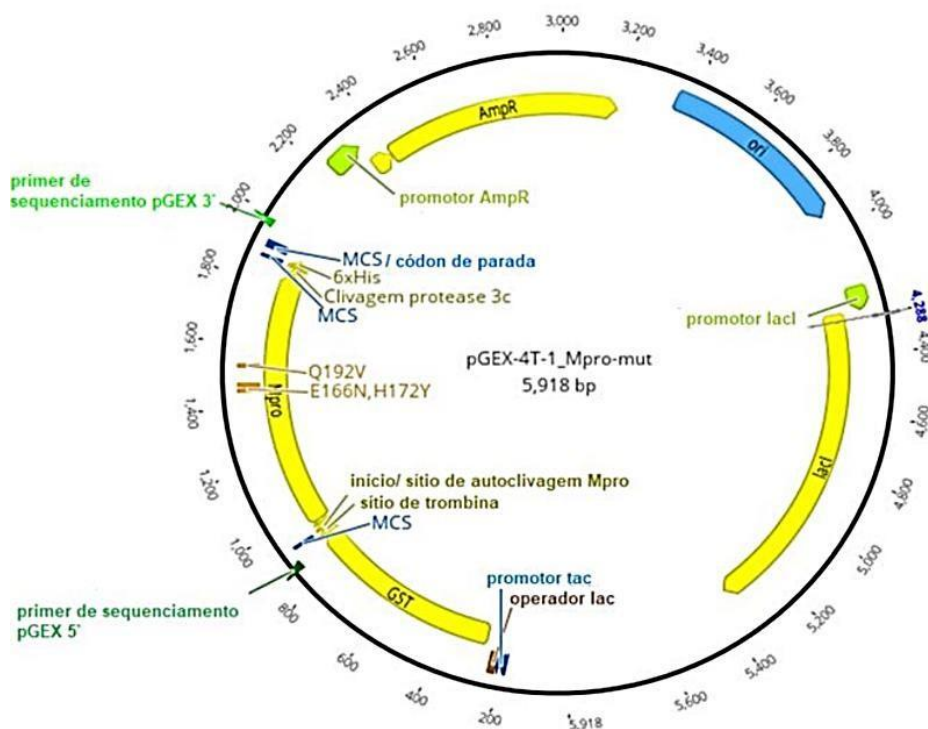
2.2 Expressão e purificação da Mpro

2.2.1 Construção do plasmídeo recombinante contendo os genes de Mpro selvagem e mutantes (H172Y, Q192V e E166N)

A sequência do plasmídeo pGEX-4T-1 foi obtida primeiramente no sítio eletrônico eletrônico <https://www.addgene.org/vector-database>, que contém uma base de dados de vetores de DNA (Vector Database). Posteriormente a sequência da Mpro de SARS-CoV-2 foi obtida no GeneBank (número de acesso: NC_045512). Os códons da sequência da Mpro selvagem e mutantes (H172Y, Q192V ou E166N) foram analisados e otimizados no software

Snap Gene e posteriormente verificamos o mapa de restrição no sítio eletrônico <https://www.genscript.com/tools/restriction-enzyme-map-analysis>. Para a construção do vetor foram inseridos os sítios de BamHI e XhoI na porção 5' e 3' da sequência da Mpro, respectivamente. Uma sequência de auto clivagem foi inserida na porção 5', para obtenção da Mpro autêntica durante o processo de expressão. Com o intuito de facilitar a purificação também foi inserida uma cauda de histidina (CACCACCACCACCAC) após um sítio de clivagem da protease 3C do rhinovirus humano (Figura 9).

Figura 9: Mapa do plasmídeo pGEX-4T-1 contendo o gene de Mpro de SARS-CoV-2.



Mapa do plasmídeo pGEX-4T-1 contendo o gene de Mpro de SARS-CoV-2. Mutantes (H172Y: 1.470 – 1.472 pb; Q192V: 1.530 – 1.532 pb; E166N: 1.452 – 1.454 pb). A construção do plasmídeo, incluindo suas mutações e análise dos sítios de restrição foram feitos no software SnapGene.

2.2.2 Transformação bacteriana com o plasmídeo contendo o gene da Mpro (selvagem e mutante)

A inserção do plasmídeo recombinante foi realizada por choque térmico (Lessard, 2023) em duas cepas de *Escherichia coli*: a Rosetta 2(DE3), utilizada para expressão de proteínas que possuem códons raramente usados em *E. coli*, e a cepa DH5 α , utilizada para aplicações gerais de clonagem e subclonagem. O plasmídeo pGEX-4T-1 possui um gene de resistência a ampicilina, enquanto a cepa Rosetta 2 (DE3) contem um plasmídeo complementar que contém, um gene de resistência ao cloranfenicol. As cepas foram cultivadas a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) sólido contendo 100 μ g/mL de ampicilina (Rosetta 2 (DE3) e DH5 α) e 34 μ g/mL de cloranfenicol (Rosetta 2 (DE3)).

2.2.3 Expressão da Mpro

Na expressão em larga escala da Mpro na cepa Rosetta 2 (DE3), quando as culturas atingiram uma absorbância em 600 nm de 0,8–1,0, foi adicionado 0,5 mM de isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), a temperatura de incubação foi alterada para 18 °C e o cultivo foi realizado overnight (12-16 h). Então, as células bacterianas foram coletadas por

centrifugação e ressuspensas em tampão de lavagem contendo Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 25 mM, pH 8,0 (10 g de células: 30 mL de tampão) e 1:10 μ L de lisozima (10 mg/mL). As células foram mantidas a 4 °C, lisadas em um homogeneizador ultrassônico (5 ciclos, 30 kpsi, 30 segundos com 1 minuto de intervalo a 4 °C) e centrifugadas a 50.000 x g por 60 minutos. Subsequentemente, o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,45 μ m.

2.2.4 Purificação da Mpro

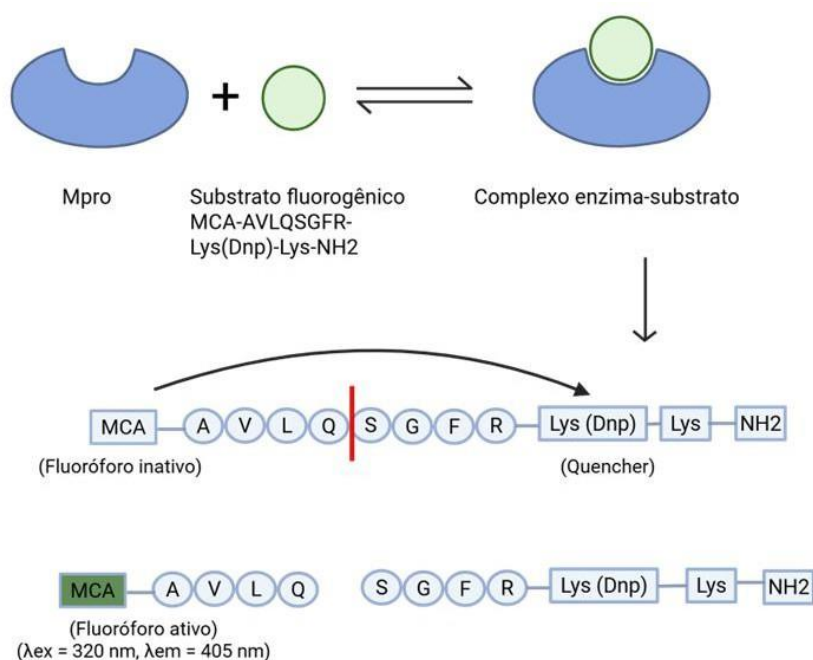
Para a purificação, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) HisTrap HP Ni Superflow previamente equilibrada com tampão de ligação no sistema de FPLC GE AKTA Purifier 100. Após esse processo, a coluna foi lavada com 50 mL (10x volume da coluna) de tampão de lavagem contendo Tris 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 25mM, pH 8,0. A proteína selvagem foi eluída com tampão de eluição Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM pH 8,0, até que a proteína não fosse mais detectada nas frações eluídas. Já para as mutantes foi utilizada apenas uma concentração (500 mM) de Imidazol. A protease 3C (1 mg de 3C protease: 10 mg Mpro) foi adicionada as frações eluídas, as quais foram então dialisadas usando uma membrana de 3500 MWCO durante a noite a 4°C contra 2 L de tampão de filtração em gel: pH 8,0 Tris 50 mM tampão NaCl 300 mM + 0,5 mM TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina). No dia seguinte, a purificação reversa foi realizada usando a mesma coluna IMAC. A proteína foi concentrada com filtros de 10 kDa MWCO Amicon em um volume de 5 mL e então aplicada na coluna S200 16/60, a uma vazão de 0,75 mL/min, previamente equilibrada com o tampão de filtração em gel. Para os experimentos, o pico foi concentrado novamente usando um filtro Amicon 10 kDa MWCO. A concentração de proteínas foi determinada a partir de sua absorbância a 280 nm usando um coeficiente de extinção molar ($33640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todas as etapas de purificação foram monitoradas por SDS-PAGE com geis contendo 15% de acrilamida e corados com azul de Coomassie.

2.3 Ensaio da atividade enzimática de Mpro

A atividade enzimática da Mpro de SARS-CoV-2 foi mensurada em microplacas através de um ensaio FRET (Transferência de energia por ressonância de fluorescência) com o substrato fluorogênico MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH₂ que foi sintetizado tendo como base a sequência de autoclivagem N-terminal da protease viral (GENEONE, código: SML2973) (Quan *et al.*, 2022) (Jin *et al.*, 2020) (Figura 10). Inicialmente o meio reacional foi

formado pela Mpro recombinante (0,2 μ M) e o composto teste (ou DMSO, veículo) em solução tampão de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3. Após 10 min de incubação a 30 °C a reação enzimática foi iniciada adicionando-se 20 μ M de substrato. A fluorescência emitida pelo produto da hidrólise do substrato foi monitorada continuamente no leitor de microplacas FlexStation 3 da Molecular Devices ($\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 405$ nm) da Plataforma de Bioensaios e Triagem de Fármacos do IOC.

Figura 10: Ensaio FRET com o substrato fluorogênico MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys- NH₂.



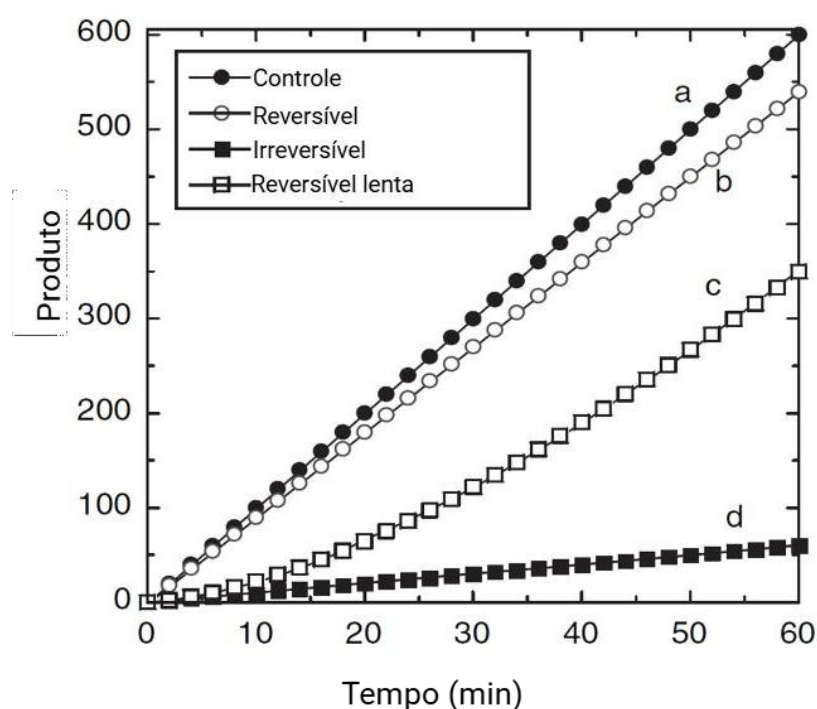
Ensaio realizado para avaliar a atividade de Mpro. A barra vermelha representa a região do substrato onde ocorre a clivagem mediada pela enzima. Fonte: Adaptado de Quan *et al.*, 2022.

2.4 Teste de reversibilidade

Para determinar se o inibidor se liga a enzima de forma reversível ou irreversível foi realizado um ensaio de reversibilidade (Copeland, 2005). Inicialmente o meio reacional foi composto pela Mpro, numa concentração 100 vezes acima daquela usada na etapa de triagem (i.e. 20 μ M) e inibidor (ou DMSO), numa concentração 10 vezes superior ao seu valor de IC₅₀ (1,168 mM). Após 20 min de incubação a 30 °C, a reação enzimática foi iniciada com a adição

de solução tampão contendo 20 μM de substrato num volume suficiente para diluir o meio reacional em 100 vezes. A leitura de fluorescência do produto foi realizada conforme descrito no tópico 2.3. (Quan *et al.*, 2022). O progresso da curva de formação de produto foi então comparado entre os ensaios realizados na presença e na ausência do inibidor. Ao comparar o formato da curva e a taxa de formação do produto foi possível determinar se o composto 183 apresentava um perfil de inibidor reversível, reversível lento ou irreversível (Figura 11).

Figura 11: Representação dos tipos de curvas de progressão da reação para cada perfil de inibição obtidos após o teste de reversibilidade.



O eixo x representa o tempo em minutos e o eixo y a quantidade de produto formado. (a) controle (DMSO), (b) inibidor reversível, (c) inibidor reversível lento e (d) inibidor irreversível. Fonte: Adaptado de Copeland, 2005.

3 RESULTADOS

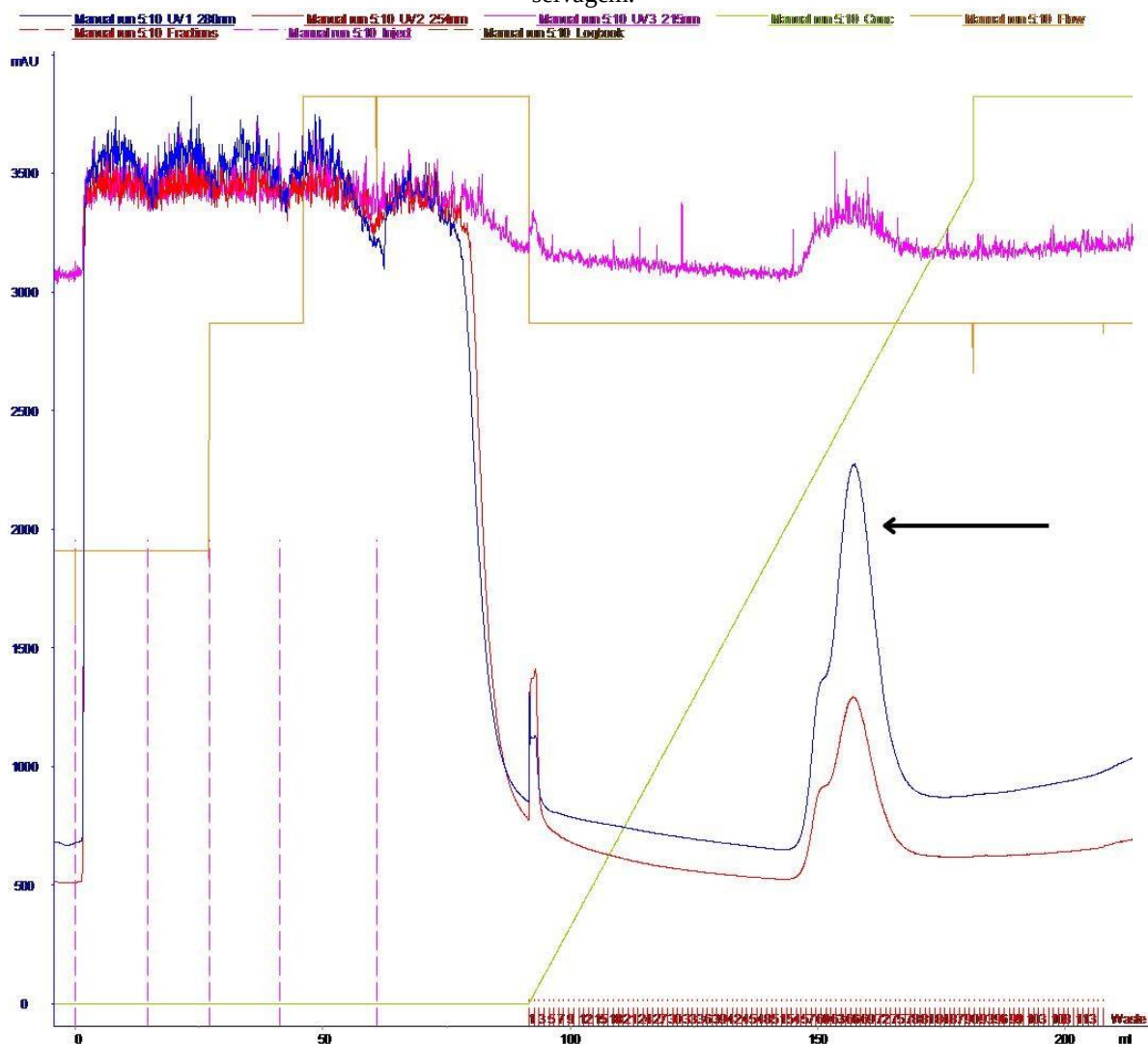
3.1 Produção de Mpro recombinante de SARS-CoV-2

O processo para a expressão e purificação de proteínas envolve um grande número de etapas experimentais. Abaixo estão descritos os resultados alcançados a partir de etapas que consideramos as mais relevantes.

3.1.1 Expressão da proteína e purificação

Após realizarmos a etapa de expressão do gene da Mpro em bactérias (Rosetta 2(DE3)), iniciamos o processo de purificação da proteína. Na figura 12, é mostrado o cromatograma gerado após a realização da cromatografia de afinidade das amostras processadas contendo a Mpro selvagem expressa pelas bactérias. Nota-se um aumento da D.O (linha azul, $\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$), após injeções da amostra (linha tracejada rosa), o que indica a presença da proteína total. As proteínas que foram retidas na coluna foram eluídas utilizando um gradiente de Imidazol (linha verde), que foi aplicado quando a D.O retornou ao seu valor inicial. Durante a eluição, observou-se um pico de D.O em 280 nm (indicado pela seta preta) referente as proteínas coletadas nas frações 55 a 80. A análise desta região demonstrou um volume de retenção de proteína de 157,45 mL. O maior valor de D.O foi encontrado na fração 69. Os cromatogramas gerados com as versões mutantes da Mpro foram semelhantes ao obtido com a versão selvagem (Figuras A1, A2 e A3 no anexo).

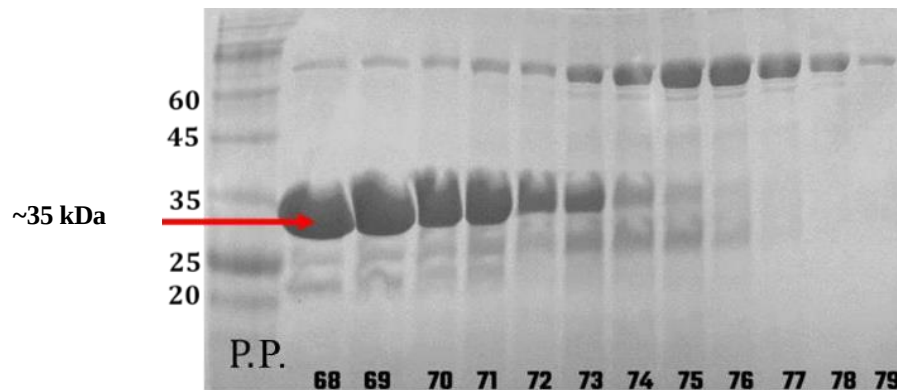
Figura 12: Cromatograma gerado após cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados com a Mpro selvagem.



As linhas azul, vermelha e rosa representam respectivamente a absorvância em 280, 254 e 215 nm. A linha verde representa o gradiente de imidazol aplicado (0-100%). As linhas rosas tracejadas representam as injeções da amostra (5 no total). A seta preta representa o pico de absorvância a 280 nm após a eluição da coluna com o imidazol.

A purificação foi monitorada por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), sendo possível observar uma banda intensa correspondente a um tamanho de aproximadamente 35 kDa (Figura 13). Resultado semelhante foi encontrado para as proteínas mutantes (Figuras A4, A5 e A6 no anexo). A fração 69 apresentou a maior absorvância a 280 nm e foi utilizada no teste enzimático para medir a atividade específica da Mpro selvagem. Nós observamos uma atividade específica de 42.103 U/mg.

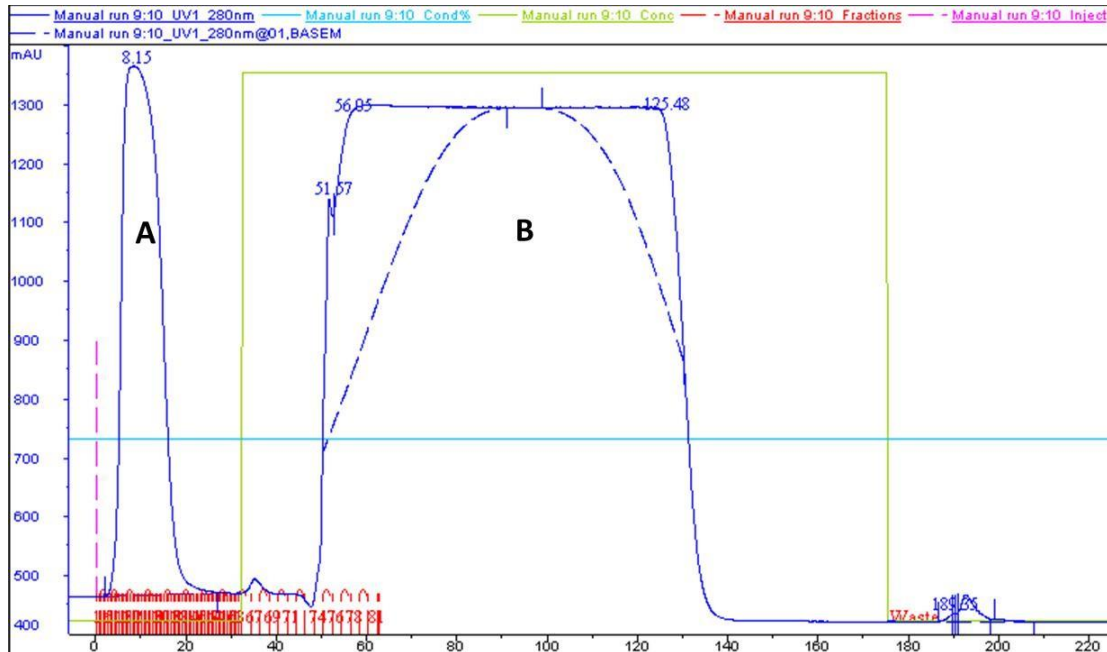
Figura 13: Eletroforese em gel (SDS-PAGE) das frações 68-79 coletadas após cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados com a Mpro selvagem.



As bandas do padrão de peso molecular (P.P) estão representadas em kDa a esquerda da imagem.

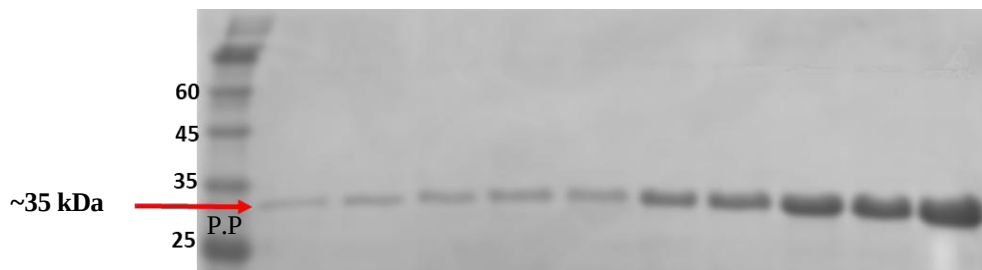
Para a obtenção da proteína selvagem pura, as frações do pico coletadas foram dialisadas e subsequentemente incubadas com a protease 3C, com o objetivo de clivar a cauda de histidina adicionada na construção da Mpro. Em seguida, realizou-se a cromatografia de afinidade reversa (Figura 14) onde foi possível observar a eluição da Mpro (A) após a adição do tampão A que contém pouco imidazol na sua composição (25 mM). Neste cromatograma também foi possível observar um outro pico (B) após a lavagem com o tampão de eluição (500 mM de imidazol). Esta etapa de purificação também foi monitorada por eletroforese em SDS-PAGE. As frações do primeiro pico A (volume de retenção de 8,15 mL) foram aplicadas no gel e observou-se a presença de uma banda majoritária com tamanho um pouco inferior a 35 kDa (Figura 15). A cromatografia reversa não foi realizada com as versões mutantes, pois não foi possível clivar a cauda de histidina das proteínas obtidas após a primeira etapa da cromatografia de afinidade.

Figura 14: Cromatograma indicando a eluição da Mpro selvagem por cromatografia de afinidade reversa.



A purificação foi realizada no equipamento AKTA pure. As linhas azul, vermelha e rosa representam respectivamente a absorbância em 280, 254 e 215 nm. A- aplicação do tampão de lavagem contendo 25 mM de Imidazol. B- aplicação de tampão de eluição contendo 500 mM de imidazol. A linha verde representa Imidazol aplicado (500 mM). A linha tracejada rosa representa a injeção da amostra (1 no total).

Figura 15: Eletroforese em Gel (SDS-PAGE) das frações coletadas após a primeira etapa de eluição (aplicação do tampão A) da cromatografia de afinidade reversa.

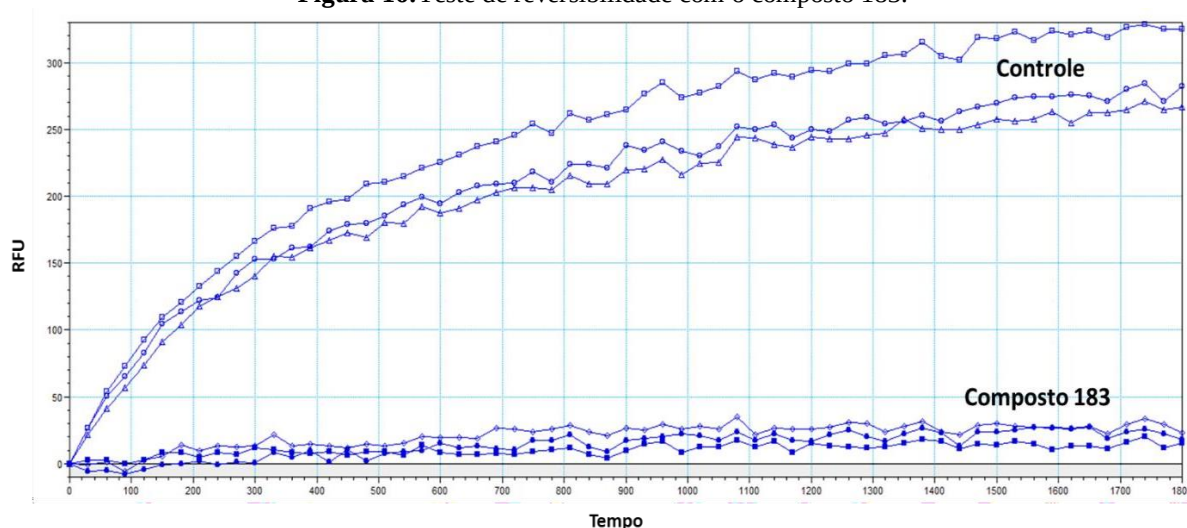


As bandas do padrão de peso molecular (P.P.) estão representadas em kDa.

3.2 - Teste enzimático de reversibilidade com o composto 183

A Mpro selvagem recombinante foi usada para realizar um teste de reversibilidade com o composto 183. Após a etapa de rápida diluição do ensaio, a Mpro incubada com o composto apresentou uma baixa taxa de formação do produto, sendo muito inferior a observada no grupo controle (DMSO) (Figura 16).

Figura 16: Teste de reversibilidade com o composto 183.



No gráfico é mostrado o progresso das curvas de atividade da Mpro ao longo do tempo de reação na presença de DMSO (controle) e composto 183. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizada a expressão e purificação da Mpro selvagem recombinante de SARS-CoV-2. Uma vez com a enzima pura, foi possível caracterizar o tipo de inibição do composto 183, um fragmento molecular selecionado previamente por inteligência artificial. Além da versão selvagem, também foram expressas e parcialmente purificadas três variantes mutantes da enzima (E166N, Q192V e H172Y), escolhidas em função de sua menor sensibilidade ao nirmatrelvir. Desta forma, futuramente poderemos avaliar a potência e seletividade dos nossos compostos frente as diferentes versões da enzima.

O sistema bacteriano utilizado neste trabalho (*Escherichia coli*), é amplamente utilizado como hospedeiro para expressar proteínas recombinantes devido ao seu crescimento rápido, baixo custo e fácil manipulação (Jia e Jeon, 2016). De fato, este sistema possibilitou a obtenção de uma quantidade de proteína suficiente para seguirmos com as próximas etapas do trabalho.

Devido a adição da cauda de histidina na estrutura da Mpro, o processo de purificação foi simplificado, uma vez que foram necessárias apenas duas etapas numa mesma coluna de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), uma convencional e a outra reversa, para eluir a proteína. Ao compararmos os geis obtidos antes (Figura 13) e depois (Figura 15) da adição da protease 3C, a banda que foi observada na purificação reversa parece ter menor peso molecular do que aquela observada antes da incubação com a protease, o que poderia ser explicado pela remoção da cauda de histidina. Essa hipótese também é corroborada pelo fato de que na cromatografia reversa nós encontramos a proteína no pico inicial, o que só ocorre para aquelas que estão sem a cauda de histidina (Figura 14). Em conjunto, os resultados obtidos nesse trabalho, indicam que os sistemas utilizados na expressão e purificação de Mpro se demonstraram adequados, uma vez que obtivemos uma proteína que apresenta não só um peso molecular compatível com a Mpro viral (~33,8 kDa), como também atividade catalítica sobre o substrato específico.

Durante a produção de alguns lotes da enzima observamos que ao incubarmos a amostra com a protease 3C, a clivagem da cauda de histidina não foi bem-sucedida. Isto acabou impossibilitando a realização da cromatografia reversa com as versões mutantes da Mpro, assim como a produção de mais enzimas selvagens. Diante disso, recentemente foi realizado um teste com o kit da própria protease, a fim de testar diferentes concentrações da enzima e avaliar sua atividade. Após padronização, conseguimos definir a concentração ideal para obter a versão selvagem da Mpro sem a cauda de histidina (dados não mostrados).

Possivelmente, parte das enzimas presentes no kit degradou desde a última produção de Mpro, sendo então necessário aumentar a concentração da protease para obter o mesmo nível de atividade de antes. O teste sobre as Mpro mutantes ainda está em andamento.

Com a proteína selvagem pura apresentando atividade, o próximo passo foi determinar cineticamente o modo de ligação do composto 183 com a Mpro. Para isso, foi realizado um teste de reversibilidade. Neste ensaio, é possível distinguir o modo de inibição de um composto com base no perfil da curva de progressão da reação enzimática (concentração do produto em função do tempo). Na figura 16 é possível observar que a curva gerada após a incubação da Mpro com o composto 183 apresentou baixa inclinação, indicando uma baixa atividade enzimática, um comportamento associado a inibidores irreversíveis (Figura 12) (Copeland, 2005). Este resultado está de acordo com dados de cristalografia de raios-X gerados pelo nosso grupo que revelaram que esse composto se liga de forma covalente a Mpro (dados não mostrados). A ligação se dá entre a cisteína do sítio catalítico da enzima e o grupamento clorometilcetona do composto 183. A clorometilcetona é um grupo reativo clássico ('warhead') para inibição covalente de cisteíno proteases (Saramago *et al.*, 2023).

Uma importante característica dos inibidores irreversíveis é a formação de uma ligação covalente com a proteína alvo. Isso resulta em um tempo de ligação mais longo, o que pode reduzir a frequência de administração do medicamento pelo paciente. No entanto, o uso desse tipo de inibidor pode estar associado a riscos de toxicidade imprevisível, devido a sua interação permanente com o alvo. Diversos inibidores covalentes da Mpro já foram descritos na literatura, como GRL-1720, N3 e SIMR-2418, que atuam de forma semelhante ao composto 183 (Yang *et al.*, 2024; Zagórska *et al.*, 2024).

O próximo passo deste trabalho é determinar o valor de parâmetros cinéticos de inibição que caracterizem melhor a interação entre a Mpro selvagem e o composto 183, como a constante de inibição (K_i) e a k_{inact} , uma constante de velocidade que descreve a etapa de inativação irreversível de uma enzima por um inibidor covalente. A mesma análise será realizada com as versões mutantes da enzima quando já estiverem disponíveis. Uma vez que possuímos dados cristalográficos, que mostram como o composto 183 se liga a Mpro, também é possível realizar o design racional de novos inibidores a partir da estrutura deste composto. Existem várias técnicas usadas na otimização de fragmentos que podem ser empregadas para obter moléculas com maior potência e/ou seletividade (Yoo *et al.*, 2025). Por fim, as diferentes versões de Mpro serão usadas na triagem e caracterização da atividade inibitória de

outras bibliotecas químicas na tentativa de encontrar novos inibidores de Mpro com potencial farmacológico contra a COVID-19.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizada a purificação da Mpro selvagem expressa na cepa Rosetta 2(DE3) de *Escherichia coli*. Além da versão selvagem, também foram expressas e parcialmente purificadas as variantes mutantes (H172Y, E166N e Q192V) que possuem menor sensibilidade ao nirmatrelvir. A Mpro selvagem pura apresentou um peso molecular semelhante a do vírus (33,8 kDa por protômero), além de demonstrar atividade catalítica sobre o substrato específico para Mpro. Após um ensaio de reversibilidade, foi possível concluir que o fragmento molecular 183, previamente selecionado por inteligência artificial, é um inibidor irreversível da Mpro selvagem. Novos experimentos são necessários para finalizar o processo de purificação das versões mutantes da proteína, assim como para determinar parâmetros cinéticos de inibição de forma melhor caracterizar a ligação entre enzimas e inibidores.

REFERÊNCIAS

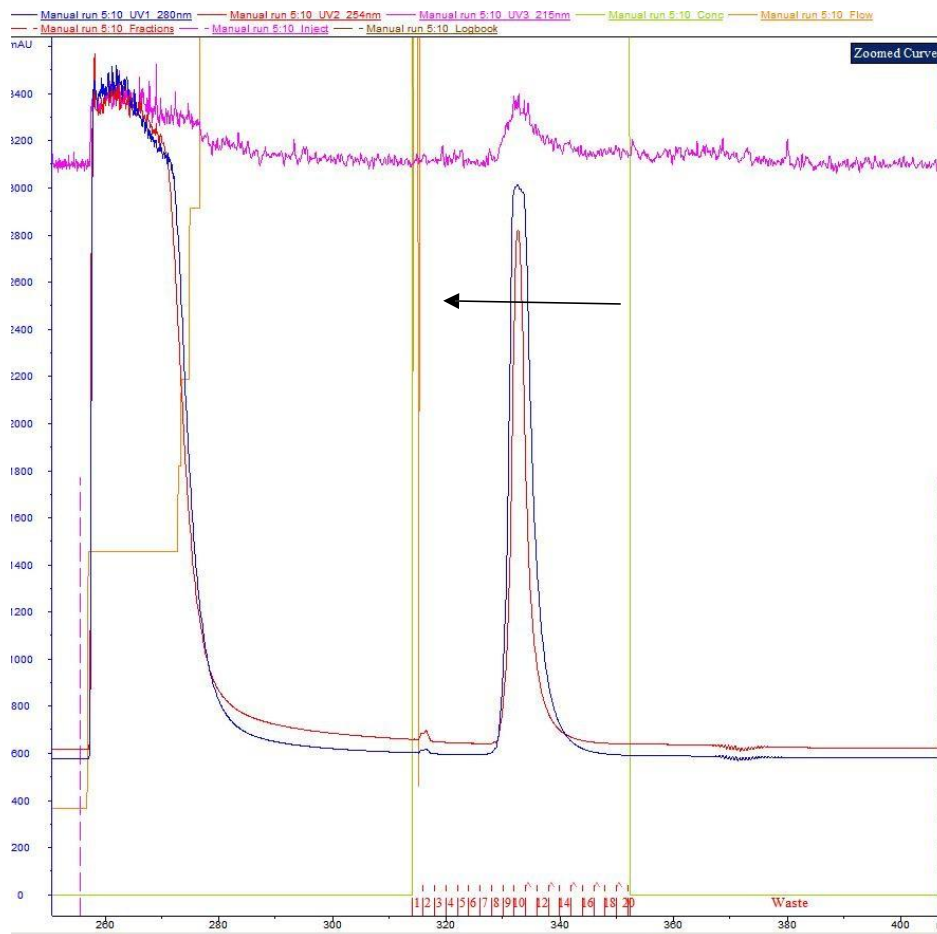
- ALVES, V. M. *et al.* QSAR modeling of SARS-CoV Mpro inhibitors identifies sufugolix, cenicriviroc, proglumetacin, and other drugs as candidates for repurposing against SARS-CoV-2. **Molecular informatics** v. 40, n. 1, p. e2000113, 2021.
- ATATREH, N., MAHGOUB, R. E., GHATTAS, M. A. Exploring covalent inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: from peptidomimetics to novel scaffolds. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 2460045, jan., 2025.
- CARABELLI, A. M. *et al.* SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 162–177, mar., 2023.
- CLYDE, A. *et al.* High-throughput virtual screening and validation of a SARS-CoV-2 main protease noncovalent inhibitor. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 62, n. 1, p. 116–128, jan., 2022.
- CONGREVE, M. *et al.* A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery? **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 19, p. 876–877, out., 2003.
- COPELAND, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 46, p. 1–265, 2005.
- CUCINOTTA, D., VANELLI, M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. **Acta Biomedica**, v. 91, n. 1, p. 157–160, mar., 2020.
- DA COSTA, V. G., MORELI, M. L., SAIVISH, M. V. The emergence of SARS, MERS and novel SARS-2 coronaviruses in the 21st century. **Archives of Virology**, v. 165, n. 7, p. 1517–1526, jul., 2020.
- DE SOUZA NETO, L. R. *et al.* In silico strategies to support fragment-to-lead optimization in drug discovery. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 93, fev., 2020.
- DUAN, Y. *et al.* Molecular mechanisms of SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. **Nature**, v. 622, n. 7982, p. 376–382, set., 2023.
- FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770–1778, out., 2011.
- GANGWAL, A., LAVECCHIA, A. Unleashing the power of generative AI in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 29, p. 103992, jun., 2024.
- HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, mar., 2021.
- ZHU, X. *et al.* The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): structure, function, and emerging therapies for COVID-19. **MedComm**, v. 1, p. e151, set., 2020.
- HU, Y. *et al.* Naturally occurring mutations of SARS-CoV-2 main protease confer drug resistance to nirmatrelvir. **ACS Central Science**, v. 9, p. 1658–1669, ago., 2023.

- HUANG, C. *et al.* A new generation Mpro inhibitor with potent activity against SARS-CoV-2 Omicron variants. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, p. 128, mar., 2023.
- JIA, B.; JEON, C. O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. **Open Biology**, v. 6, n. 8, p. 160196, ago., 2016.
- JIN, Z. *et al.* Structure of Mpro from COVID-19 virus and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 289–293, jun., 2020.
- KIM, S. COVID-19 Drug Development. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 1–5, jan., 2022.
- KNELLER, D. W. *et al.* Covalent narpaprevir- and boceprevir-derived hybrid inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 2268, abr., 2022.
- LESSARD, J. C. Molecular cloning. **Methods in Enzymology**, v. 529, p. 89–98, 2013.
- LONG, B. *et al.* Clinical update on COVID-19 for the emergency clinician: Presentation and evaluation. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 54, p. 46–57, abr., 2022.
- MENG, E. C. *et al.* UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. **Protein Science**, v. 32, n. 11, p. e4792, nov., 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. COVID19 – Painel Coronavírus. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 29 maio. 2025.
- MISTRY, P. *et al.* SARS-CoV-2 variants, vaccines, and host immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 809244, jan., 2022.
- NAJJAR-DEBBINY, R. *et al.* Effectiveness of Paxlovid in reducing severe coronavirus disease 2019 and mortality in high-risk patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 76, n. 3, e342, jul., 2022.
- NAQVI, A. A. T. *et al.* Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165878, out., 2020.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Coronavirus disease (COVID-19). Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-(covid-19)). Acesso em: 9 ago. 2024.
- OUR WORLD IN DATA. Cumulative COVID-19 vaccinations. Our World in Data, 2024. Disponível em: https://ourworldindata.org/grapher/cumulative-covid-vaccinations?country=BGD~BRA~CHN~IND~IDN~MEX~NGA~PAK~RUS~USA~OWID_WRL. Acesso em: 25 maio 2025.
- PFIZER LABORATORIES. Fact sheet for healthcare providers: Emergency use authorization for Paxlovid, 2022. Disponível em: <https://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=16474>. Acesso em: 25 maio 2025.
- QUAN, B.-X. *et al.* An orally available Mpro inhibitor is effective against wild-type SARS-CoV-2 and variants including Omicron. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 716–725, May 2022.

- SANTANA, M. V. S.; SILVA-JR, F. P. De novo design and bioactivity prediction of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using recurrent neural network-based transfer learning. **BMC Chemistry**, v. 15, p. 8, 2021.
- SARAMAGO, L. C. *et al.* AI-driven discovery of SARS-CoV-2 main protease fragment-like inhibitors with antiviral activity in vitro. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 9, p. 2866–2880, set. 2023.
- SENGER, M. R. *et al.* COVID-19: molecular targets, drug repurposing and new avenues for drug discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 115, e200254, 2020.
- SHAWKY, A. M. *et al.* Covalent small-molecule inhibitors of SARS-CoV-2 Mpro: Insights into their design, classification, biological activity, and binding interactions. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 277, p. 116704, nov. 2024.
- SONG, L. *et al.* Medicinal chemistry strategies towards the development of non-covalent SARS-CoV-2 Mpro inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 14, n. 1, p. 87–109, jan. 2024.
- SUN, J. *et al.* A novel, covalent broad-spectrum inhibitor targeting human coronavirus Mpro. **Nature Communications**, v. 16, art. 4546, 15 maio 2025.
- TELI, D. M.; PATEL, B.; CHHABRIA, M. T. Fragment-based design of SARS-CoV-2 Mpro inhibitors. **Structural Chemistry**, v. 33, p. 2155–2168, ago. 2022.
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA News Release - Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Oral Antiviral for Treatment of COVID-19. 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19>. Acesso em: 24 jun. 2025.
- YANG, H.; RAO, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 685–700, set. 2021.
- YANG, Y. *et al.* Progress in research on inhibitors targeting SARS-CoV-2 main protease (Mpro). **ACS Omega**, v. 9, n. 32, p. 34196–34219, ago. 2024.
- YOO, J.; JANG, W.; SHIN, W.-H. From part to whole: AI-driven progress in fragment-based drug discovery. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 91, p. 102995, fev. 2025.
- ZAGÓRSKA, A. *et al.* Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) as Anti-Coronavirus Agents. **Biomolecules**, v. 14, n. 7, art. 797, jul. 2024.
- ZHANG, L. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. **Science**, v. 368, n. 6489, p. 409–412, 20 mar. 2020.

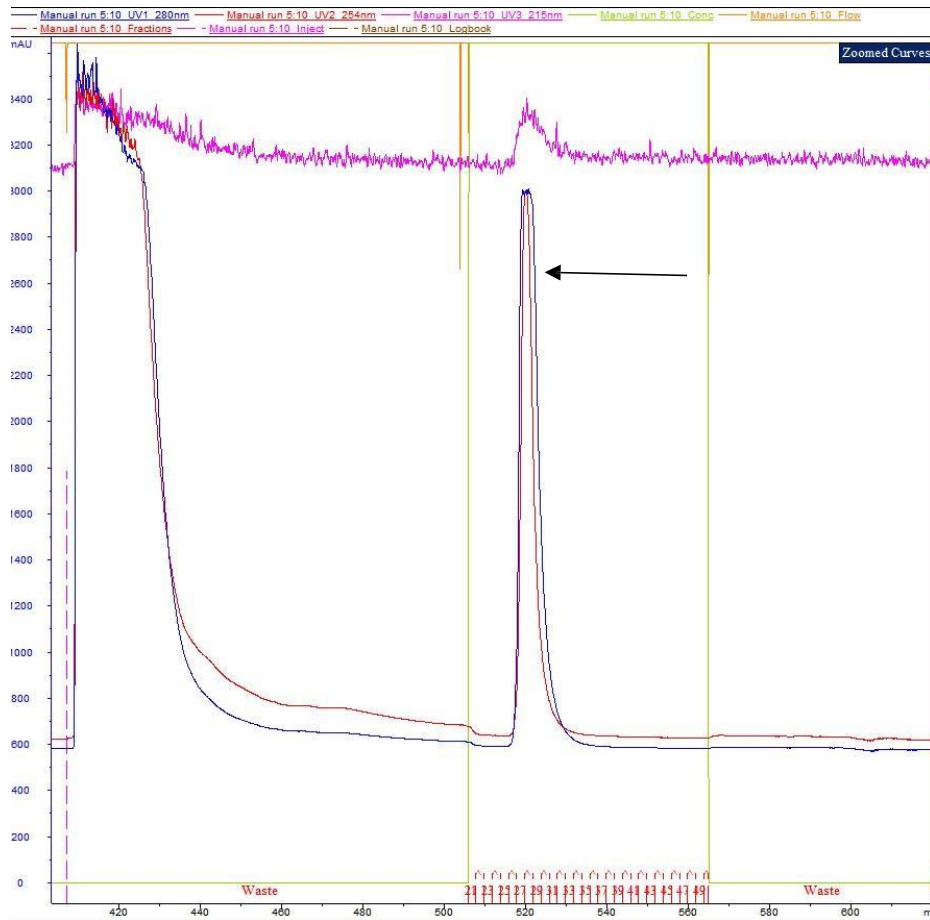
ANEXO

Figura A1 – Cromatograma gerado após cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados com a Mpro Q192V



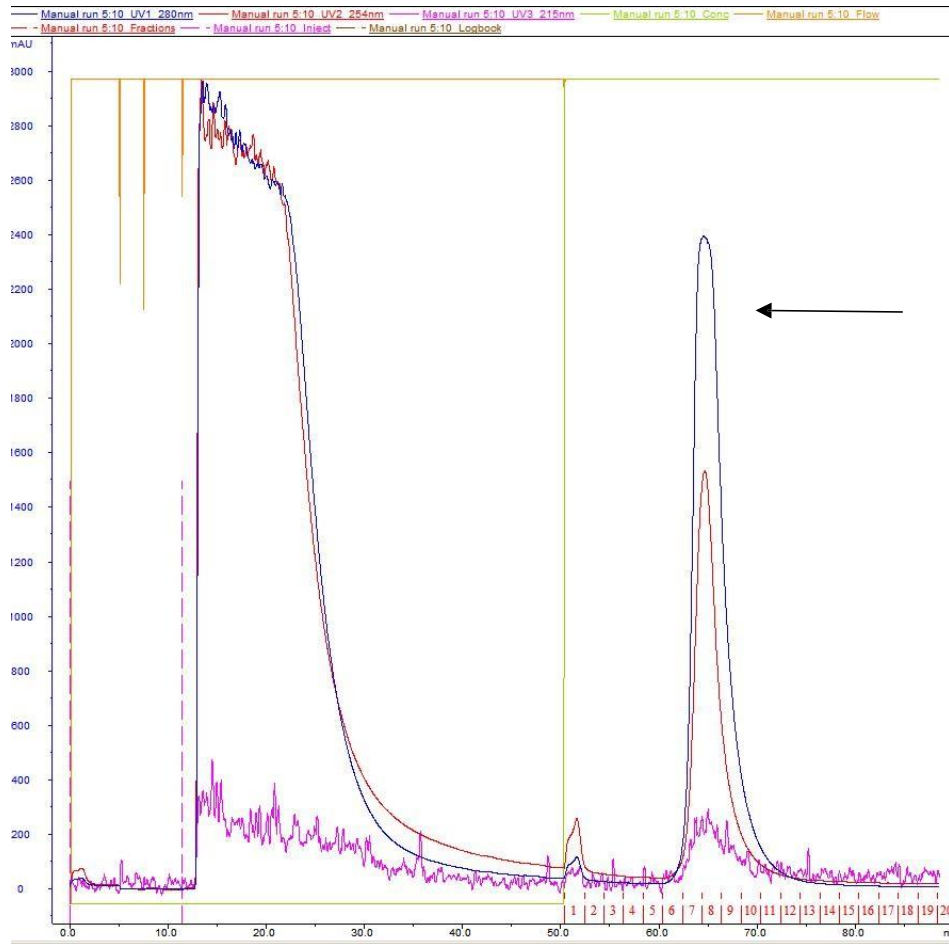
As linhas azul, vermelha e rosa representam respectivamente a absorvância em 280, 254 e 215 nm. A linha verde representa o imidazol (500 mM) aplicado. A linha tracejada rosa representa o momento de injeção da amostra. A seta preta representa o pico de absorvância a 280 nm após a eluição da coluna com o imidazol.

Figura A2 - Cromatograma gerado após cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados com a Mpro E166N



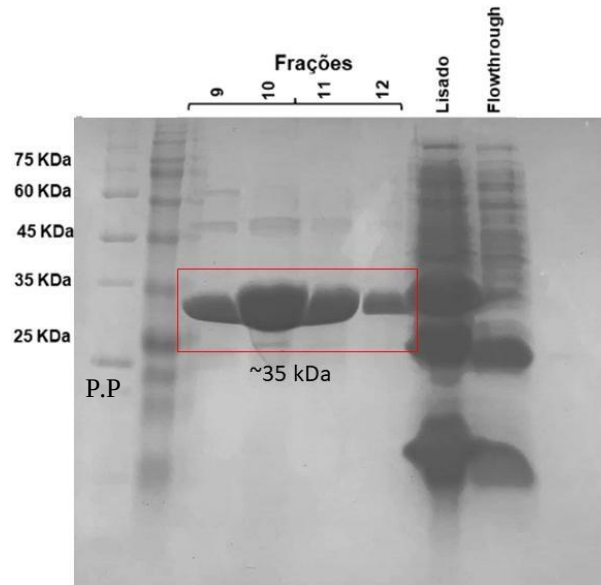
As linhas azul, vermelha e rosa representam respectivamente a absorbância em 280, 254 e 215 nm. A linha verde representa o imidazol (500 mM) aplicado. A linha tracejada rosa representa o momento de injeção da amostra. A seta preta representa o pico de absorbância a 280 nm após a eluição da coluna com o imidazol.

Figura A3 - Cromatograma gerado após cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados com a Mpro H172Y.



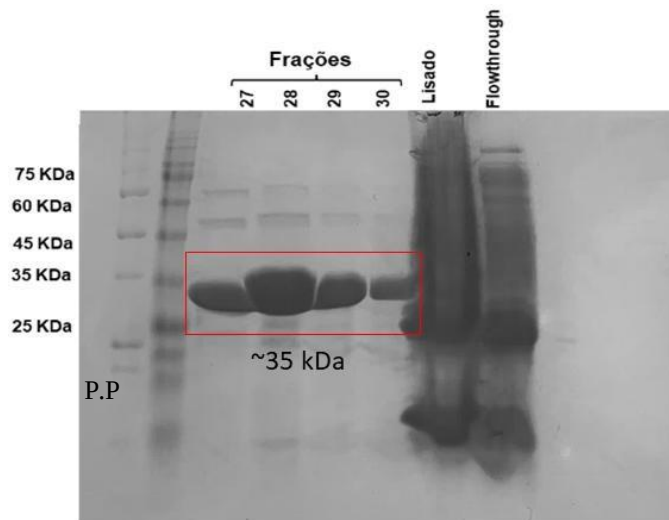
As linhas azul, vermelha e rosa representam respectivamente a absorbância em 280, 254 e 215 nm. A linha verde representa o imidazol (500 mM) aplicado. A linha tracejada rosa representa o momento de injeção da amostra. A seta preta representa o pico de absorbância a 280 nm após a eluição da coluna com o imidazol.

Figura A4 – Eletroforese em gel (SDS-PAGE) das frações 9-12 da Mpro Q192V coletadas após cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados



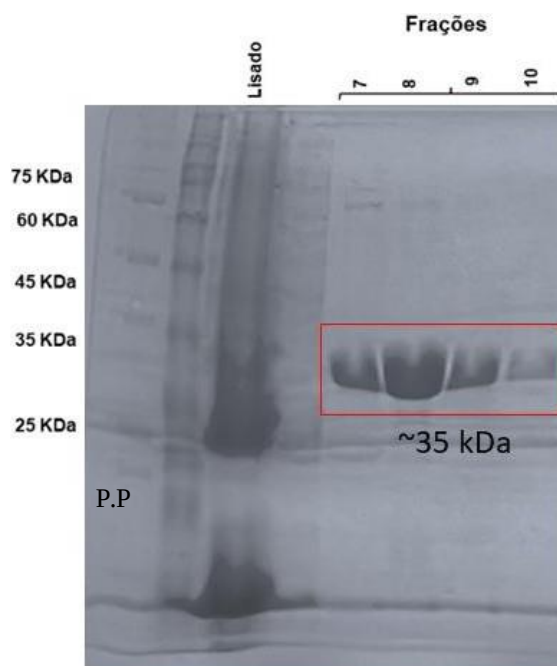
As bandas do padrão de peso molecular (P.P) estão representadas em kDa a esquerda da imagem.

Figura A5 – Eletroforese em gel (SDS-PAGE) das frações 27-30 da Mpro E166N coletadas após cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados.



As bandas do padrão de peso molecular (P.P) estão representadas em kDa a esquerda da imagem.

Figura A6— Eletroforese em gel (SDS-PAGE) das frações 7-10 da Mpro H172Y coletadas após cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados



As bandas do padrão de peso molecular (P.P) estão representadas em kDa a esquerda da imagem.