

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JOÃO RICARDO BUENO DE MORAIS BORBA

**BIOISOSTERISMO APLICADO PARA EXECUÇÃO DE ANCORAGEM
MOLECULAR CONTRA ALVOS ESSENCIAIS DO SARS-COV-2**

ALFENAS/MG

2023

JOÃO RICARDO BUENO DE MORAIS BORBA

**BIOISOSTERISMO APLICADO PARA EXECUÇÃO DE ANCORAGEM
MOLECULAR CONTRA ALVOS ESSENCIAIS DO SARS-COV-2**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química pelo programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Paranho Veloso

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Borba, João Ricardo Bueno de Moraes.

Bioisosterismo aplicado para execução de ancoragem molecular contra alvos essenciais do SARS-COV-2 / João Ricardo Bueno de Moraes Borba. - Alfenas, MG, 2023.

209 f. : il. -

Orientador(a): Nelson José Freitas da Silveira.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Ancoragem Molecular. 2. Bioisosterismo. 3. Cisteíno Proteases. 4. SARS-CoV-2. I. Silveira, Nelson José Freitas da, orient. II. Título.

JOÃO RICARDO BUENO DE MORAIS BORBA

**“BIOISOSTERISMO APLICADO PARA EXECUÇÃO DE ANCORAGEM MOLECULAR CONTRA ALVOS
ESSENCIAIS DO SARS-COV-2”**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química

Aprovado em: 11 de julho de 2023.

Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Fernanda Canduri
Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Junior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Nelson José Freitas da Silveira, Professor do Magistério Superior**, em 11/07/2023, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1033477** e o código CRC **5CC466E6**.

À minha grande mãe, uma fênix que jamais se prostrou em seus 71 anos de vida e continua superando todas as dificuldades que aparecem em seu caminho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua bondade incomensurável para comigo, tendo me abençoado com saúde, resiliência e foco, permitindo, assim, que eu concluísse este desafio.

A Jesus Cristo pelos exemplos inigualáveis de propósito, devoção e concretização de um desígnio.

À minha fortaleza e incomparável mãe, Maria Aparecida Trombeta, pelo amor incondicional, bem como pelo apoio e pela dedicação incansáveis enquanto eu caminhava rumo à concretização deste objetivo.

À minha irmã Adryana Bueno de Moraes Borba por ser uma das minhas maiores referências de determinação, e, sobretudo, por ter acreditado mais no meu potencial do que eu mesmo, contribuindo, assim, significativamente para a obtenção desta vitória, que é nossa!

Aos meus falecidos pai, Itamar de Moraes Borba, e avós paternos, João Borba Gouveia e Zilda Pereira de Moraes Gouveia, por deixarem o legado de que o conhecimento como resultado da educação é a mais nobre riqueza terrena que um ser humano pode adquirir.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Marcia Paranho Veloso, pela profissional extraordinária que ela é, assim como pelo suporte imprescindível, tanto na fase em que a ideia a ser trabalhada ainda não havia sido concebida, quanto em momentos importantes do processo de execução da pesquisa, mediante apontamentos cruciais no âmbito da ciência Química.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira, pela solicitude prestada e pela confiança investida em mim no decorrer do desenvolvimento deste trabalho científico.

Aos professores doutores Fernanda Canduri, Nelson Henrique Teixeira Lemes e Walter Filgueira de Azevedo Junior por todos os apontamentos e sugestões cruciformes para que esta dissertação atingisse o nível atual de excelência.

Ao brilhante Leonardo Pereira de Araújo por compartilhar comigo os essenciais conhecimento e experiência prévios por ele adquiridos com os softwares AutoDockTools, AutoDock Vina e Pymol, bem como com linhas de comando dos sistemas operacionais Windows e Linux.

Ao meu irmão Alexandre Bueno de Moraes Borba, assim como aos amigos e amigas, pela compreensão sempre que precisei me ausentar e por me encorajarem continuamente a prosseguir rumo ao alcance deste título.

À profissional Célia Crystina Rezende Silva pelo crucífero suporte psicológico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Financiamento 01. Obrigado pela bolsa concedida.

“Nesta metáfora, na verdade, temos uma imagem do universo computacional; uma metáfora que espero tornar cientificamente precisa como parte de um programa de pesquisa.”¹

RESUMO

As cisteíno proteases do SARS-CoV-2, nomeadamente protease principal (M^{pro}) e papaína (PL^{pro}), são proteínas não-estruturais essenciais devido ao papel que elas possuem na formação do complexo múltiplo enzimático de replicação-transcrição deste microrganismo. Por esse motivo, estas enzimas são alvos extremamente relevantes no âmbito do desenvolvimento de um novo candidato a fármaco que atue no combate à COVID-19. Neste sentido, até o presente momento, o nirmatrelvir é o único fármaco que atua como inibidor covalente de M^{pro} aprovado por agências reguladoras ao redor do mundo para uso emergencial. Além dele, um segundo fármaco que atua como inibidor não covalente de M^{pro}, nomeadamente ensitrelvir, foi aprovado para uso emergencial em solos japoneses. Entretanto, uma recente pesquisa publicada por Iketani e colaboradores no início de novembro de 2022, defende que o SARS-CoV-2 pode já ter adquirido resistência tanto ao nirmatrelvir quanto ao ensitrelvir através de várias vias evidenciadas mediante estudos *in vitro*. Isto posto, pautado pela estratégia do bioisosterismo, o presente trabalho selecionou 126 de um total de 1050 ligantes do banco de dados do DrugBank. Os ligantes escolhidos foram fármacos tanto já aprovados por agências reguladoras quanto em fase de investigações clínicas. Em seguida, 831 derivados por bioisosterismo, alguns dos quais tiveram suas estruturas simplificadas, foram concebidos utilizando-se o software MB-Isoster. Ademais, com base em resultados de IC₅₀ obtidos a partir de experimentos *in vitro* de outros pesquisadores, tanto para a M^{pro} quanto para a PL^{pro}, 2 ligantes-controle pertencentes à subclasse de inibidores não covalentes foram escolhidos para cada alvo. Estados de ionização em pH 7,4 foram considerados para todas as moléculas, assim como para as enzimas, e, a seguir, estudos de ancoragem molecular foram conduzidos mediante uso do software AutoDock Vina. Os resultados dos derivados mais promissores, assim como dos seus precursores e dos ligantes-controle, foram analisados utilizando-se os softwares Pymol e Discovery Studio. Por fim, um estudo das propriedades físico-químicas, bem como de aspectos de drogabilidade, tais como alertas estruturais e acessibilidade sintética, e de ADMET, foram efetuados através das plataformas SwissADME e ADMETlab 2.0. Os resultados promissores obtidos com as moléculas DB00549_BI_005, DB04868_BI_003, DB11984_BI_002, DB12364_BI_006 e DB12805_BI_004 devem ser ratificados por estudos de dinâmica molecular, seguidos de ensaios empíricos *in vitro* e *in vivo* que ratifiquem os resultados defendidos *in silico*.

Palavras-chave: ancoragem molecular; bioisosterismo; cisteíno proteases; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

SARS-CoV-2 cysteine proteases, namely main protease (M^{pro}) and papain-like protease (PL^{pro}) are essential non-structural proteins due to their role in the formation of the virus multiple enzymatic replication-transcription complex (RTC). As a result, these functional proteins are extremely relevant targets in the development of a new drug candidate to fight COVID-19. In this sense, to date, nirmatrelvir is the only drug acting as a covalent M^{pro} inhibitor that has been approved by regulatory agencies around the world for emergency use. In addition, a novel drug, acting as a non-covalent M^{pro} inhibitor, namely ensitrelvir, has been approved only in Japan for emergency use. However, a recent paper published by Iketani and collaborators in early November 2022 argues that SARS-CoV-2 might have already acquired resistance to nirmaltrevir and ensitrelvir via several pathways evinced through in vitro studies. Based on this fact and guided by the bioisosterism strategy, the present work has selected 126 out of 1050 ligands, including both approved and investigational drugs, from DrugBank website. Subsequently, 831 chemical analogs containing bioisosteres, some of which became structurally simplified, were created using the MB-Isoster software. Also, based on IC_{50} results generated from in vitro experiments of other researchers, 2 control ligands belonging to the subclass of non-covalent inhibitors were chosen for both M^{pro} and PL^{pro} . Ionization states at pH 7.4 of all molecules as well as of both enzymes were then applied, and molecular docking simulations were performed using AutoDock Vina. The results of the most promising analogs, as well as of their precursors and control ligands, were analyzed using the Pymol and Discovery Studio programs. Finally, a study of their physicochemical properties, along with aspects of druggability, such as structural alerts and synthetic accessibility, and ADMET profiles were carried out through SwissADME and ADMETlab 2.0 platforms. The promising results obtained with the molecules encoded as DB00549_BI_005, DB04868_BI_003, DB11984_BI_002, DB12364_BI_006 and DB12805_BI_004 must be confirmed by molecular dynamics studies, followed by in vitro and in vivo empirical tests that ratify the advocated in-silico results.

Keywords: bioisosterism; cysteine proteases; molecular docking; SARS-CoV-2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>Adenosine-triphosphate-Binding Cassette</i> (Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP)
ACE2/ECA2	<i>Angiotensin-Converting Enzyme 2</i> /Enzima Conversora de Angiotensina II
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ADT	AutoDockTools
AD4	AutoDock 4
Ala/A	Alanina
AMBER	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária (agência reguladora brasileira de medicamentos, alimentos e outros produtos)
Arg/R	Arginina
Asn/N	Asparagina
Asp/D	Aspartato/Ácido aspártico
ATP	<i>Adenosine TriPhosphate</i> (Adenosina Trifosfato)
BFGS	<i>Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno</i>
BBB/BHE	<i>Blood-Brain Barrier</i> /Barreira HematoEncefálica
Br	Bromo
CADD	<i>Computer-Aided Drug Design</i> (Desenvolvimento de Fármacos Assistido por Métodos Computacionais)
CatB/L	Catepsinas B e L
CDC	<i>Centers for Disease Control and prevention</i> (Centros de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos da América)
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i>
CH ₃	Radical Metila
Cl	Cloro
Cryo-EM	<i>Cryogenic Electron Microscopy</i> (Microscopia Eletrônica Criogênica)
Cys/C111	Cisteína 111
C=O	Radical Carbonila
D/ ² H	Hidrogênio Deutério
Da	Daltons
deriv	<i>derivative</i> (derivado)
DILI	<i>Drug-Induced Liver Injury</i> (dano ao fígado causado por um medicamento)

DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ED ₅₀	<i>Median Effective Dose</i> (Dose Efetiva média)
ExoN	Exoribonuclease
F	Flúor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos da América)
Fe	Ferro
Fu	<i>Fraction Unbound in plasms</i> (Fração livre no plasma)
GA	<i>Genetic Algorithm</i> (Algoritmo Genético)
Gln/Q	Glutamina
Glu/E	Glutamato/Ácido glutâmico
Gly/G	Glicina
hERG	<i>human Ether-a-go-go-Related Gene</i>
H ¹ H	Hidrogênio monotérico
His/H272	Histidina 272
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IC ₅₀	<i>Half maximal Inhibitory Concentration</i> (Concentração Inibitória Média)
Ile/I	Isoleucina
ILS	<i>Iterated Local Search</i>
INFs	Interferons
ISG15	Produto do gene 15 estimulado por INFs do tipo I
kbs	kilobases
kDa	kilodaltons
LD ₅₀	<i>Median Lethal Dose</i> (Dose Letal média)
Leu/L	Leucina
Lys/K	Lisina
MARV	<i>MARburg Virus</i> (Vírus de Marburgo)
MC	Monte Carlo
MD/DM	<i>Molecular Dynamics</i> /Dinâmica Molecular
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney cells</i>
Met/M	Metionina
MHRA	<i>Medicines and Healthcare products Regulatory Agency</i> (Agência Reguladora de Medicamentos e de produtos para a Saúde do Reino Unido)

MM	<i>Molecular Mechanics</i> (Mecânica Molecular)
MP	Membrana Plasmática
N	Nitrogênio
NA	Não se Aplica
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate in a reduced form</i> (Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido)
NendoU	Nsp15 endoribonUclease
NH	Radical Amina secundária
NH ₂	Radical Amina primária
nM	nanomolares (nanomoles por litro)
Nsp	<i>Non-structural protein</i> (proteína não-estrutural)
O	Oxigênio
OH	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	<i>Open-Reading Frames</i> (Fases de Leitura Aberta)
O=S=O	Radical Sulfona
PANGOLIN	<i>Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak LINEages</i> (Atribuição Filogenética de Linhagens de Surtos Globais Nomeados)
pH	<i>Potential Hydrogen</i> (potencial Hidrogeniônico)
Phe/F	Fenilalanina
PMDA	<i>Pharmaceuticals and Medical Devices Agency</i> (Agência Reguladora de Produtos Farmacêuticos e Dispositivos Médicos do Japão)
Pro/P	Prolina
PPB	<i>Plasma Protein Binding</i> (Ligação às Proteínas Plasmáticas)
pp1a	<i>polyprotein 1a</i> (poliproteína 1a)
pp1ab	<i>polyprotein 1ab</i> (poliproteína 1ab)
QM	<i>Quantum Mechanics</i> (Mecânica Quântica)
R	Radical químico variado
RAAS/SRAA	<i>Renin-Angiotensin-Aldosterone System/Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona</i>
RBD	<i>Receptor Binding Domain</i> (Domínio de Ligação do Receptor)
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> (Raiz do Desvio Médio Quadrático)
RTC	<i>Replication and Transcription Complex/Replicase-Transcriptase Complex</i> (Complexo múltiplo enzimático de Replicação-Transcrição)

S	Enxofre
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
Se	Selênio
Ser/S	Serina
SI	<i>Swarm Intelligence</i>
Si	Silício
SMILES	<i>Simplified Molecular-Input Line-Entry System</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
Thr/T	Treonina
TMPRSS2	<i>TransMembrane PRoteaSe, Serine 2</i> (Serinoprotease Transmembrana II Humana)
TPSA/PSA	<i>Topological Polar Surface Area/Polar Surface Area</i> (Área de Superfície Polar Topológica/Área de Superfície Polar)
Trp/W	Triptofano
Tyr/Y	Tirosina
Ub	Ubiquitina
Ubl	<i>Ubiquitin-like</i> (proteína do tipo ubiquitina)
UGT	UDP-GlicuronilTransferase
Val/V	Valina
VD	Volume de Distribuição
VOC	<i>Variants Of Concern</i> (Variantes de Preocupação)
VOI	<i>Variants Of Interest</i> (Variantes de Interesse)
X	Número que varia de 1 a 10
Zn ²⁺	Íon Zinco
2D	Bidimensional(is)
3D	Tridimensional(is)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
\AA	Angstrom
β	Beta
Δ	Delta
(*)	Dois valores iguais
γ	Gamma
\geq	Maior ou igual a
$>$	Maior que
\leq	Menor ou igual a
$<$	Menor que
π	Número Pi
Σ	Soma
®	<i>Trademark</i> (Marca registrada)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	ASPECTOS VIROLÓGICO, MOLECULAR E PATOGÊNICO DA COVID-19.....	17
2.1.1	Cisteíno proteases do SARS-CoV-2.....	24
2.2	EPIDEMIOLOGIA, FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA DA COVID-19	28
2.3	PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS.....	32
2.3.1	Química Farmacêutica/Medicinal e modelagem molecular	32
2.3.2	<i>Docking</i> e AutoDock Vina	35
2.3.3	Bioisosterismo	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	183
	REFERÊNCIAS.....	184
	APÊNDICE	197

1 INTRODUÇÃO

Em 2003, ocorreu o primeiro surto de síndrome respiratória aguda grave associada a um coronavírus (SARS-CoV), tendo o primeiro caso de infecção sido reportado na China. Em 2012, um segundo surto epidêmico de síndrome respiratória associada a um coronavírus assolou o Oriente Médio (MERS-CoV). Porém, foi em dezembro de 2019 que, pela primeira vez na história, um novo coronavírus (SARS-CoV-2), identificado na cidade de Wuhan, pertencente à província chinesa de Hubei, atingiria proporções pandêmicas no dia 11 de março de 2020, segundo um comunicado oficial da OMS.² A doença causada por este agente etiológico foi intitulada *Coronavirus Disease 2019* ou simplesmente COVID-19. De acordo com a OMS, no ato da redação deste texto, o número total de vítimas fatais acometidas pela COVID-19 já ultrapassara 6,6 milhões de pessoas distribuídas pelos cinco continentes do globo.³

Por um lado, já foram desenvolvidas vacinas que se mostraram seguras e eficazes tanto na prevenção à doença quanto na diminuição do agravamento do quadro infeccioso. Por outro lado, existem pessoas que se recusam a receber o imunizante.^{4,5} Além disso, já foi constatado, em meados de 2021, que a eficácia das vacinas diminuiu com o passar do tempo, e que variantes do SARS-CoV-2 apresentam certa resistência ao sistema imunológico de indivíduos completamente vacinados, conforme apontado por pesquisadores.^{6,7} Por esse motivo, tem havido um interesse crescente pela busca de novos potenciais agentes farmacológicos que combatam a COVID-19.²

Na esfera do descobrimento de potenciais candidatos a fármacos, o bioisosterismo é uma das estratégias da Química Medicinal que envolve modificações estruturais por substituição de grupamentos químicos. O sucesso do bioisosterismo foi evidente em diversas classes terapêuticas de fármacos nas décadas de 80 e 90, conforme elucidado pelos pesquisadores Patani e LaVoie em 1996 e reforçado no início do século XXI pelos pesquisadores Lídia Lima e Eliezer J. Barreiro.^{8,9} Neste período, foram descobertas não somente substâncias análogas (“*me-too*”) de fármacos cujas terapias inovadoras eram atrativas comercialmente, mas também moléculas com mecanismos de ação diferentes dos expressos pelos fármacos originais, utilizados como arcabouços moleculares.⁹

A modelagem de uma estrutura molecular utilizando métodos computacionais é uma excelente alternativa para a determinação de interações químicas entre potenciais candidatos a fármacos e receptores ou proteínas-alvo, especialmente após o desenvolvimento de softwares capazes de efetuar cálculos e simulações mediante um compromisso adequado entre precisão e velocidade. Além disso, a modelagem molecular é atrativa tanto pelos recursos da computação

gráfica quanto pela “crescente diminuição dos custos de máquinas de alto desempenho capazes de operar” softwares e recursos.^{10,11} Atualmente, os sistemas de modelagem molecular estão munidos de poderosas ferramentas para construção, visualização e análise de sistemas moleculares complexos, auxiliando, assim, na interpretação das relações entre a estrutura e a atividade biológica.^{10,12,13} Neste contexto, o *docking* ou ancoragem molecular é uma das ferramentas mais utilizadas no mundo moderno para a descoberta de novos fármacos.

Pelo exposto, com a tecnologia que a Química computacional proporciona à realidade moderna, fica notório o quanto é oportuno utilizar os resultados obtidos por bioisosterismo aplicado a estudos de *docking* para um subsequente desenho racional, menos dispendioso e mais sustentável de novos protótipos a fármacos anti-SARS-CoV-2, capazes de atuar favoravelmente contra as consequências tissulares provocadas pela COVID-19.

No âmbito de uma linha de pesquisa em Bioinformática Estrutural que visa à aplicação de estratégias de Química Farmacêutica/Medicinal para melhoria de propriedades físico-químicas que influenciam diretamente na relação estrutura-atividade de candidatos a fármacos, o trabalho científico em pauta teve como objetivo principal o uso da estratégia de bioisosterismo para a realização de estudos computacionais de ancoragem molecular contra as biomacromoléculas M^{pro} e PL^{pro} do SARS-CoV-2. Na análise dos resultados, as interações intermoleculares do complexo proteína-ligante formado *in silico* foram consideradas, assim como os valores de energia de afinidade/*score* calculados pelo software escolhido. Ademais, as propriedades físico-químicas foram determinadas, bem como aspectos de drogabilidade e parâmetros farmacocinéticos de ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) dos candidatos a fármacos que se mostraram mais promissores.

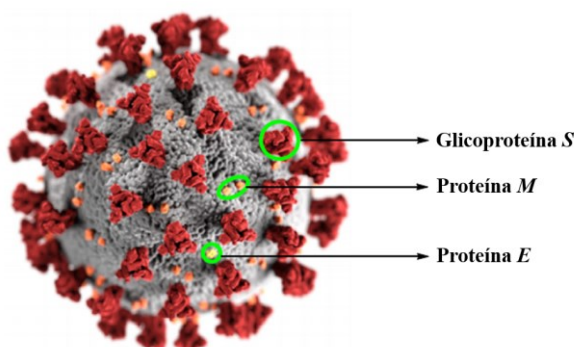
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS VIROLÓGICO, MOLECULAR E PATOGÊNICO DA COVID-19

SARS-CoV-2, pertencente ao gênero *Betacoronavirus* da família Coronaviridae, é um vírus da classe IV proposta por David Baltimore, o qual se baseou no tipo de genoma e na estratégia de replicação dos vírus para classificá-los.^{14,15} Em outras palavras, o novo coronavírus é um microrganismo de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples de sentido positivo, isto é, que se traduz diretamente em proteínas. Seu RNA está envolvido por cerca de 30 a 35 ribonucleoproteínas e possui uma similaridade genética de aproximadamente 79% com o RNA do SARS-CoV e de 40-50% com o RNA do MERS-CoV, tendo sido ainda associado a uma similaridade genética de aproximadamente 88% com os RNAs de coronavírus presentes em duas espécies de morcegos, o SL-CoVZC₄₅ e o SL-CoVZXC₂₁, prováveis origens zoonóticas do SARS-CoV-2.^{14,16} O tamanho do RNA das diferentes espécies de coronavírus é de aproximadamente 30 kbs, fato que caracteriza estes microrganismos como os maiores vírus de RNA já identificados por cientistas.¹⁷

O novo coronavírus tem o formato esférico e a aparência de coroa muito mais próxima do HIV do que do vírus da gripe (Influenza) devido à quantidade 10 vezes maior, quando comparada à do Influenza, de glicoproteínas espiculares (*spike* ou *S*), que formam trímeros (proteínas de 3 cadeias polipeptídicas) no seu envelope. Este envelope é composto por outras duas proteínas estruturais; são elas: proteínas de membrana (*M*) e proteínas do envelope (*E*). O interior do vírus contém ainda proteínas nucleocapsídicas (*N*), que não estão visíveis na Figura 1, adaptada do trabalho de Mishra *et al.* (2021).^{14,18,19,20}

Figura 1 – Estrutura do SARS-CoV-2



Fonte: MISHRA *et al.* (2021).

Assim como os demais vírus da família Coronaviridae, o material genético do SARS-CoV-2 codifica, dentro da célula hospedeira, proteínas que atuam como enzimas essenciais, dentre as quais destacam-se a cisteína protease do tipo quimiotripsina, ou simplesmente M^{pro}, também denominada protease principal ou 3CL^{pro} ou ainda Nsp5 (EC 3.4.22.69), e a cisteína protease do tipo papaína, ou simplesmente PL^{pro}, a qual representa um dos domínios da proteína Nsp3 (EC 3.4.22.46), e, finalmente, a RNA polimerase dependente de RNA, também conhecida como Replicase de RNA ou simplesmente RdRp ou ainda Nsp12 (EC 2.7.7.48).^{17,18,19,21,22,23}

Quando o mecanismo de infecção do novo coronavírus ainda não tinha sido estudado, alguns pesquisadores chegaram a cogitar a possibilidade de que este microrganismo pudesse adentrar a célula hospedeira por fusão direta à membrana plasmática (MP). No entanto, esta teoria foi posteriormente refutada por estudiosos que descreveram o modo de infecção do coronavírus como sendo mediado pela formação de endossomas via interação de proteínas estruturais do vírus com receptores de superfície da MP da célula hospedeira.²⁴ Após adentrar as vias aéreas, boca e/ou olhos de pessoas desprotegidas, as glicoproteínas *spike* do SARS-CoV-2, tal qual seu antepassado SARS-CoV, interagem com receptores transmembrana denominados enzimas conversoras de angiotensina II (ECA2/ACE2 – EC 3.4.17.23).²⁵ Imagens de microscopia eletrônica criogênica (Cryo-EM) sugerem que ACE2 é um receptor enzimático homodimérico (composto por duas cadeias polipeptídicas provenientes do mesmo gene), que se liga a até duas glicoproteínas *spike*.¹⁶

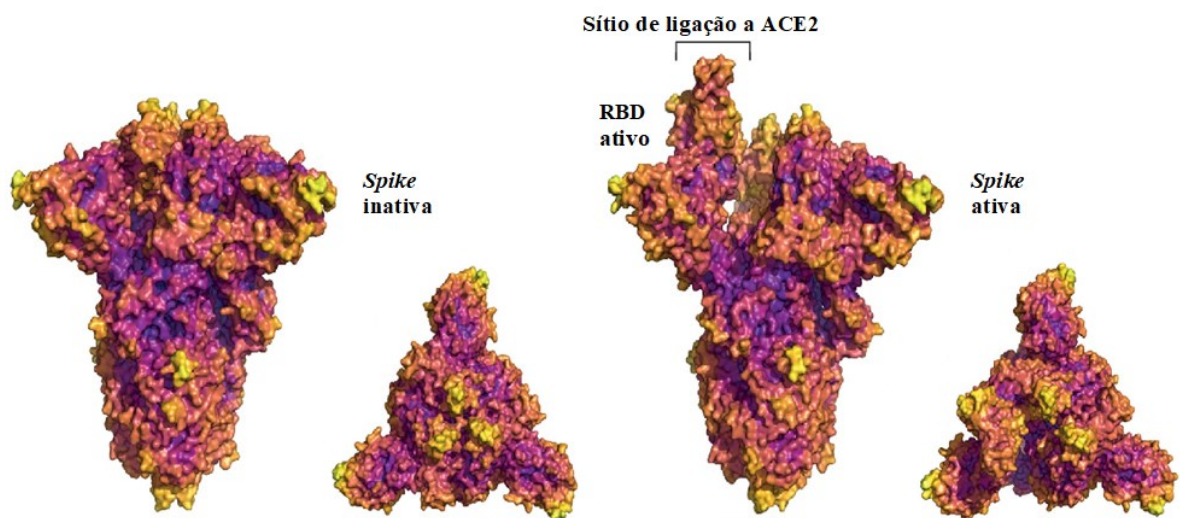
Estas proteínas estruturais são polipeptídios triméricos compostos por duas subunidades. A primeira delas (S1) contém o domínio de ligação do receptor (RBD). A segunda subunidade (S2), por sua vez, possibilita o processo de fusão à MP e subsequente entrada do vírus na célula do indivíduo.¹⁴ As glicoproteínas *spike* do SARS-CoV e do novo coronavírus compartilham uma similaridade global de 76% entre suas sequências de aminoácidos; entretanto, os subdomínios externos delas são apenas 40% homólogos entre si.^{14,26} A observância de mutações reportadas em sequenciamentos destas biomacromoléculas de linhagens do SARS-CoV-2 explica esta diferença, visto que elas geram uma maior afinidade do RBD da *spike* deste microrganismo pelo receptor da célula hospedeira, quando comparado ao RBD da *spike* do SARS-CoV.¹⁶

Sob a vertente de uma linha de pesquisa, para que a interação *spike*-ACE2 aconteça, é necessário que ocorra uma clivagem proteolítica ácida-dependente da subunidade S1 da glicoproteína *spike* a fim de que haja exposição de seu RBD, o qual se liga ao receptor ACE2, formando um complexo. Este processo de ativação da subunidade S1 é mediado principalmente pela serinoprotease transmembrana II humana (TMPRSS2 – EC 3.4.21.122).^{16,27,28}

Recentemente, proteases do tipo furina e serinoproteases do tipo tripsina também foram associadas ao processo de ativação supracitado.^{29,30,31} Ademais, foi reportado que a entrada do vírus na célula hospedeira é dependente ainda de proteases endossomais de cisteína (CatB/L – EC 3.4.22.1/ EC 3.4.33.43), embora a atividade destas enzimas seja, provavelmente, menos essencial.^{16,28,29,32,33} A seguir, a TMPRSS2 entra em ação para ocasionar uma clivagem da subunidade *S2* da glicoproteína *spike*, possibilitando, assim, a fusão da membrana viral à MP da célula hospedeira, e permitindo, por consequência, que ocorra o processo de endocitose.^{28,30,34}

Sob uma diferente perspectiva baseada em estudos de Cryo-EM, outros pesquisadores defendem que a glicoproteína *spike* é tão sensível ao receptor ACE2 que este induz transições conformacionais espontâneas nela.²⁶ Segundo Xu *et al.* (2021), o receptor ACE2 incita uma dinâmica no cenário conformacional desta proteína mediante promoção de uma mudança de conformação na subunidade *S1*, de maneira que o RBD do SARS-CoV-2 é ativado, passando da conformação “down” para “up”, conforme observado na Figura 2, extraída e adaptada do brilhante trabalho de Harvey *et al.* (2021).

Figura 2 – Representações tridimensionais (3D) da glicoproteína *spike* inativa e ativa, evidenciando-se ainda o RBD ativo (na conformação “up”) e o sítio de ligação ao receptor ACE2

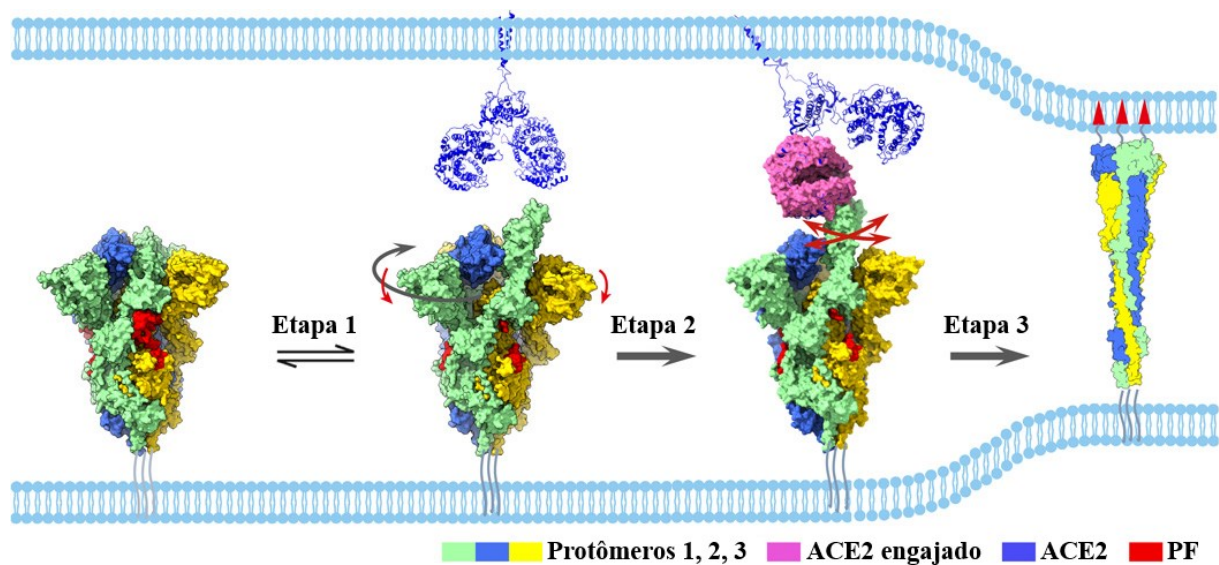


Fonte: HARVEY *et al.* (2021).

A transição conformacional supracitada possibilita a interação da *spike* com o receptor ACE2 e ao mesmo tempo permite que o novo coronavírus escape do sistema imunológico do organismo infectado.²⁶ A glicoproteína *spike* ativada tem, portanto, apenas um RBD na

conformação do tipo “*up*” e dois RBDs na conformação do tipo “*down*”, característica responsável por uma menor exposição de seu sítio de ligação e consequente evasão mais eficaz do sistema imune do indivíduo infectado. Além disso, quando inativa, a glicoproteína *spike* apresenta o peptídeo de fusão (PF) da sua subunidade *S2* totalmente enovelado, pois as 3 cadeias polipeptídicas dela se encontram firmemente complexadas, encobrindo-o. Após a ativação de um dos RBDs da *S1*, esta subunidade se liga ao receptor ACE2. A dinâmica gerada perturba a rede alostérica da *spike*, o que é benéfico para a destabilização e liberação do complexo ACE2-*S1*, bem como para a exposição do PF da *S2*. Como consequência, a subunidade *S2* se redobra e ocorre endocitose do vírus mediante fusão à MP da célula hospedeira, conforme evidenciado na Figura 3, adaptada de Xu *et al.* (2021).^{26,35,36}

Figura 3 – Esquema proposto do mecanismo de transições conformacionais na glicoproteína *spike* induzido pelo receptor ACE2



Fonte: XU *et al.* (2021).

Legenda: Os protômeros 1, 2 e 3 foram destacados, respectivamente, em verde claro, azul e amarelo, enquanto o peptídeo de fusão (PF) em sua forma compactada, em vermelho. A etapa 1 representa a passagem do estado inativo da *spike* para o estado ativo dela, seguido de um movimento de desenrolamento evidenciado por uma seta cinza. A seguir, a seta vermelha salienta a ocorrência de um movimento descendente da subunidade *S1* do protômero 1, que passa do estado ativo para o dinâmico de interação com o receptor ACE2 engajado, retratado pela etapa 2. Na sequência, a subunidade *S1* atinge o estado de pós-fusão redobrado, descrito pela etapa 3. O balanço contínuo dos movimentos do complexo ACE2-RBD da subunidade *S1* é indicado por duas setas vermelhas que se cruzam, entre as etapas 2 e 3. O último estado da *spike*, fundida à MP da célula infectada através do PF, foi ilustrado como um desenho preditivo.

Tanto ACE2 quanto TMPRSS2 foram detectados nos epitélios do nariz e dos brônquios, e genes de expressão de ACE2 foram identificados nas células epiteliais alveolares do tipo II.

ACE2 também já foi encontrado em células do coração, da córnea, do esôfago, do íleo, do cólon, do fígado, da vesícula biliar, dos rins e dos testículos.¹⁶ A vasta expressão tissular de ACE2 associada ao maior número de glicoproteínas *spike* presentes no envelope do SARS-CoV-2 aumenta a afinidade deste microrganismo pelo ACE2 da célula hospedeira, fato que eleva a virulência do novo coronavírus, quando comparado ao SARS-CoV.^{14,16}

ACE2 é um homólogo da já conhecida enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável pela regulação da pressão arterial via sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA/RAAS). Apesar de haver uma similaridade de 42% entre estes dois receptores, ACE2 faz o papel inverso de ECA. Enquanto este receptor enzimático transmembrana ocasiona vasoconstrição e consequente aumento da pressão arterial, aquele promove vasodilatação e diminui a pressão arterial através da inibição de angiotensina II, um peptídeo pró-inflamatório.^{37,38} Ademais, uma das funções do ACE2 nos pulmões é de proteção contra a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), bem como contra danos agudos a estes e a outros órgãos com alta expressão de ACE2, por meio da redução da inflamação local. Como consequência da infecção por COVID-19, ACE2 sofre endocitose juntamente com a partícula viral associada a ele, de maneira que os níveis deste receptor na MP das células infectadas diminuem, e, ao mesmo tempo, os níveis de angiotensina II aumentam. Pelo exposto, acredita-se que o processo inflamatório agudo intenso decorrente de casos graves da COVID-19 deve-se, em parte, à desregulação do SRAA.¹⁶

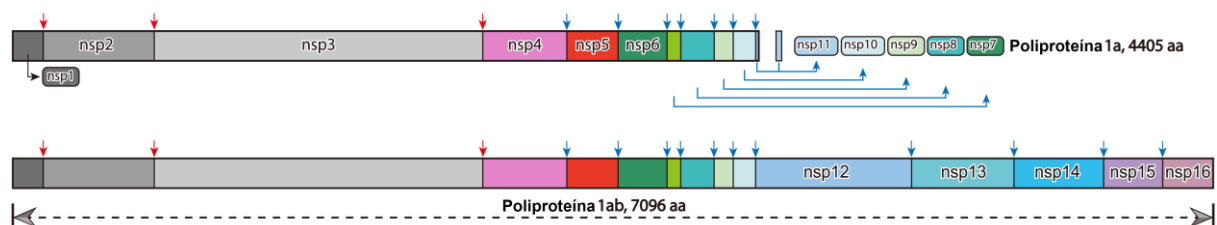
Tukiainen *et al.* (2017) associaram o gene de ACE2 ao cromossomo X e observaram diferentes perfis de expressão gênica entre os sexos masculino e feminino, fato que pode contribuir para a observância de manifestações clínicas mais severas da COVID-19 em pacientes homens, quando comparados às mulheres.^{39,40} Em 2020, fumantes e portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) também foram associados a níveis mais elevados de expressão do receptor ACE2.^{39,41} Além disso, pessoas com doenças crônicas, como hipertensão e diabetes, de igual maneira, possuem uma maior expressão gênica de ACE2, tornando-os mais susceptíveis à COVID-19.⁴²

Hussain *et al.* (2020) demonstraram que existem diversas variantes do gene ACE2 oriundas de mutações no DNA que originam polimorfismos, alguns destes tendo sido associados a doenças como diabetes e hipertensão. Embora tais polimorfismos não cheguem a interferir no funcionamento de ACE2, por serem expressos fora do sítio catalítico, eles alteram algumas regiões da estrutura 3D do ACE2. Como consequência, estas alterações estruturais têm o poder de dificultar a ligação do novo coronavírus à MP das células-alvo, fato que pode ser

somado às razões pelas quais algumas pessoas, quando comparadas a outras, têm sintomas mais leves da COVID-19.⁴³

Dando seguimento ao mecanismo de invasão celular do novo coronavírus, após o processo de endocitose, a TMPRSS2, em provável associação com CatB/L, entra novamente em ação para fragmentar a glicoproteína *spike* e, assim, liberar o material genético do SARS-CoV-2 dentro do citoplasma da célula hospedeira.³⁰ A maior parte do extenso RNA genômico do novo coronavírus é constituída pelas fases de leitura aberta (ORFs) 1a e 1b, as quais ocupam aproximadamente dois terços do genoma viral. Após associarem-se a ribossomos e a RNA transportadores da célula hospedeira, as regiões codificantes destas ORFs são traduzidas em duas grandes cadeias polipeptídicas, a pp1a, de massa molecular igual a 490 kDa distribuída ao longo de 4405 aminoácidos, e a pp1ab, de massa molecular igual a 794 kDa distribuída ao longo de 7096 aminoácidos.^{17,44,45,46} No caso da pp1ab, um mecanismo alternativo de tradução para mesclar proteínas codificadas por dois ORFs diferentes (“*programmed -1 ribosomal frameshift*”) é acionado.⁴⁴ Em seguida, as cisteíno proteases PL^{pro} (um dos domínios da Nsp3) e M^{pro} (Nsp5) sofrem excisão das gigantes proteicas supracitadas mediante autoclivagem e ocasionam uma subsequente clivagem proteolítica da cadeia pp1a em 3 e em 7 pontos distintos, respectivamente, e da cadeia pp1ab em 3 e em 11 pontos distintos, respectivamente, a fim de gerar macromoléculas funcionais para o SARS-CoV-2.^{21,47,48} Como resultado, são produzidos 1 peptídeo composto por 7 aminoácidos (Nsp11) e 14 proteínas (Nsp1, Nsp2, Nsp3, Nsp4, Nsp6, Nsp7, Nsp8, Nsp9, Nsp10, Nsp12, Nsp13 – mais conhecida como Helicase –, Nsp14 – mais conhecida como ExoN –, Nsp15 – mais conhecida como NendoU –, e Nsp16), totalizando 16 Nsps, conforme pode ser visualizado na Figura 4, adaptada de Zhao, Y. *et al.* (2022).^{17,44,45,46}

Figura 4 – Diagrama esquemático das poliproteínas pp1a e pp1ab, bem como de seus pontos de clivagem para originar todas as Nsps do novo coronavírus

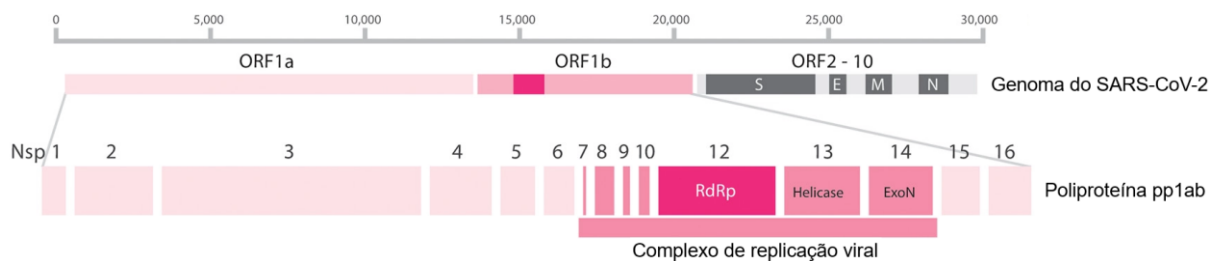


Fonte: ZHAO *et al.* (2022).

Legenda: As setas coloridas em vermelho e em azul representam os pontos de clivagem proteolítica das proteases PL^{pro} e M^{pro}, respectivamente.

Na sequência, a proteína Nsp12 associa-se a várias outras Nsps para originar o complexo de replicação-transcrição (RTC) que, por sua vez, se conecta à membrana do retículo endoplasmático da célula hospedeira para direcionar a replicação, a transcrição e a maturação de RNAs virais genômicos e subgenômicos.⁴⁶ Ademais, outros ORFs que ocupam uma parcela menos expressiva do genoma viral geram RNAs mensageiros subgenômicos que codificam 9 a 10 proteínas acessórias, e.g. ORF3a e ORF8, as quais são imprescindíveis para o processo de replicação-tradução, e dão origem ainda às 4 proteínas estruturais mencionadas anteriormente (*S*, *M*, *E* e *N*).^{17,44,45,49,50} A Figura 5, adaptada de Eastman *et al.* (2020), ilustra todos os ORFs e as Nsps descritos.

Figura 5 – Representação da estrutura do genoma do SARS-CoV-2 e da poliproteína pp1ab

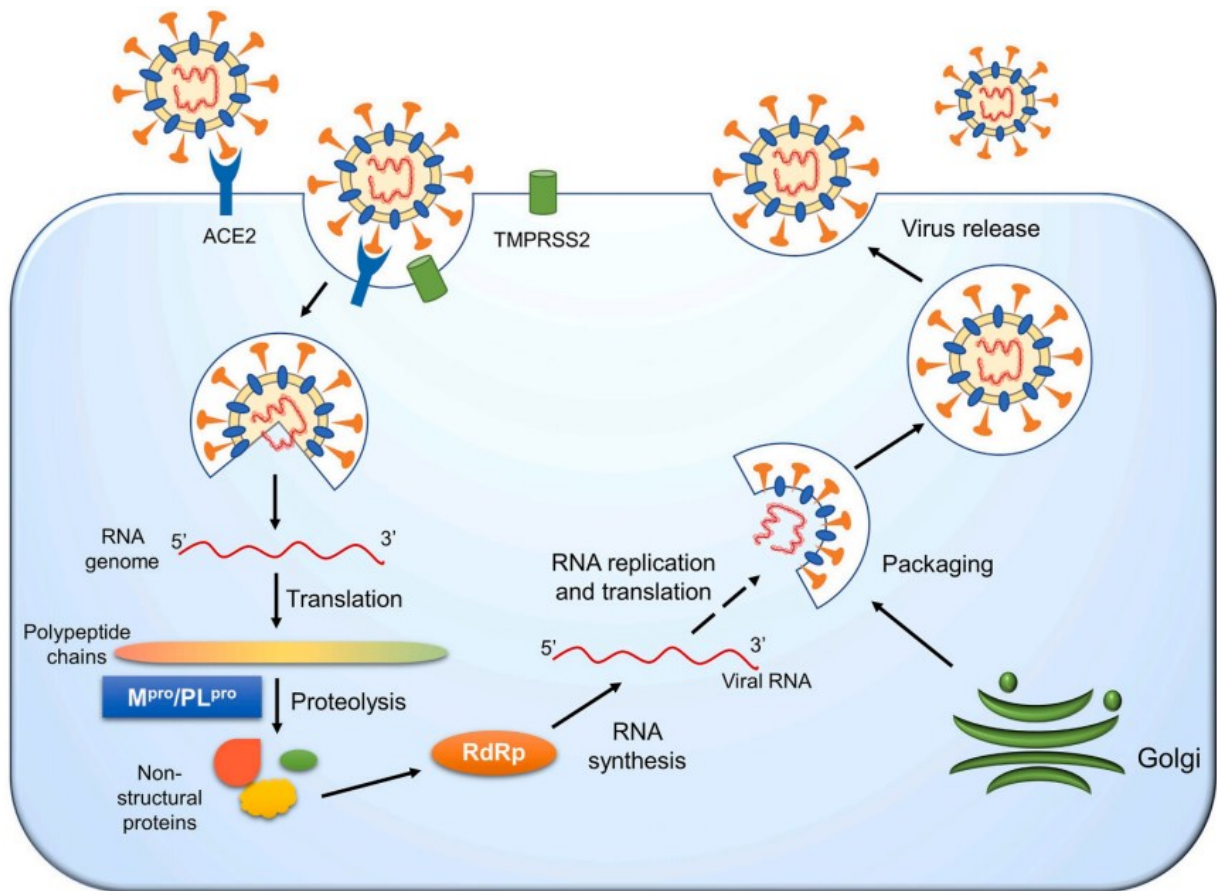


Fonte: EASTMAN *et al.* (2020).

Legenda: ORFs presentes no material genético de 30 mil pares de bases (Pb) do SARS-CoV-2, e as proteínas oriundas a partir de cada um deles, incluindo a poliproteína pp1ab e todas as Nsps resultantes, com destaque para aquelas que se unem a fim de originar o complexo de replicação viral que compõe o RTC.

Em seguida, as proteínas *S*, *M*, *E* e *N*, juntamente com a cadeia replicada de RNA do SARS-CoV-2, entram no maquinário do retículo endoplasmático associado ao complexo de Golgi da célula hospedeira para originarem uma nova partícula viral. A *spike* é traduzida na forma de um complexo de duas glicoproteínas *spike*, e este complexo é clivado pela TMPRSS2 em possível associação com furinas, a fim de facilitar a montagem dos vírions (partículas virais elementares) no interior da célula hospedeira. As novas partículas virais sofrem então exocitose, conforme ilustrado na Figura 6, confeccionada por Wu *et al.* (2020).^{16,17,21,49}

Figura 6 – Diagrama simplificado dos mecanismos de invasão celular, replicação e montagem do SARS-CoV-2



Fonte: WU *et al.* (2020).

Legenda: Primeiramente, o vírus interage com os receptores ACE2 e TMPRSS2 da célula hospedeira. A seguir, o RNA genômico do vírus (“*RNA genome*”) é traduzido (“*Translation*”) em cadeias polipeptídicas (“*Polypeptide chains*”) que sofrem subsequente proteólise (“*Proteolysis*”) pelas enzimas M^{pro} e PL^{pro}, originando, assim, as Nsps (“*Non-structural proteins*”). Em seguida, a enzima RdRp sintetiza (“*RNA synthesis*”) uma nova cadeia de RNA viral (“*Viral RNA*”) que é replicada e traduzida (“*RNA replication and translation*”) em proteínas estruturais do novo coronavírus. Por fim, o complexo de golgi (“*Golgi*”) associado ao retículo endoplasmático da célula infectada empacota estas proteínas estruturais juntamente com o RNA replicado (“*Packaging*”), e, então, um novo vírus é liberado para o meio extracelular (“*Virus release*”).

2.1.1 Cisteíno proteases do SARS-CoV-2

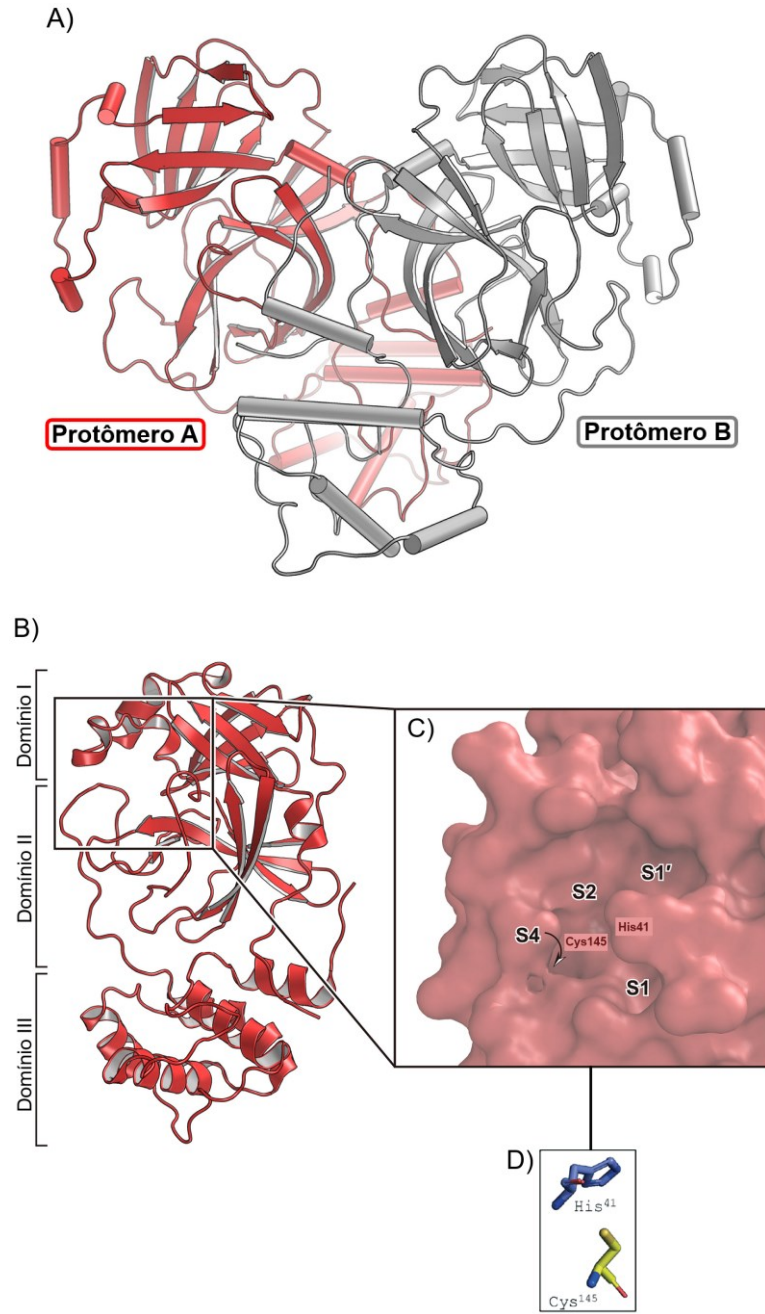
A M^{pro} é uma enzima formada por duas subunidades de cadeias proteicas idênticas, responsáveis por caracterizá-la como um homodímero. Cada uma destas subunidades representa um protômero que é constituído por três domínios.¹⁹ Cada protômero apresenta massa molecular igual a 33 kDa e é composto por 306 aminoácidos localizados nas posições 3264 a 3569 da pp1a/1ab.^{19,51} Os resíduos de aminoácidos de números 10 a 99 e de 100 a 182 dos domínios I e II, respectivamente, adotam o formato de um conglomerado de seis filamentos

de folhas- β antiparalelas que é típico de quimiotripsinas. Entre estes domínios, existe uma fenda profunda que abriga o sítio de ligação do substrato/sítio ativo, no qual aminoácidos contendo $-\text{NH}_2$ terminais (“N-terminal finger”/“N-finger”), representados pelos resíduos de aminoácidos de números 1 a 7, exercem um papel importante no processo catalítico. O sítio ativo da M^{pro} é composto por uma díade catalítica, representada pelos resíduos His41 e Cys145, e formado por quatro bolsos principais (S1, S1', S2 e S4), que são nomeados de acordo com a posição no substrato onde ocorre o ataque da protease. Cada protômero contém um sítio de ligação do substrato que contribui na mesma proporção para o processo de catálise, sendo que ambos os protômeros permutam seus N-terminais com o intuito de estabilizarem os bolsos S1.^{19,52,53}

O domínio III da M^{pro} é composto pelos resíduos de aminoácidos de números 198 a 303. Este domínio se trata de um aglomerado globular formado por cinco α -hélices antiparalelas que estão envolvidas no processo de dimerização da M^{pro} mediante, principalmente, interações intermoleculares do tipo ponte salina entre o resíduo Glu290 de um protômero e o resíduo Arg4 do outro protômero. Ademais, os domínios II e III são conectados por um *loop* que é composto pelos aminoácidos de números 183 a 198 e pode assumir duas conformações distintas.^{19,52}

A taxa de mutação da M^{pro} é extremamente baixa, de modo que o percentual de identidade evidenciado por Zhang *et al.* (2020) entre as sequências de aminoácidos da isoforma de 2002 do SARS-CoV e da isoforma de 2019 do SARS-CoV-2 foi bastante elevado, na ordem de 96%.^{52,54} Além disso, a sobreposição de estruturas 3D da M^{pro} com e sem ligantes por outros pesquisadores revelou que os bolsos principais do sítio ativo desta enzima são pré-moldados, isto é, não sofrem alteração por ligantes.¹⁹ Segundo Gunther *et al.* (2021), a M^{pro} do novo coronavírus possui dois sítios alostéricos de grande importância farmacológica; são eles: sítio 1, composto pelos resíduos Ile213, Leu253, Gln256, Val297 e Cys300; e sítio 2, representado pelos resíduos Gln110, Asp153, Val202, Ile249, Thr292, Phe294 e Arg298. A Figura 7, adaptada de Zhang *et al.* (2022) e de Oerlemans *et al.* (2021), ilustra os principais aspectos moleculares da M^{pro} .

Figura 7 – Características moleculares da estrutura 3D da M^{PRO} do SARS-CoV-2



Fonte: ZHAO *et al.* (2022); OERLEMANS *et al.* (2021).

Legenda: A) Homodímero da M^{PRO}, composto pelos protômeros A, destacado em vermelho, e B, em cinza;

B) Domínios I, II e III do protômero A;

C) Subsítios de ligação do substrato (“S1; S1’; S2; S4”) e localização dos resíduos catalíticos His41 e Cys145;

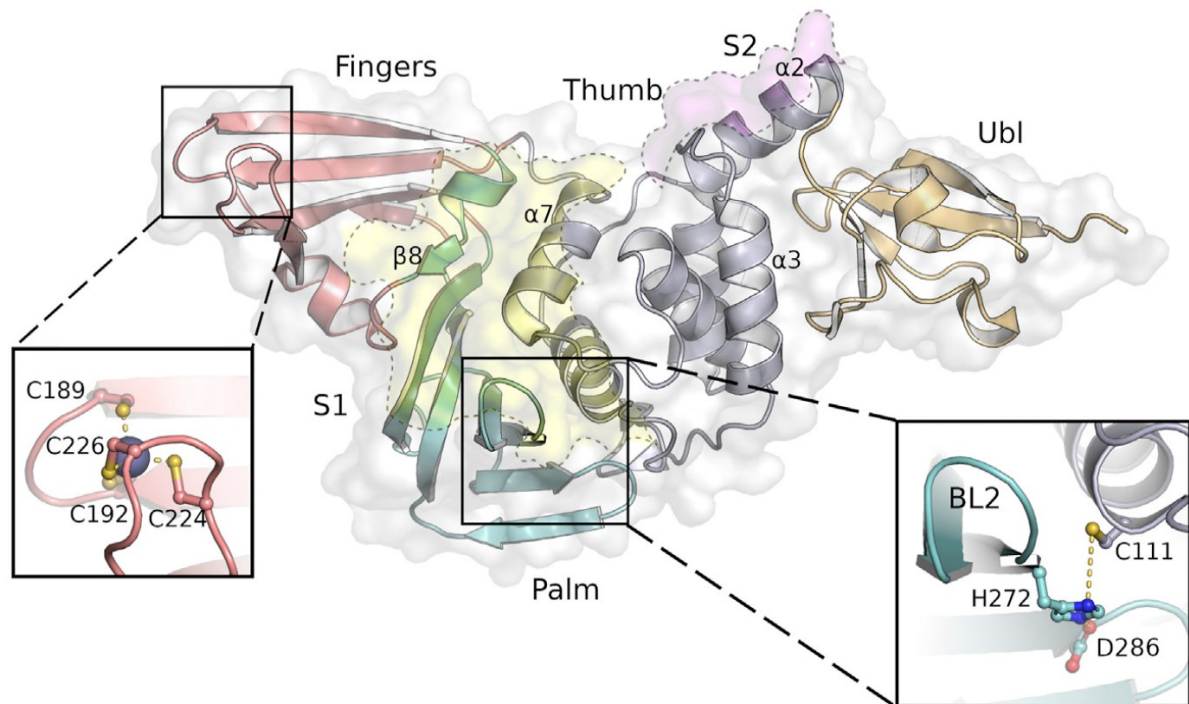
D) Representação dos aminoácidos que compõem a díade catalítica.

A PL^{PRO} é uma cisteíno protease multifuncional de caráter levemente básico composta por 315 aminoácidos e que constitui um dos múltiplos domínios da maior proteína do SARS-CoV-2, a Nsp3, de massa molecular igual a aproximadamente 212 kDa distribuída ao longo de

1945 aminoácidos.^{19,55} Ela é uma enzima monomérica formada por dois domínios principais. O primeiro deles é o domínio catalítico, comumente subdividido em três subdomínios; são eles: “*Thumb*”, composto por quatro α -hélices, “*Palm*”, formado por seis filamentos de folhas- β , e “*Fingers*”, constituído por quatro filamentos pregueados de folhas- β antiparalelas. O sítio ativo está localizado em uma fenda entre o “*Thumb*” e o “*Palm*”.^{19,56} Diferentemente da M^{pro}, as propriedades catalíticas da PL^{pro} são semelhantes às de outras cisteíno proteases, no sentido de que seu sítio ativo é composto por uma tríade catalítica, na qual o grupamento tiolato da Cys111 age como um nucleófilo, e o resíduo Asp286 desprotona o resíduo His272, que funciona, quimicamente, como uma base.⁵⁵ O acesso ao sítio ativo é regulado por um *loop* flexível de bloqueio do tipo 2, intitulado BL2, que atua como um portão, sendo evidenciado em estruturas 3D sem ligantes. Após a interação com o substrato/ligante, o BL2 se fecha sobre a fenda que abriga o sítio ativo mediante um mecanismo de ajuste induzido via interações intermoleculares com o substrato/ligante. Além disso, esse *loop* pode assumir várias conformações dependendo do tamanho e do tipo da molécula inibidora.¹⁹ Na ponta do subdomínio “*Fingers*”, o íon zinco é coordenado por 4 resíduos de cisteína (Cys189, Cys192, Cys224, e Cys226) em uma região cuja geometria tetraédrica é essencial para a integridade estrutural e consequente atividade enzimática.^{19,57} O segundo domínio da PL^{pro}, denominado Ubl, apresenta cadeias N-terminais que são bem separadas do domínio catalítico.¹⁹

A PL^{pro} do novo coronavírus ocasiona clivagem de ligações peptídicas da pp1a/1ab em três pontos distintos entre a Nsp1 e a Nsp2, a Nsp2 e a Nsp3, e entre a Nsp3 e a Nsp4, gerando as proteínas Nsp1, Nsp2 e Nsp3.⁵⁵ A sequência consenso, ou “impressão digital”, de reconhecimento pela PL^{pro} para promoção da proteólise é curiosamente idêntica às sequências carregadas nos C-terminais das proteínas Ub e ISG15, cuja principal função é ativar a resposta imune inata de um organismo.¹⁹ Como consequência, a clivagem das porções C-terminais destas duas proteínas pela PL^{pro} impede que o sistema imune do hospedeiro seja acionado. Os sítios onde a PL^{pro} do SARS-CoV-2 se liga a substratos das proteínas Ub e ISG15 são denominados SUB ou S1 e SUB2 ou S2.^{19,57} Além disso, já foi reportado que a PL^{pro} apresenta mais funções de inativação de outras proteínas, de maneira que algumas vias de sinalização intracelular do organismo hospedeiro são prejudicadas.^{19,55} A Figura 8, confeccionada brilhantemente por Ewert *et al.* (2022), evidencia todos os detalhes moleculares da PL^{pro} do novo coronavírus.

Figura 8 – Características moleculares da estrutura 3D da PL^{pro} do SARS-CoV-2



Fonte: EWERT *et al.* (2022).

Legenda: Estrutura 3D da PL^{pro} indicando o domínio “Ubl”, na coloração laranja, e os três subdomínios “Fingers”, na cor salmão, “Palm”, na coloração ciano, e “Thumb”, na cor roxa. Os sítios de ligação de diferentes substratos (“S1”; “S2”) foram destacados em amarelo e em violeta na superfície proteica. Por fim, o zoom no domínio “Fingers” evidencia os resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação do íon zinco, enquanto o zoom no domínio “Palm” destaca a tríade catalítica que compõe o sítio ativo, composta pelos resíduos Cys111 (“C111”), His272 (“H272”) e Asp286 (“D286”).

Os percentuais de identidade e de similaridade entre as sequências de aminoácidos das enzimas PL^{pro} do SARS-CoV-2 e de seu antecessor SARS-CoV são, respectivamente, de 83% e de 90%; por outro lado, entre a PL^{pro} do SARS-CoV-2 e a PL^{pro} do MERS-CoV são de apenas 31% e 49%, respectivamente.^{19,55} A ausência de proteínas altamente homólogas a M^{pro} e a PL^{pro} em humanos torna estas enzimas alvos extremamente atrativos para o desenvolvimento de candidatos a fármacos no combate à COVID-19.^{21,55}

2.2 EPIDEMIOLOGIA, FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA DA COVID-19

Da mesma forma que outros vírus de RNA se comportam, o SARS-CoV-2 está constantemente evoluindo como consequência de mutações aleatórias, e qualquer nova mutação pode potencialmente elevar a sua virulência. Ademais, mutações têm o poder de aumentar a capacidade do vírus de evadir das respostas imunológicas de infecções passadas pelo próprio

SARS-CoV-2 ou mesmo decorrentes da imunização passiva, isto é, por vacinação, elevando, assim, o risco de reinfecção em decorrência da diminuição da eficácia de uma vacina contra variantes do novo coronavírus. Já existe evidência clínica, inclusive, de que estas variantes têm uma menor susceptibilidade tanto ao sistema imune adaptativo de pessoas vacinadas/já infectadas no passado quanto a anticorpos monoclonais que foram utilizados na prevenção e no tratamento da COVID-19.⁵⁸ Neste cenário, especialistas estão preocupados com variantes que apresentem mudanças na glicoproteína *spike* do SARS-CoV-2, uma vez que ela é a porta de entrada do vírus às células humanas. Para tanto, desde 2020, mutações de interesse relacionadas a esta proteína estrutural têm sido determinadas.⁵⁹

Desde meados de 2020, diversas variantes do novo coronavírus surgiram, e elas foram identificadas segundo um sistema de nomenclatura conhecido como PANGO, o qual leva em consideração a filogenética do SARS-CoV-2.⁶⁰ Neste contexto, uma ferramenta denominada PANGOLIN foi desenvolvida por Rambaut *et al.* (2020) para classificar linhagens genéticas do SARS-CoV-2 mediante agrupamento de sequências associadas a um evento epidemiológico, como, por exemplo, a introdução do novo coronavírus em uma área geográfica diferente, seguida da evidência de sua disseminação progressiva.

Apesar do número gigantesco de mutações sofridas pelo SARS-CoV-2, poucas variantes são consideradas potencialmente mais transmissíveis ou virulentas. Após a COVID-19, os Centros de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC) e a OMS estabeleceram, de forma independente, um sistema de classificação que separa as variantes emergentes das variantes comprovadamente mais transmissíveis e/ou virulentas. Além disso, a OMS atribui letras gregas a elas. As linhagens que ainda não foram associadas a qualquer evidência concreta de mudança no padrão do quadro infeccioso da COVID-19 são classificadas como variantes de interesse (VOI).¹⁷ As 8 linhagens listadas no website da OMS são: Epsilon, Zeta, Eta, Theta, Iota, Kappa, Lambda e Mu.⁶¹ Por outro lado, as variantes relacionadas a um aumento comprovado de transmissibilidade ou de virulência, à habilidade de escapar do sistema imune e à redução do poder neutralizante de anticorpos decorrentes de imunização ativa (por infecção passada) ou passiva (por vacinação) ou ainda de escolhas terapêuticas (neste caso, biofármacos) são denominadas variantes de preocupação (VOC).^{6,62}

A primeira variante de preocupação, conhecida como B.1.1.7 segundo a nomenclatura PANGO e como Alfa de acordo com a OMS, foi identificada pela primeira vez no Reino Unido e espalhou-se por mais de 50 países. A segunda VOC (B.1.351/Beta) foi encontrada primeiramente na África do Sul, tendo sido posteriormente reportada em mais de 20 países.^{6,58,62} A terceira variante de preocupação (P.1/Gamma), identificada primeiramente no Estado

brasileiro do Amazonas, disseminou-se por mais de 10 países. Estas três variantes de preocupação foram posteriormente substituídas em todo o mundo pela quarta VOC (B.1.617.2/Delta), que surgiu na Índia no final de 2020 e tornou-se dominante mundialmente em julho de 2021. Quatro meses depois, em novembro de 2021, surgiu a última variante de preocupação (B.1.1.529/Ômicron), a qual se mostrou ainda mais transmissível do que a variante Delta, porém menos virulenta. Rapidamente, a VOC Ômicron tornou-se dominante em todo o globo, e mais recentemente foram reportadas subvariantes dela, tais como BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.4 e BA.5, tendo estas duas últimas sido consideradas as mais contagiosas desde o início da pandemia de COVID-19.^{58,59}

Vincent *et al.* (2005) afirmaram que a cloroquina, um medicamento utilizado há mais de 50 anos no tratamento da malária, foi um potente inibidor do SARS-CoV mediante estudos realizados *in vitro* com culturas celulares. Seguindo um racional semelhante, Liu *et al.* (2020) defenderam que a hidroxicloroquina, um fármaco derivado da cloroquina, mas com menor toxicidade e utilizado nos tratamentos de artrite reumatoide e de lúpus eritematoso, mostrou-se efetivo contra o SARS-CoV-2 em células infectadas *in vitro*. Em ambos os casos, o mecanismo de ação proposto foi de aumento do pH endossomal, impedindo, assim, a clivagem proteolítica ácida-dependente da glicoproteína *spike* para ativação do seu RBD e posterior interação do mesmo com o receptor ACE2 da célula hospedeira, reduzindo, por consequência, o acesso dos vírus às células. Todavia, esses medicamentos falharam tanto na eliminação quanto na diminuição da severidade dos sintomas da COVID-19 em pacientes acometidos por esta doença, durante um estudo clínico de 14 dias. Outros estudos clínicos evidenciaram ainda que não houve diminuição da necessidade de intubação nem da taxa de mortalidade em pacientes tratados com hidroxicloroquina. Consequentemente, os usos emergenciais de cloroquina e de hidroxicloroquina foram suspensos pela Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos da América (FDA) em meados de 2020.¹⁶

Da mesma forma, o antibiótico azitromicina não gerou nenhum efeito benéfico no quadro clínico da COVID-19 durante estudos clínicos realizados com a molécula isolada e em associação com cloroquina ou hidroxicloroquina. O antiparasitário nitazoxanida, de igual maneira, falhou em gerar qualquer benefício significativo contra a COVID-19 durante ensaios clínicos. Semelhantemente, a ivermectina, um outro fármaco antiparasitário, apesar de ter inibido a replicação do novo coronavírus *in vitro*, de acordo com estudos farmacocinéticos de extrapolação, seriam necessárias doses 100 vezes maiores do que as aprovadas para uso em humanos a fim de utilizá-la no tratamento da COVID-19. Posteriormente, resultados de dois estudos clínicos de grande extensão evidenciaram que voluntários com quadros leves a

moderados de COVID-19 não apresentaram diminuição dos sintomas nem melhora de seus quadros infecciosos após serem tratados com ivermectina.⁵⁸

Outros medicamentos administrados por via oral, tais como inibidores de diferentes quinases, inibidores de protease do HIV e antitrombóticos, e por via intravenosa, tais como plasma convalescente (doado por pessoas infectadas pela COVID-19, mas que se recuperaram e apresentam elevados títulos de anticorpos), imunomoduladores e imunoglobulinas específicas contra SARS-CoV-2, incluindo os anticorpos monoclonais, e ainda por via inalatória (budesonida), também já foram considerados para o tratamento da COVID-19. Todavia, eles não tiveram seus usos, seja profilático, seja terapêutico, recomendados pela agência estadunidense NIH, a maior corporação de pesquisas biomédicas e médicas do mundo. Isso ocorreu devido a evidências insuficientes de benefícios contra a COVID-19 ou à inexistência de ensaios clínicos em humanos, assim como à perda de eficácia após o surgimento de determinada variante ou mesmo à não observância de efeitos benéficos no quadro clínico da COVID-19 durante estudos clínicos.⁵⁸

Os medicamentos recomendados atualmente pela agência estadunidense NIH para tratamento da COVID-19 são os seguintes:

- ⇒ Indivíduos hospitalizados: 1) Remdesivir, um pró-fármaco antiviral inibidor da enzima RdRp do SARS-CoV-2, utilizado anteriormente no tratamento de ebola e da doença causada pelo MARV; foi aprovado tanto pelo FDA quanto pela ANVISA após resultados positivos de três estudos clínicos consistentes^{58,65}; 2) Corticoides (de preferência, dexametasona; na ausência deste fármaco, podem ser utilizados outros corticosteroides, como, por exemplo, prednisona e hidrocortisona), em combinação ou não com tocilizumabe, um moderno anti-inflamatório imunomodulador anti-receptor de IL-6 na forma de anticorpo monoclonal;⁵⁸
- ⇒ Indivíduos não hospitalizados (até o 5º dia após o início dos sintomas): 1) Paxlovid®, medicamento composto pelo fármaco inovador “PF-0321332”, intitulado nirmatrelvir, em associação com o ritonavir para diminuir seu metabolismo; é um inibidor covalente da M^{pro} do SARS-CoV-2, tendo sido aprovado pelo FDA para uso emergencial nos Estados Unidos da América (EUA) em 22 de dezembro de 2021 e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil, em 30 de março de 2022;^{66,67}
- ⇒ Tratamentos alternativos adicionais, em ordem de preferência, para indivíduos não hospitalizados: 1) Remdesivir; 2) Molnupiravir, antiviral que apresenta o mesmo mecanismo de ação do Remdesivir, porém é administrado por via oral; ele foi aprovado pela MHRA no dia 04 de outubro de 2021, pelo FDA no dia 23 de dezembro de 2021,

e pela ANVISA no dia 04 de maio de 2022;^{68,69,70} 3) Bebtelovimabe, um anticorpo monoclonal neutralizante anti-SARS-CoV-2 que interage com a glicoproteína *spike*;⁵⁸

⇒ Tratamentos alternativos adicionais para indivíduos não hospitalizados e não infectados pela subvariante BA.2 da VOC Ômicron: 1) Anticorpos monoclonais neutralizantes anti-SARS-CoV-2 que interagem com a glicoproteína *spike*, impedindo, por conseguinte, a entrada do vírus na célula – A) Bebtelovimabe; B) Sotrovimabe.⁵⁸

- Todas as propostas terapêuticas recomendadas são de administração parenteral (intravenosa), exceção seja feita para o Paxlovid®, o Molnupiravir e os corticoides, que são por via oral.⁵⁸

No dia 22 de novembro de 2022, a indústria farmacêutica japonesa Shionogi notificou à imprensa que seu fármaco inovador “S-217622”, nomeado ensitrelvir, foi aprovado pela PMDA para ser comercializado, sob uso emergencial, na forma do medicamento Xocova® no Japão. Este fármaco é um inibidor não covalente da M^{pro} do SARS-CoV-2, e, diferentemente do Paxlovid® que precisa ser administrado duas vezes ao dia, o Xocova® é administrado apenas uma vez ao dia e sem a necessidade de associação com o ritonavir.^{71,72,73}

2.3 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

2.3.1 Química Farmacêutica/Medicinal e modelagem molecular

A Química Medicinal é uma ciência baseada na Química, que envolve aspectos químicos, biológicos, médicos e farmacêuticos. Esta disciplina compreende a invenção, descoberta, planejamento, identificação e preparação de substâncias biologicamente ativas, bem como a interpretação de seu modo de ação no âmbito molecular, o estudo de seu metabolismo, e o estabelecimento das relações estrutura-atividade, a fim de aplicar todos estes fundamentos no planejamento racional dos fármacos. O profissional dessa área faz uso da interdisciplinaridade, agregando informações de diferentes subáreas, que solidificam todos os aspectos envolvidos nas etapas de planejamento, síntese, elaboração e esclarecimento sobre os mecanismos de ação dos fármacos nas variadas doenças que acometem os seres vivos.⁷⁴

Neste contexto, o desenvolvimento de fármacos assistido por métodos computacionais (CADD) é uma ferramenta amplamente utilizada pela Química Medicinal nos projetos de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. As metodologias desta ferramenta são usadas desde a identificação de moléculas bioativas a partir de compostos potenciais até a otimização de compostos líderes, tanto no que tange às suas propriedades físico-químicas, para fins

farmacocinéticos, quanto às propriedades farmacodinâmicas, com o intuito principal de inibir a atividade de uma enzima ou de bloquear o reconhecimento de uma substância por um receptor.¹⁰

A modelagem molecular consiste na investigação das propriedades moleculares e estruturais de uma substância ou de sistemas complexos pelo uso da Química computacional e de técnicas de visualização gráfica, visando ao fornecimento de uma representação 3D, de acordo com determinadas características.^{10,74,75} Nesta esfera de investigação, a modelagem molecular engloba metodologias computacionais que determinam densidades eletrônicas e distâncias interatômicas de moléculas de interesse biológico, definem as conformações potencialmente bioativas, estudam o equilíbrio conformacional de biomoléculas, definem, confirmam ou descartam hipóteses para o mecanismo de ação em nível eletrônico e molecular de diversos fármacos, explicam racionalmente as atividades farmacológicas de substâncias, e, finalmente, identificam interações específicas entre fármacos e proteínas ou receptores, mediante a determinação de grupamentos farmacofóricos, isto é, de porções da estrutura do ligante que interagem ativamente com uma biomacromolécula específica.¹⁰

Os modelos computacionais de aproximação que têm sido predominantemente utilizados em estudos de modelagem molecular baseiam-se em métodos de cálculo que diferem entre si basicamente quanto à natureza do campo de força, isto é, à associação de parâmetros numéricos com um conjunto específico de funções de energia.^{10,76} No âmbito da modelagem molecular, um campo de força não deve ser entendido como o campo de força definido na física, pois, na Química computacional, ele é uma nomenclatura aplicada para se referir ao conjunto de parâmetros usados para definir funções de energia interatômicas e, assim, permitir o cálculo da energia potencial de um sistema composto por átomos ou partículas.^{10,12} Baseando-se nos diferentes campos de força, os modelos de aproximação são classificados como totalmente empíricos, totalmente teóricos e semiempíricos. Os modelos totalmente empíricos são também conhecidos como de aproximação direta ou clássica e incluem os métodos de cálculo da mecânica molecular (MM) e da dinâmica molecular (MD/DM). Já os modelos totalmente teóricos, bem como os semiempíricos, são reconhecidos como de aproximação indireta ou quântica.^{10,76}

O método de MM tem como base a visão clássica da estrutura de uma molécula como sendo um conjunto de átomos ou “esferas” conectados por “molas”, em vez de núcleos e elétrons, como ocorre nos métodos quânticos.⁷⁶ Essa metodologia é justificável quando há permanência razoavelmente constante de parâmetros atomísticos entre estruturas diferentes, contanto que a hibridação dos átomos abrangidos seja a mesma. Na mecânica molecular

desenvolvem-se campos de força que são constituídos pelo somatório de funções energéticas, como, por exemplo, ângulos e distâncias de ligação, distâncias de van de Waals, ângulos diedros, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (H) de um sistema no estado de equilíbrio. Além disso, constantes de força são determinadas a partir de penalidades energéticas aplicáveis quando os valores encontrados entre núcleos e elétrons se afastam dos valores calculados no estado de equilíbrio. Para reduzir essas penalidades de energia, aplica-se o processo de otimização/minimização energética mediante uso de um algoritmo matemático adequado.^{10,76}

A principal vantagem da MM é o tempo relativamente curto gasto para se avaliarem sistemas complexos.^{10,76} Na prática, entretanto, os métodos quânticos garantem maior precisão dos resultados e fornecem dados acerca da estrutura eletrônica, a qual não é levada em consideração na MM.¹⁰ O método de MD permite determinar movimentos moleculares em função do tempo, isto é, propriedades de trajetória da molécula dependentes do tempo, como, por exemplo, difusão, enovelamento proteico e solvatação. Para tanto, considera-se a energia cinética dos átomos, a qual causa colisões intermoleculares e, conseqüentemente, mudanças conformacionais nas moléculas. Os cálculos de dinâmica molecular têm como base a equação de movimento newtoniana.⁷⁶

Por outro lado, os métodos de mecânica quântica (QM) baseiam-se na resolução da equação de Schrödinger, que foi postulada pelo físico de mesmo sobrenome após contribuições de trabalhos pioneiros dos também físicos Planck, Einstein e Louis de Broglie. A equação de Schrödinger, por sua vez, inclui o comportamento ondulatório para todos os núcleos e elétrons que constituem um sistema atômico a fim de se determinar a energia deste sistema. Devido à elevada complexidade da equação em xeque, aproximações são aplicadas para sistemas práticos. Neste sentido, a aproximação de Born-Oppenheimer separa os movimentos eletrônico e nuclear e calcula apenas as energias dos elétrons em cada conjunto de posições nucleares estacionárias, mediante congelamento hipotético dos núcleos. A função de onda tida como melhor é a que atinge um mínimo de energia. Para sistemas com elétrons desemparelhados, como é o caso dos radicais livres, além do cálculo de funções dos orbitais moleculares que ocorrem em todos os sistemas, o spin dos elétrons nestes orbitais deve ser levado em consideração na aproximação utilizada.^{10,76}

Nos métodos quânticos *ab initio*, não são incluídas aproximações além das teóricas, e os orbitais moleculares são representados como conjuntos de bases. Entretanto, apesar de mais precisos, tais métodos requerem grande capacidade de memória e maior tempo de máquina. Além disso, são aplicados, geralmente, para moléculas pequenas, pois, o número de integrais

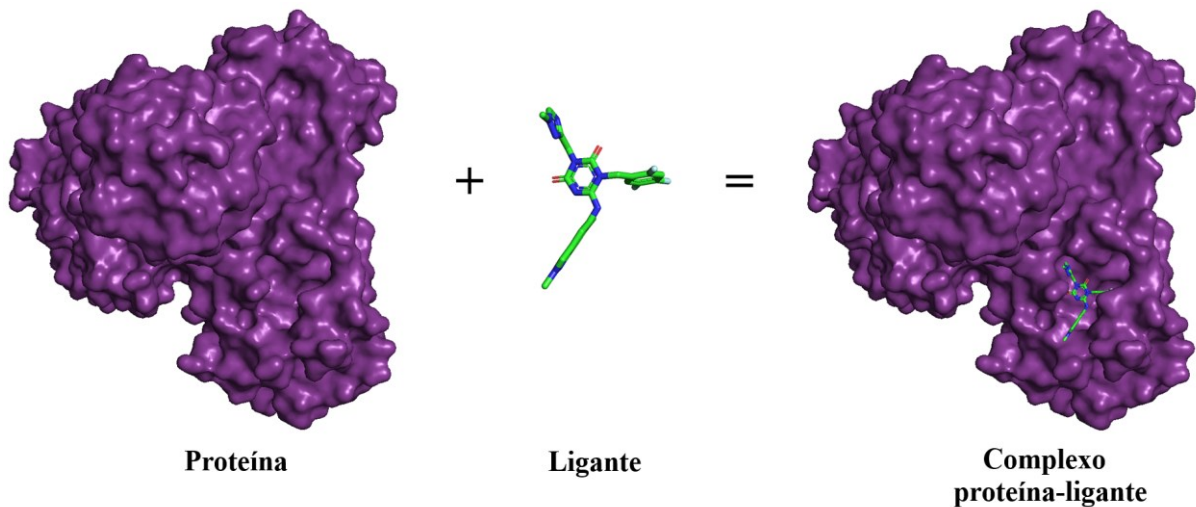
crece exponencialmente, na ordem de quatro vezes, com relação ao número de funções utilizadas, chegando a milhões já no caso de moléculas pequenas. Para resolver esse problema, surgiram os métodos semiempíricos, os quais negligenciam um grande número de integrais a fim de diminuir o tempo de cálculo do computador. Estes métodos baseiam-se nas mesmas aproximações dos métodos *ab initio*, porém, uma parcela dos seus parâmetros sofre ajustes advindos de dados experimentais, de modo que eles têm aplicação limitada a sistemas contendo os elementos químicos para os quais aqueles parâmetros foram desenvolvidos. Como resultado dessas parametrizações, vários dados experimentais, como, por exemplo, calores de formação, geometrias de equilíbrio, energias de ionização e momentos de dipolo são reproduzidos nas aproximações semiempíricas.^{10,76}

Como consequência do rápido avanço na área de hardware, software e métodos, os processos computacionais antes realizados exclusivamente em estações de trabalho de alto desempenho, são atualmente calculados em microcomputadores com uma escala de tempo suficientemente aceitável.^{12,76} Pelo exposto, a modelagem molecular, estando atrelada a uma proposta de reduções significativas do custo e do tempo envolvidos no processo de descoberta de um novo fármaco, auxilia na interpretação das correlações entre a estrutura química de uma substância e sua atividade farmacológica. Diante desta realidade, pode-se inferir que as técnicas computacionais devem ser integradas aos procedimentos experimentais, e, assim, de igual maneira, ocupar uma função central no processo de planejamento racional e estudo de novos fármacos e moléculas com atividade biológica.¹²

2.3.2 *Docking* e AutoDock Vina

Dentre as vertentes da modelagem molecular, o método de *docking* ou ancoragem molecular ou ainda atracamento molecular destaca-se como uma das técnicas mais utilizadas no mundo moderno para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Esta técnica prediz o modo de ligação do fármaco na região de interação com um alvo molecular (proteína/receptor). Devido ao crescente aumento do conhecimento de estruturas 3D de proteínas, esta metodologia computacional vem sendo amplamente utilizada na obtenção de novas substâncias bioativas.⁷⁷ Além disso, o *docking* determina a geometria do ligante no sítio ativo, avaliando tanto complementaridade quanto afinidade, e identifica a localização do sítio ativo de um receptor ou de uma proteína quando ela é desconhecida.^{12,74,77-80} A Figura 9 ilustra esquematicamente a formação de um complexo proteína-ligante pela metodologia de *docking*.

Figura 9 – Representação esquemática da interação de um ligante com o sítio ativo de uma protease



Fonte: do autor.

O primeiro princípio de ancoragem molecular proposto foi o modelo “chave-fechadura” de Emil Fischer. Em 1894, este pesquisador utilizou o princípio “chave-fechadura” para explicar o modelo teórico da interação ligante-receptor. A teoria de Fischer afirmava que ligantes e receptores poderiam reconhecer um ao outro mediante alinhamentos geométricos que se assemelhavam à maneira que uma chave se encaixa perfeitamente em uma fechadura. Nesta época, tanto o receptor quanto o ligante eram considerados estruturas rígidas, isto é, suas conformações espaciais não sofriam alteração durante o atracamento molecular. Embora essa consideração explique bem o processo de mudanças sutis na estrutura e na conformação 3D antes e depois da interação de um receptor com substâncias pequenas, em meados do século XX, ela passou a ser considerada como insuficiente na medida em que eram observadas grandes mudanças conformacionais na estrutura de um receptor que havia interagido com substâncias maiores. Devido a essa limitação do modelo “chave-fechadura”, em 1958, o pesquisador Koshland propôs a teoria do encaixe induzido. Segundo esta teoria, após o reconhecimento do substrato por uma enzima, a conformação espacial do sítio ativo desta proteína é modificada, indicando, por conseguinte, que ambas as estruturas são flexíveis durante a ancoragem molecular. Como consequência, no decorrer das décadas que se seguiram, diferentes métodos computacionais foram propostos.¹²

A ancoragem molecular engloba três metodologias principais; são elas: *docking* rígido, *docking* flexível e *docking* semiflexível. A primeira delas assume que tanto a conformação do ligante quanto a do receptor não sofrem alteração e que apenas a posição espacial das duas

moléculas é modificada. Neste tipo de ancoragem, pelo fato de o ligante e o receptor serem considerados fixos, a extensão e o grau de dificuldade dos cálculos computacionais envolvidos são os mais simples possíveis. Entretanto, para garantir uma exatidão razoável dos resultados, o *docking* rígido é indicado apenas para interações envolvendo duas estruturas grandes, como, por exemplo, proteínas e complexos de proteínas com ácidos nucleicos. Na segunda metodologia supracitada, as conformações do ligante e do receptor podem sofrer modificações livremente. Como resultado positivo deste tipo de simulação computacional, obtém-se uma alta exatidão devido à elevada aproximação da situação real. Todavia, devido ao aumento significativo de variáveis geométricas com o número de átomos do sistema, o *docking* flexível é o método computacional mais complexo e demorado, de modo que ele requer computadores de altíssimo desempenho. Na terceira e última metodologia, enquanto a conformação do receptor é fixada para se comportar de forma rígida, a conformação do ligante varia segundo um alcance pré-determinado, por exemplo, fixando-se o ângulo de ligação e o comprimento de ligação em porções não-críticas do ligante, isto é, que não são passíveis de interação com o receptor. Este método de *docking* semiflexível tem sido amplamente utilizado em simulações computacionais entre pequenos ligantes e biomacromoléculas, como, por exemplo, receptores, enzimas e ácidos nucleicos, devido à ótima habilidade de predição da interação sem a necessidade de cálculos tão complexos e dispendiosos quanto os envolvidos no *docking* flexível.¹²

Diferentemente da DM que lida de forma direta com a energia através dos campos de força químicos, o *docking* está interessado na reprodução de potenciais químicos por meio de *scores*, os quais representam a energia de Gibbs aproximada da interação de conformação preferencial que uma molécula assume quando interage com o sítio ativo da biomacromolécula/bioreceptor ou ainda que uma biomacromolécula assume frente a outra biomacromolécula, como é o caso da interação entre proteína-proteína e entre proteína-DNA. A interação de um ligante com uma biomacromolécula é um processo de equilíbrio termodinâmico do sistema, sendo este representado pelo complexo resultante de uma interação. Portanto, na esfera do *docking*, busca-se pelo complexo cuja conformação apresente a menor energia de afinidade, isto é, o menor valor de energia de Gibbs aproximada, sendo que aquela energia pode ou não equivaler ao *score*. Neste âmbito, modelos ou funções matemáticas precisam ser empregados para calcular esta energia da maneira mais exata possível. Como consequência, é necessário que sejam desenvolvidos algoritmos extremamente eficazes e rápidos no que tange à busca pelo complexo otimizado que apresente a conformação de menor energia de afinidade/*score* possível.^{12,78,80}

Os algoritmos mais utilizados na esfera da ancoragem molecular são os de busca exaustiva e os heurísticos. Os algoritmos de busca exaustiva são usados quando não se conhece a região da biomacromolécula onde ocorre interação com um ligante grande, isto é, com uma outra biomacromolécula, a qual, geralmente, corresponde a uma proteína, um RNA ou um DNA. Neste caso, a região de interação pode ocorrer em qualquer porção da superfície da biomacromolécula. Os algoritmos heurísticos, por outro lado, apresentam uma vasta aplicação para ligantes pequenos, como é o caso de fármacos, uma vez que se conhece o sítio ativo de uma proteína ou o domínio de ligação de um receptor onde o complexo biomacromolécula-ligante se forma.¹²

Atualmente, os principais algoritmos heurísticos usados no âmbito do *docking* são o Monte Carlo (MC), o Genético (GA) e o *Swarm Intelligence* (SI). Na prática, o MC, por ser uma ferramenta mais geral de busca pela conformação de menor energia, requer um tempo de cálculo bem maior para gerar a melhor solução possível, quando comparado aos outros dois tipos de algoritmos. O GA, devido à simplicidade, elevada eficiência e fácil processamento, tornou-se um dos mais importantes algoritmos de busca conformacional no que se refere a complexos de biomacromoléculas com ligantes pequenos. O SI, por sua vez, apesar de ser considerado um algoritmo de eficiência até superior à dos GA, ainda precisa alcançar uma maior notoriedade a fim de que seu uso se equipare ao dos algoritmos genéticos.¹²

Para que um software de ancoragem molecular seja bem sucedido, ele requer, além de um algoritmo eficaz, uma função de avaliação/pontuação/*scoring* sensível o bastante para ranquear as conformações geradas pelo algoritmo de escolha, a fim de que a conformação melhor ranqueada *in silico* aproxime-se ao máximo da conformação que se observaria *in vivo*.¹² Essa função de *scoring* representa uma aproximação computacional para predizer a afinidade da interação proteína-ligante e pode conter parâmetros hidrofóbicos, eletrostáticos, de van der Waals e de ligações de H, provenientes de modelos matemáticos que antevêm as melhores orientações do ligante, segundo uma lista de valores de energia.¹⁰ Uma função de *scoring* genérica é representada da seguinte forma (1):

$$\begin{aligned} \Delta G_t = & \alpha_0 + \alpha_1 \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M V_{vdw,i,j} + \alpha_2 \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M V_{Hbond,i,j} \\ & + \alpha_3 \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M V_{elec,i,j} + \alpha_4 \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M V_{desol,i,j} \end{aligned} \quad (1)$$

onde ΔG_t é a afinidade de ligação teórica; α_0 é a constante de regressão; α_1 é o peso relativo ao termo da interação de van der Waals (V_{vdw}); α_2 é o peso referente ao termo da ligação de hidrogênio (V_{Hbond}); α_3 é o peso relativo ao termo que representa o potencial eletrostático (V_{elec}); e α_4 é o peso referente ao termo do potencial de dessolvatação (V_{desol}).⁸⁰

Termodinamicamente, a função de *scoring* pode ser interpretada como uma tentativa de aproximação dos potenciais químicos padrão ou da energia de Gibbs de um sistema (ΔG), isto é, do estado de equilíbrio.^{12,80} Neste contexto, uma importante relação termodinâmica permite determinar a constante de equilíbrio (K) de um sistema a partir de valores de ΔG . Esta relação pode ser utilizada para predições de valores de constante de inibição (K_i) a partir de resultados de função de *scoring* mediante a seguinte equação (2):

$$\Delta_r G^\ominus = -RT \ln K \quad (2)$$

onde $\Delta_r G^\ominus$ é o valor da variação da energia de Gibbs de formação de um complexo no estado de equilíbrio; R é a constante universal dos gases perfeitos ($1,985 \times 10^{-3}$ kcal/mol/K); T é a temperatura (298,15 K); \ln é o logaritmo natural ou neperiano; e K é a constante de equilíbrio.⁸¹

As três principais categorias de funções de *scoring* são as baseados na física, na experiência e no conhecimento. A primeira delas utiliza a equação fundamental da termodinâmica para a predição da energia de Gibbs. Para tanto, combina-se um método de cálculo da energia de Gibbs com um campo de força, o qual utiliza diferentes funções de energia potencial para representar a energia interna de uma molécula. Esse tipo de função de *scoring* leva em consideração a energia interna e os efeitos tanto do solvente quanto da entropia, de modo que a exatidão do cálculo da energia de Gibbs do sistema é considerada bastante satisfatória. O único ponto negativo é o elevado tempo exigido pelo processo computacional.¹²

Dentre os principais campos de força das funções de *scoring* baseadas na física, destacam-se o AMBER e o CHARMM. A segunda categoria de *scoring* (baseada em experiência), considera muitos fatores; porém, embora o tempo de cálculo seja substancialmente menor quando comparado ao da categoria anterior, perde-se no quesito exatidão. A última categoria, por sua vez, é determinada pela análise de bases de dados de estruturas de proteínas conhecidas, aplicando-se a distribuição de Boltzmann. Para tanto, avalia-se a estrutura do complexo em um experimento para definição das regras de interação

entre as substâncias envolvidas. Esta categoria é comumente utilizada para determinar a interação potencial entre um resíduo de aminoácido de uma proteína e resíduos de aminoácidos de uma segunda proteína a fim de se estabelecer o par de resíduos de aminoácidos que tem maior afinidade quando duas biomacromoléculas interagem entre si. Como consequência, apesar de rápido e de alto desempenho, este tipo de função de *scoring* é altamente dependente de dados previamente conhecidos da estrutura proteica, fato que dificulta a análise de detalhes envolvendo a interação de um ligante pequeno com uma biomacromolécula.¹²

Quando a estrutura 3D da proteína de escolha foi obtida experimentalmente na presença de um ligante que se complexou a ela durante o ensaio empírico, uma importante etapa de validação do protocolo de ancoragem molecular se faz necessária: o reancoramento/*redocking* ou o *cross-docking*. No primeiro procedimento citado, realiza-se o *docking* da proteína com o ligante cocristalizado a ela e compara-se a pose de melhor *score* com a posição determinada experimentalmente para este ligante mediante o cálculo da raiz do desvio médio quadrático (RMSD).⁸² Já no segundo procedimento supracitado, efetua-se o *docking* do ligante cocristalizado com a mesma proteína, porém obtida a partir de um ensaio experimental conduzido por pesquisadores diferentes, e, portanto, depositada em um banco de dados, e.g. PDB, com um novo código.⁸³ O nível de confiabilidade dos resultados de *docking* é considerado satisfatório quando os valores de RMSD são inferiores a 2,0 Å, de acordo com a seguinte equação (3):^{80,82,83}

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [(x_{x,i} - x_{p,i})^2 + (y_{x,i} - y_{p,i})^2 + (z_{x,i} - z_{p,i})^2]}{N}} \quad (3)$$

onde x_x , y_x e z_x são as coordenadas experimentais para o ligante, enquanto x_p , y_p e z_p são as coordenadas atômicas para a posição gerada pela simulação de ancoragem molecular. Quando a soma é calculada, consideram-se todos os N átomos presentes na estrutura do ligante, com exceção dos átomos de hidrogênio.⁸⁰

Há uma vasta gama de softwares de *docking* disponíveis no mercado.⁷⁷ Dentre os mais de 50 pacotes de programas existentes, o AutoDock Vina ou simplesmente Vina, um software de *docking* semiflexível, de fácil utilização e de simples configuração de parâmetros, é uma das ferramentas mais usadas atualmente para estudos *in silico* da interação entre ligantes pequenos flexíveis e biomacromoléculas rígidas. O Vina foi criado em 2010 como uma proposta de versão

atualizada do software AutoDock 4, desenvolvido em 2009 pelo mesmo laboratório de pesquisa californiano que fundou a suíte MGLTools, a qual inclui o software AutoDockTools (ADT). Durante esta atualização, a taxa de sucesso e o tempo de cálculo foram substancialmente aprimorados mediante tanto o uso de uma nova função de *scoring* para prever as conformações mais plausíveis quanto a implementação de um eficiente algoritmo de otimização/minimização energética baseado nesta nova função de *scoring* para estimar a afinidade entre uma proteína e um ligante.¹² Este algoritmo é o ILS *global optimizer*, um tipo de algoritmo heurístico MC combinado com um método de otimização baseado em gradiente, denominado BFGS e considerado uma eficiente metodologia *quasi-Newton* para otimização local. Como resultado positivo, a eficiência deste algoritmo de busca do Vina garante melhores resultados de *docking* com menos funções de *scoring* quando comparado ao algoritmo genético Lamarckiano associado ao método de busca local “*Solis-Wets*” do AutoDock 4 (AD4).^{84,85}

O AD4 utiliza um modelo de função de *scoring* semiempírica baseado na física e derivado de uma versão do campo de força AMBER, o qual leva em consideração forças de van der Waals (hidrofóbicas), representadas pelo potencial de Lennard-Jones 12-6, forças eletrostáticas, simbolizadas pelo potencial de Coulomb, ambas descritas na função a seguir (4), e potenciais relativos a ligações de H direcionais, bem como contribuições aditivas de dessolvatação e penalizações simples de entropia conformacional relacionada ao número de ligações rotacionáveis/com flexibilidade torcional presentes no ligante.^{84,85}

$$V = \sum_{i,j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (4)$$

em que V é o potencial de Lennard-Jones 12-6 somado ao potencial de Coulomb; a soma envolve todos os pares de átomos i,j , normalmente excluindo átomos separados por três ligações covalentes consecutivas; os átomos i,j são separados por uma distância r_{ij} e têm cargas q_i e q_j , respectivamente; ϵ_{ij} é a profundidade do potencial entre as barreiras atrativa e repulsiva; σ_{ij} é a distância finita na qual o potencial intermolecular é zero; e ϵ_0 é a permissividade do espaço livre.⁸⁶

A função de *scoring* do software Vina, por outro lado, é completamente empírica, e nela as forças eletrostáticas e as contribuições de dessolvatação são desconsideradas, de modo que o cálculo leva em conta um potencial que descreve as forças de van der Waals e os efeitos

estéricos que são caracterizados por duas funções Gaussianas de atração e por um termo de repulsão. Além disso, a função de *scoring* do Vina considera um segundo termo hidrofóbico, assim como ligações de H e penalizações simples de entropia conformacional relacionada ao número de ligações rotacionáveis.^{84,85,87} Esta função (c) é descrita da seguinte forma (5):

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (5)$$

onde c é a função de *scoring* do Vina; a soma envolve todos os pares de átomos que podem se mover um em relação ao outro, normalmente excluindo átomos separados por três ligações covalentes consecutivas; cada átomo i é atribuído a um tipo t_i , e um conjunto simétrico de interação definido pelas funções $f_{t_i t_j}$ da distância interatômica r_{ij} deve ser definido; o valor c deve ser visto como uma soma de contribuições de interações intra e intermoleculares.⁸⁷

Ademais, o algoritmo de otimização do Vina prediz onde e como um ligante melhor interage com uma proteína específica mediante repetições dos cálculos, aplicando-se diferentes aleatoriedades, na tentativa de encontrar o mínimo global de c . Neste sentido, o parâmetro exaustividade (“*exhaustiveness*”) controla o número de vezes que o cálculo será repetido. Repetir o cálculo da interação proteína-ligante poderia ocasionar variações dos resultados devido à randomização. Todavia, pelo fato de o usuário ter a possibilidade de estabelecer o conjunto inicial de vetores (“*seed*”) do algoritmo, os resultados de *docking* gerados são reprodutíveis. A energia livre prevista da melhor interação proteína-ligante é calculada a partir do viés intermolecular da conformação do ligante de *scoring* mais baixo. Neste contexto, um elevado número de ligações rotacionáveis no ligante assim como o estabelecimento de interações repulsivas entre proteína e ligante caracterizam uma baixa afinidade proteína-ligante. Por outro lado, ligações de H e contatos hidrofóbicos contribuem para aumentar a afinidade do ligante pela proteína. No manual de uso do Vina, a porção da superfície proteica onde o ligante interage é especificada pelas coordenadas de um cubo imaginário, o qual representa a caixa de ancoragem (“*docking box*”), denominada espaço de busca do algoritmo (“*search space*” ou “*grid box*”).⁸⁷

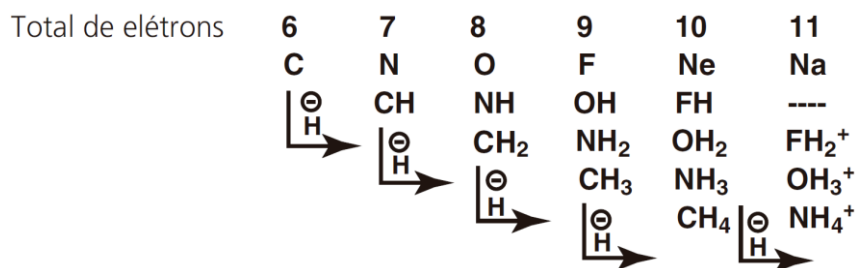
Outra importante vantagem do Vina é a possibilidade de realização de análises em paralelo, utilizando-se computadores com múltiplos núcleos para obtenção de resultados em um menor intervalo de tempo. Isso é possível, pois os cálculos repetidos são independentes, visto que o Vina cria múltiplos “*threads*” (menores sequências possíveis de instruções de

programação que podem ser conduzidas independentemente). A seguir, o algoritmo de otimização mantém os conjuntos de diversos valores mínimos obtidos em análises separadas nos múltiplos núcleos e compila-os durante os estágios subsequentes de refinamento da estrutura e agrupamento de resultados. O Vina foi criado para ser compatível com os formatos dos arquivos usados pelo AD4, de maneira que seu uso é facilitado pelas ferramentas auxiliares disponíveis na suíte do AutoDock, como, por exemplo, o preparo dos ligantes, a escolha do “*search space*” e a visualização dos resultados.⁸⁷

2.3.3 Bioisosterismo

Isosterismo foi um termo utilizado por *Langmuir* em 1919 para definir a relação entre um conjunto de substâncias, denominadas isósteros, cujas moléculas, átomos, grupamentos ou radicais compartilhavam formato e tamanho semelhantes, bem como propriedades físico-químicas análogas.^{8,9,88} Posteriormente, este mesmo pesquisador deduziu, utilizando a teoria do octeto, que o número de elétrons na camada de valência era igual entre isósteros.⁸ A seguir, em 1925, o pesquisador *Grimm* elaborou melhor o conceito de isosterismo mediante a proposta da lei empírica de deslocamento de hidreto ou simplesmente regra do hidreto, segundo a qual a adição de um átomo de hidrogênio a um átomo qualquer origina um pseudoátomo que apresenta as mesmas propriedades físicas dos átomos de elementos químicos presentes na coluna vertical da tabela periódica imediatamente posterior à coluna vertical do átomo original (sem o hidrogênio adicionado).^{8,9,89} A Figura 10, extraída de Barreiro e Fraga (2015), exemplifica o conceito de *Grimm*:

Figura 10 – Regra do hidreto de *Grimm*

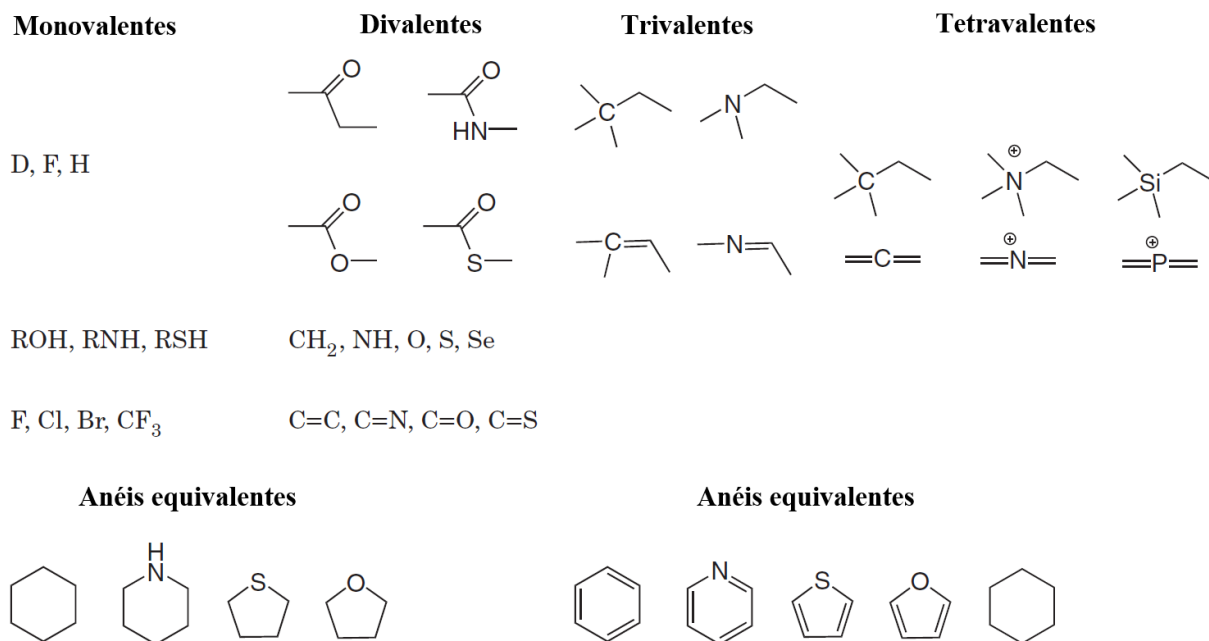


Fonte: BARREIRO; FRAGA (2015).

Em 1932, *Erlenmeyer* propôs uma ampliação do termo isosterismo mediante a definição de isósteros como sendo átomos, moléculas ou íons que apresentavam o mesmo número de elétrons na camada de valência. Neste sentido, os elementos químicos pertencentes à mesma coluna vertical da tabela periódica foram definidos como isósteros entre si. O termo bioisosterismo foi introduzido por *Friedman* apenas no início da década de 50, na medida em que ele previu uma aplicação do isosterismo no âmbito da atividade biológica de agonismo ou de antagonismo.^{8,9,88,89} A seguir, *Thornber* ampliou o termo bioisósteros para subunidades ou grupos de moléculas que possuíam propriedades físico-químicas cujos efeitos biológicos eram semelhantes.^{9,89} Segundo Meanwell (2021), os bioisósteros são metáforas estruturais que mimetizam uma funcionalidade biologicamente ativa. Neste contexto, interpretações modernas de bioisosterismo evoluíram e tornaram-se mais expansivas, considerando o reconhecimento biológico e a função como princípios mais fundamentais em detrimento das restrições passadas de tamanho, forma e propriedades físico-químicas.⁸⁸

Em 1970, Alfred Burger classificou e subdividiu os bioisósteros nas duas seguintes categorias principais: clássicos e não clássicos. A primeira categoria mencionada agrupou átomos, subunidades moleculares e grupamentos funcionais de mesma valência em cinco grupos: monovalentes, divalentes, trivalentes, tetravalentes e anéis aromáticos eletronicamente equivalentes.^{9,88} Por outro lado, todos os bioisósteros que não se encaixaram em nenhum dos tipos desta categoria, pois desobedeciam a definições eletrônicas e/ou de efeito estérico, foram categorizados como não clássicos. Na maioria dos casos, estes bioisósteros não clássicos não têm o mesmo número de átomos do grupamento substituído.^{8,9} Eles foram agrupados segundo quatro princípios químicos; são eles: funcional, retroisosterismo, bióforo ou pontos isostéricos, e anelação ou retroanelação. O primeiro princípio refere-se à troca de um grupamento funcional. O segundo, por sua vez, diz respeito à modificação por inversão de posição de um determinado átomo ou conjunto de átomos em um grupo funcional. Já o terceiro princípio se trata da alteração de subunidades estruturais com sítios de interação equivalentes com biorreceptores. Por fim, a anelação ou retroanelação engloba substituições de grupamentos cíclicos por acíclicos e de grupamentos funcionais por outros eletronicamente diferentes dos originais.⁸² No âmbito da descoberta de novos fármacos, a aplicação do bioisosterismo não clássico tem sobreposto à do bioisosterismo clássico.⁹ As Figuras 11 e 12, adaptadas de Meanwell (2021), exemplificam praticamente todos os tipos de bioisósteros supracitados.

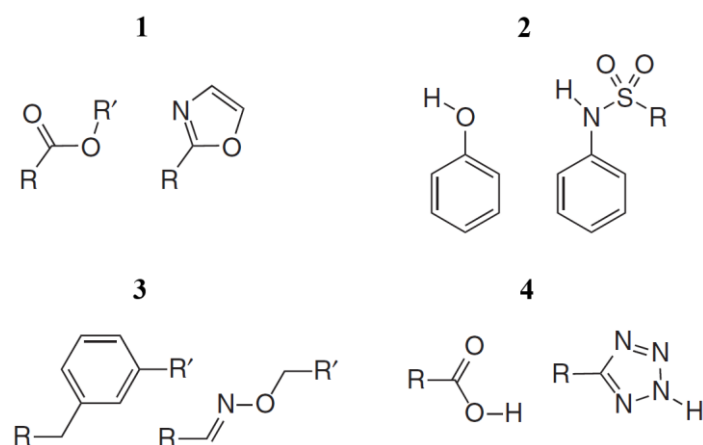
Figura 11 – Exemplos de bioisósteros clássicos segundo os grupos aos quais eles pertencem



Fonte: MEANWELL (2021).

Nota: O exemplo da troca bioisostérica de H por F ou de F por H é enquadrado como não clássico por Barreiro e Fraga (2015), devido à desobediência da regra da valência de átomos; essa justificativa foi rotunda o bastante para que tal enquadramento fosse adotado nesta figura.

Figura 12 – Exemplos de 4 pares de bioisósteros não clássicos



Fonte: MEANWELL (2021).

Durante o desenho racional de novos fármacos por bioisosterismo, ocorrem substituições de grupamentos químicos de compostos líderes. Como resultado, obtêm-se séries inovadoras de compostos congêneres candidatos a novos fármacos.^{9,89,90} Os compostos líderes supracitados devem apresentar estrutura química conhecida e mecanismo de ação bem

estabelecido; se possível, é de grande valia conhecer o grupamento farmacofórico e o modo de interação com a biomacromolécula.^{9,89} Embora nem sempre seja fácil prever o efeito que modificações estruturais acarretarão na esfera da atividade biológica, as propriedades físicas, isto é, influências eletrônicas, estéricas e hidrofóbicas de grupamentos substituídos por bioisosterismo, são bem conhecidas.⁸⁹ Todavia, a predição mais acertada de uma relação bioisostérica requer o entendimento das vias de inativação do metabolismo do fármaco, assim como dos principais fatores estruturais que determinam as propriedades físico-químicas responsáveis por regular a biodisponibilidade e os efeitos adversos do mesmo.^{9,89}

Deveras, o uso correto do bioisosterismo requer conhecimentos prévios das propriedades físico-químicas, bem como de parâmetros eletrônicos e conformacionais envolvidos no planejamento de uma substituição bioisostérica, a fim de que eventuais alterações das propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas do fármaco original, incluindo a biodisponibilidade, sejam teoricamente previstas. Toda substituição bioisostérica deve ser rigorosamente precedida pela análise cuidadosa dos seguintes parâmetros: 1) tamanho, volume e distribuição eletrônica dos átomos, assim como considerações sobre o grau de hibridização, polarização, ângulos de ligação e efeitos indutivos e mesoméricos da ancoragem; 2) grau de solubilidade lipídica e aquosa, para que se prevejam alterações físico-químicas, como, por exemplo, de Log P e de pKa; 3) reatividade química de grupos funcionais ou de subunidades estruturais bioisostéricas, principalmente para a previsão de alterações significativas nos processos de biotransformação, incluindo eventuais mudanças nos perfis de toxicidade dos principais metabólitos formados; 4) fatores conformacionais, incluindo diferentes capacidades de formação de ligações de H tanto intermoleculares quanto intramoleculares. Alguns grupos bioisostéricos alteram radicalmente as propriedades físico-químicas de substâncias e, por conseguinte, as atividades biológicas delas. Um exemplo clássico é a substituição do grupamento hidroxila (-OH) pelo grupamento amina (-NH₂); quando ligados a um anel benzênico, obtém-se anilina a partir de um fenol, e as propriedades ácido-base destes compostos são conhecidamente opostas.⁹

Existem várias razões para se utilizar a estratégia de bioisosterismo no desenvolvimento de novos fármacos, dentre as quais destacam-se: a necessidade de melhorar a atividade farmacológica e simultaneamente diminuir os efeitos adversos, otimizar parâmetros farmacocinéticos de compostos líderes, ou ainda ganhar seletividade para um determinado receptor ou subtipo de isoforma enzimática.^{9,90}

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, foi proposta a pesquisa das estruturas 3D das proteínas M^{pro} e PL^{pro} na base de dados do Uniprot. O código P0DTC1 foi escolhido, pois ele passou por revisão e apresenta anotações cuja pontuação é máxima.⁹¹ Os códigos PDB das estruturas 3D escolhidas para a M^{pro} e a PL^{pro} são, respectivamente, 7VU6 e 7JN2, e seus valores de resolução, 1,80 Å e 1,93 Å.⁹² Esta escolha foi baseada nas estruturas 3D com valores de resolução abaixo de 2,00 Å que melhor evidenciaram as diferenças entre potenciais de inibição determinados experimentalmente para os ligantes-controlados a serem mencionados posteriormente. Tanto 7VU6 quanto 7JN2 foram baixadas no formato *.pdb pelo website RCSB PDB.^{93,94} Primeiramente, estas proteínas tiveram os grupamentos químicos de seus aminoácidos protonados em pH 7,4 e moléculas de água removidas pelo software *ProteinPrepare* da plataforma PlayMolecule.^{95,96} Esta etapa é especialmente importante para determinação tanto do estado de protonação quanto da localização do hidrogênio no aminoácido histidina (His), o qual pode assumir três diferentes estados. Os dois primeiros são neutros e tautômeros entre si; a diferença entre eles consiste na localização do próton. Neste sentido, quando o hidrogênio do anel imidazólico do aminoácido His está ligado ao nitrogênio épsilon, ele é identificado pela sigla “Hie” ou “HIE”; por outro lado, quando o mesmo hidrogênio se liga ao nitrogênio delta do anel imidazólico, o aminoácido His passa a ser identificado pela sigla “Hid” ou “HID”. O terceiro e último estado de protonação deste aminoácido é identificado pela sigla “Hip” ou “HIP” e possui hidrogênios ligados aos dois nitrogênios supracitados, fato que confere a ele carga positiva.⁹⁷ Subsequentemente, fazendo uso do software ADT v1.5.7, outras entidades moleculares indesejáveis foram removidas de ambas as proteínas. Finalmente, cargas de Kollman e átomos de hidrogênio polares foram adicionados às estruturas proteicas, as quais puderam, então, ser salvas no formato *.pdbqt.

Os ligantes precursores a ser trabalhados no bioisosterismo foram selecionados no website DrugBank mediante aplicação dos seguintes filtros na seção de “*Categories*”: “*Amides*”; “*Integrase Inhibitors*”; “*Protease Inhibitors*”; “*Antiviral agents*”; e “*Tyrosine Kinase Inhibitors*”.⁹⁸ Estes filtros foram escolhidos com base na potencialidade estrutural que entidades moleculares englobadas por eles apresentariam para se tornarem substâncias químicas peptidomiméticas. Após a avaliação visual de 1050 moléculas obtidas pelos filtros supracitados, 126 delas, representando fármacos já aprovados no mercado farmacêutico ou em fase investigativa de estudos clínicos, foram selecionadas para serem ligantes precursores. As estruturas 3D destas substâncias foram obtidas na biblioteca do website PubChem no formato

*.sdf.⁹⁹ Essas moléculas foram então modificadas mediante uso do software MB-Isoster, o qual possibilitou a criação de 831 derivados por bioisosterismo.¹⁰⁰ Ademais, com base em resultados de IC₅₀ obtidos a partir de experimentos *in vitro* de outros pesquisadores, para cada proteína, 2 ligantes-controle pertencentes à subclasse de inibidores não covalentes foram escolhidos. Para a M^{pro}, as moléculas escolhidas foram: *ensitrelvir* e *baicalein*, cujos valores de IC₅₀ são, respectivamente, 13 e 940 nM.^{101,102} Para a PL^{pro}, por sua vez, os ligantes escolhidos foram: X8-83 e Jun9-13-7, cujos valores de IC₅₀ são, respectivamente, 210 e 7300 nM.^{103,104,105} A maioria das estruturas 3D foram encontradas no website PubChem, enquanto aquelas que não estavam disponíveis na biblioteca deste website foram desenhadas e otimizadas no software MarvinSketch v21.20. Os ligantes precursores e os derivados por bioisosterismo que apresentam centros estereogênicos não tiveram seus diferentes isômeros quirais analisados, de modo que apenas um destes isômeros foi avaliado. Posteriormente, estados de ionização em pH 7,4 foram gerados pela ferramenta OpenBabel v3.1.1, a qual também foi utilizada para conversão de todos os ligantes para o formato *.pdbqt, incluindo os precursores baixados no PubChem e os derivados por bioisosterismo concebidos. Porém, moléculas contendo amins terciárias, sulfonamidas, amins secundárias cíclicas e hidroxilas aromáticas precisaram ter seus estados de ionização em pH 7,4 gerados pelo software MarvinSketch v21.20. Além disso, nos casos de ligantes com estado de ionização/espécie química predominante menor do que 80%, as espécies mais abundantes em pH 7,4 foram consideradas. Nas tabelas 1, 2, 3 e 4, que serão apresentadas na etapa de resultados e discussão, os valores de *score* das diferentes espécies aparecerão em uma mesma linha, por ordem decrescente de abundância e separados por uma barra (/). Valores iguais serão representados pelo símbolo (*). Ademais, as imagens das estruturas 2D de cada ligante com seus estados de protonação em pH 7,4 já considerados serão adicionadas às tabelas supracitadas para uma melhor visualização das modificações bioisostéricas, bem como para a observância da influência do pH sobre a ionização das moléculas em estudo. Nos casos de ligantes com mais de uma espécie química principal, a gravura da espécie que se encontra em maior percentual de abundância foi adicionada.

Os estudos de ancoragem molecular foram realizados mediante uso do software AutoDock Vina v1.1.2.⁸⁷ A versão 1.1.2 do AutoDock Vina foi escolhida ao invés da mais nova (1.2) pois existe um script nos servidores do laboratório MolMod-CS que é compatível com a versão 1.1.2 e permite realizar estudos de docking em modo de batelada; portanto, diversos resultados podem ser gerados em um curto intervalo de tempo. A versão 1.2, por outro lado, é incompatível com o arquivo de saída .log, de modo que os resultados de energia de ligação de todos os resultados de ancoragem não seriam conhecidos se esta versão substituísse a versão

1.1.2. Além disso, em relação aos resultados de energia de ligação, não houve diferenças significativas entre essas versões quando testadas em estudos de docking unitário com a mesma enzima e o mesmo ligante. Para garantir que os ligantes interagiriam com o sítio ativo de cada proteína, os cálculos de acoplamento molecular foram delimitados, no software ADT v1.5.7, por espaços de busca, chamados de “*grid boxes*”, nos quais os algoritmos de busca do Vina testam diferentes conformações dos ligantes para determinar a conformação que se complexa mais favoravelmente com a proteína-alvo. Neste sentido, as delimitações dos espaços de busca supracitados foram baseadas em valores de localização e em tamanhos específicos das coordenadas cartesianas x, y e z. Sendo assim, para a estrutura 7VU6, os valores de localização e os tamanhos escolhidos para a delimitação do espaço de busca em seu sítio ativo foram, respectivamente, os seguintes: x = 6,025, y = 12,623, z = -6,436; x = 25,0 Å, y = 25,0 Å, z = 25,0 Å. Para o sítio ativo da estrutura 7JN2, por sua vez, foram: x = 45,346, y = 27,456, z = 1,935; x = 25,0 Å, y = 25,0 Å, z = 25,0 Å. No caso da enzima M^{Pro} foram estudados ainda dois sítios alostéricos previamente descritos por Gunther *et al.* (2021). Com base nos resultados *in silico* e experimentais evidenciados por estes pesquisadores, os seguintes ligantes-controle adicionais foram escolhidos: Pelitinib e AT-7519.⁵³ Para o primeiro sítio alostérico, os valores de localização e os tamanhos escolhidos para a delimitação do espaço de busca foram, respectivamente, os seguintes: x = 23,625, y = -12,883, z = 33,478; x = 25,0 Å, y = 25,0 Å, z = 25,0 Å. Para o segundo sítio alostérico, por sua vez, foram: x = 10,647, y = -7,993, z = 23,613; x = 25,0 Å, y = 25,0 Å, z = 25,0 Å.

Todos os resultados foram analisados a partir de uma perspectiva de energia de ligação (fornecida em -Kcal/mol) e organizados em uma ordem crescente de energia (do valor mais negativo para o mais positivo), com o objetivo de determinar os melhores perfis de interação. Ademais, os valores de K_i foram preditos mediante criação, no Microsoft Excel, da seguinte fórmula, a qual equivale à equação 2, apresentada na revisão da literatura, após isolamento da constante de equilíbrio K: $K_i = e^{(\Delta G/RT)}$, igualmente utilizada por Ortiz e colaboradores (2019).

Em seguida, uma vez que os resultados mais favoráveis tinham sido obtidos, as conformações mais bem classificadas de cada ligante foram complexadas com cada proteína, e o complexo foi salvo no formato *.pdb, mediante utilização do software PyMOL v2.5.2. Neste contexto, a fim de dissecar perfis de interação, forças intermoleculares, como, por exemplo, ligações de H, foram determinadas por meio de representações 2D e 3D do complexo ligante-proteína, no software Discovery Studio Client v21.1.0.20298. Além disso, a complementaridade proteína-ligante em 3D foi avaliada no software Pymol v2.5.2. Finalmente,

para validar as simulações *in silico*, o *redocking* foi executado, e, a seguir, os valores de RMSD foram calculados pelo software Discovery Studio v21.1.0.20298.

Por fim, um estudo de aspectos de drogabilidade (regras de Lipinski/Veber, alertas estruturais e acessibilidade sintética) e de lipofilicidade (Log P), assim como de outras propriedades físico-químicas e de parâmetros farmacocinéticos (de ADMET) foram efetuados com os melhores derivados contendo bioisósteros, bem como com os seus precursores e com os ligantes-controle, através das plataformas SwissADME e ADMETlab 2.0.^{107,108} Para tanto, os códigos SMILES dos ligantes precursores e dos ligantes-controle foram adquiridos na base de dados do website PubChem, enquanto os códigos SMILES de todos os derivados por bioisosterismo foram concebidos pela ferramenta OpenBabel v3.1.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os ligantes precursores foram nomeados segundo os seus respectivos códigos de identificação do DrugBank (*DrugBank Accession Number*). Aos derivados por bioisosterismo concebidos, além destes códigos, foi adicionada a terminação “_BI” seguida da numeração “_00X” ou “_0X”, necessária para evidenciar o número de mudanças bioisostéricas cumulativas realizadas. Os ligantes-controle, por outro lado, foram nomeados de acordo com seus nomes de batismo ou códigos fornecidos pelos seus criadores nas publicações que os tornaram conhecidos pela comunidade científica. No caso do ensitrelvir, dois ligantes foram avaliados, pois é sabido que este fármaco coexiste na forma de dois tautômeros, de maneira que se fez necessária a adição das numerações “_1” e “_2” para diferenciar os resultados de ancoragem molecular.⁹²

Em todas as tabelas, os ligantes-controle foram dispostos em ordem crescente de IC_{50} , enquanto os derivados e seus ligantes precursores, em ordem numérica crescente de seus respectivos códigos. As tabelas 1, 2, 3 e 4 elencam o número de carbonos quirais existentes em cada ligante, assim como o *score* obtido em cada resultado de *docking* realizado, e o K_i predito a partir do *score*. Ademais, para os derivados, detalhou-se a substituição bioisostérica efetuada e classificou-se o tipo de modificação realizada. Neste caso, todas as mudanças estruturais que resultaram em uma diminuição no número de carbonos quirais da molécula derivada foram enquadradas na estratégia de simplificação molecular.⁸² Os derivados incluídos nas tabelas 1, 2, 3 e 4 são aqueles cujas modificações finais (contendo os últimos bioisósteros) apresentaram valores preditos de $K_i < 1000$ nM, refletindo um $score \leq -8,2$ Kcal/mol. O valor de K_i para o nirmatrelvir, primeiro inibidor de M^{pro} aprovado por agências reguladoras ao redor do globo para uso emergencial no tratamento da COVID-19, é de, aproximadamente, 3,1 nM.¹⁰²

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continua)

Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
Ensitrelvir_1	0	NA	NA	-10,7	14,2

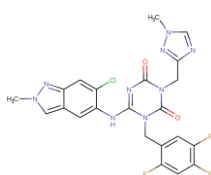


Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

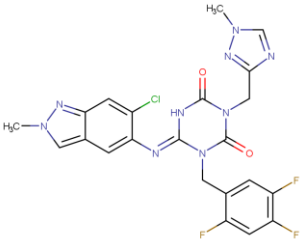
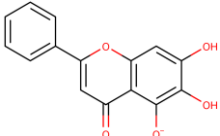
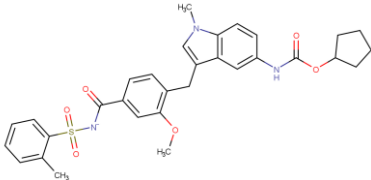
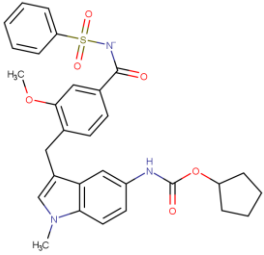
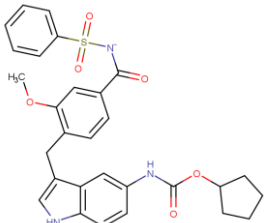
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
Ensitrelvir_2	0	NA	NA	-10,6	17,0
					
Baicalein	0	NA	NA	-8,3/ -8,1(*)	823,1/ 1153,6
					
DB00549	0	NA	NA	-8,5	587,2
					
DB00549_BI_001	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-7,7	2266,1
					
DB00549_BI_002	0	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,7	419,0
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

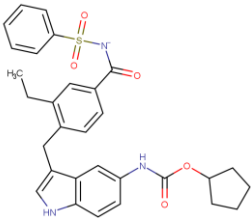
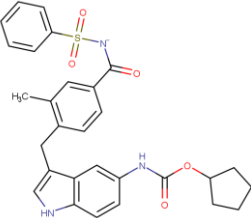
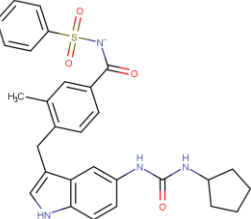
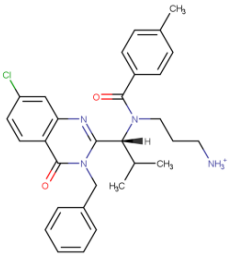
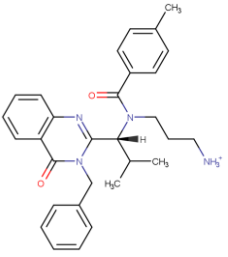
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB00549_BI_003	0	O por CH ₂	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,7	419,0
					
DB00549_BI_004	0	CH ₃ por H (3)	Bioisosterismo Não clássico	-8,0	1365,7
					
DB00549_BI_005	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,9	298,9
					
DB06188	1	NA	NA	-7,9	1616,8
					
DB06188_BI_001	1	Cl por H	Bioisosterismo Não clássico	-7,8	1914,1
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

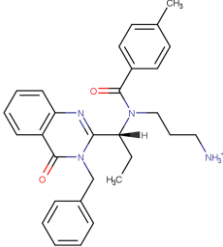
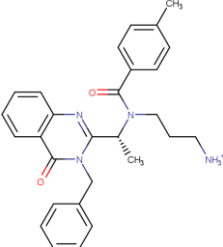
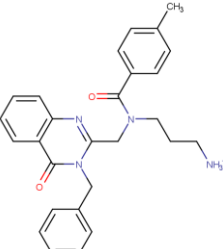
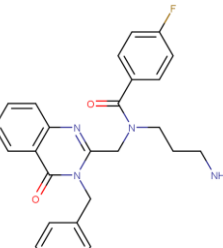
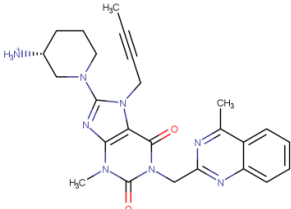
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB06188_BI_002	1	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-7,7	2266,1
					
DB06188_BI_003	1	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-7,9	1616,8
					
DB06188_BI_004	0	CH ₃ por H (3)	Bioisosterismo Não clássico	-8,1	1153,6
					
DB06188 BI 005	0	CH ₃ por F	Bioisosterismo Clássico monovalente	-8,5	587,2
					
DB08882	1	NA	NA	-8,4	695,2
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

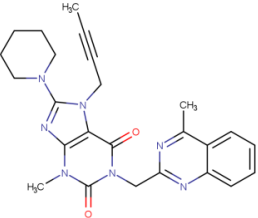
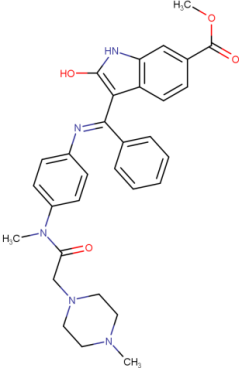
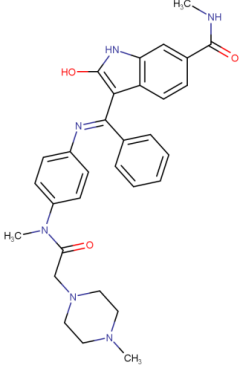
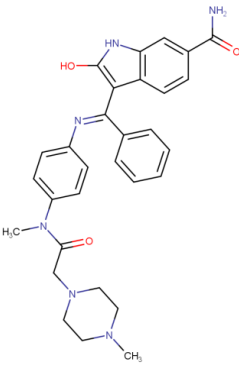
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB08882_BI_001	0	NH ₂ (NH ₃ ⁺) por H (no C quiral)	Bioisosterismo Não clássico/ Simplificação molecular	-8,5	587,2
					
DB09079	0	NA	NA	-8,2 ^(*)	974,4
					
DB09079_BI_001	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,5/-8,3	587,2/ 823,1
					
DB09079_BI_002	0	CH ₃ por H	Bioisosterismo Não clássico	-8,4/-8,2	695,2/ 974,4
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i (continuação)

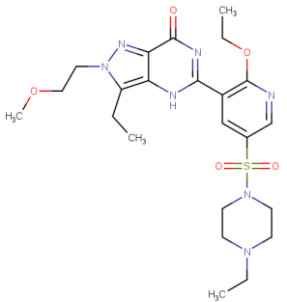
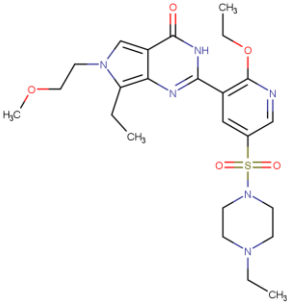
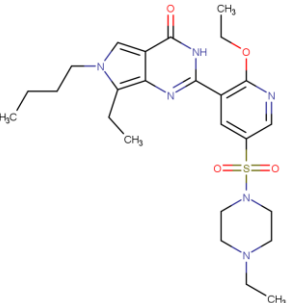
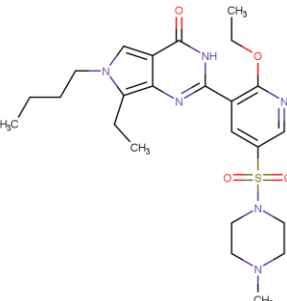
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
	0	NA	NA	-7,5	3176,1
	0	C=N por C=C	Bioisosterismo Clássico divalente	-7,4	3760,2
	0	O por CH ₂	Bioisosterismo Clássico divalente	-7,4	3760,2
	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-7,7	2266,1

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

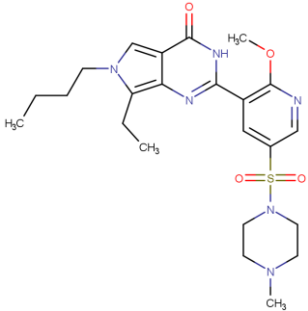
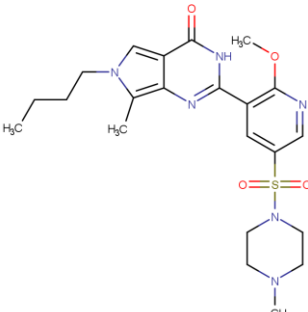
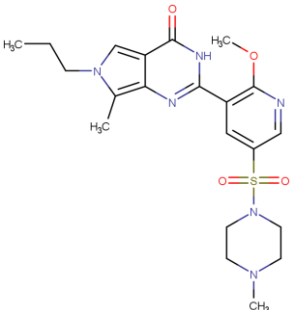
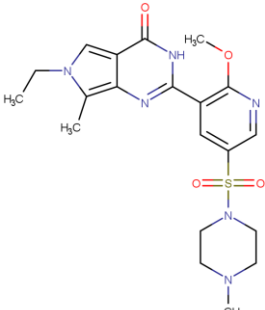
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB11902_BI_004	0	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-7,7	2266,1
					
DB11902_BI_005	0	CH ₃ por H (3)	Bioisosterismo Não clássico	-8,0	1365,7
					
DB11902_BI_006	0	CH ₃ por H (4)	Bioisosterismo Não clássico	-8,1	1153,6
					
DB11902_BI_007	0	CH ₃ por H (5)	Bioisosterismo Não clássico	-8,2	974,4
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

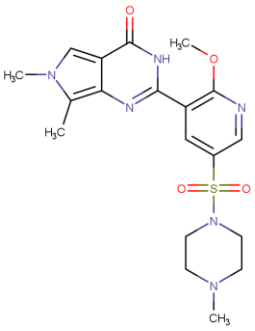
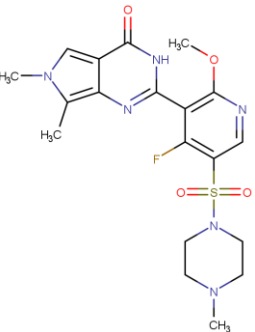
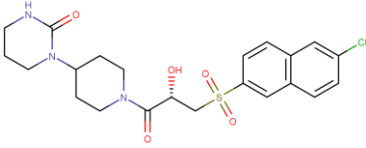
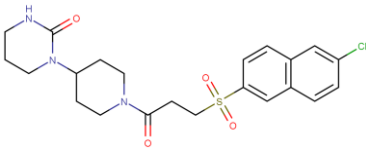
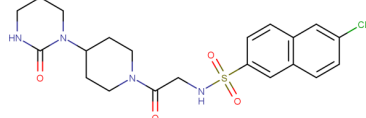
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB11902_BI_008	0	CH ₃ por H (6)	Bioisosterismo Não clássico	-8,5	587,2
					
DB11902_BI_009	0	H por F	Bioisosterismo Não clássico	-8,5	587,2
					
DB11984	1	NA	NA	-8,6	496,0
					
DB11984_BI_001	0	OH por H (no C quiral)	Bioisosterismo Não clássico/ Simplificação molecular	-8,5	587,2
					
DB11984_BI_002	0	CH ₂ por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-9,1	213,3
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i (continuação)

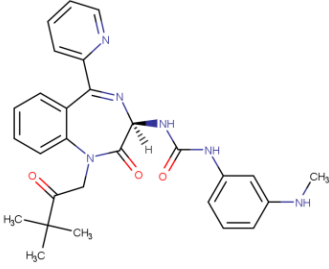
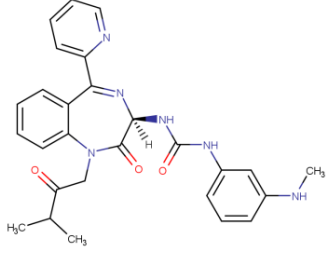
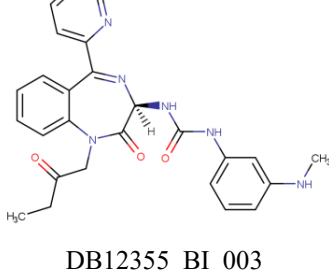
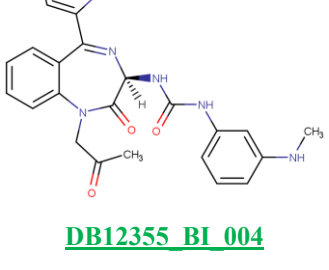
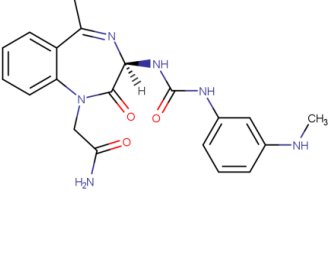
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB12355	1	NA	NA	-7,2	5270,1
					
DB12355_BI_001	1	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-7,9	1616,8
					
DB12355_BI_002	1	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,1	1153,6
					
DB12355_BI_003	1	CH ₃ por H (3)	Bioisosterismo Não clássico	-8,4	695,2
					
<u>DB12355_BI_004</u>	<u>1</u>	<u>CH₃ por NH₂</u>	<u>Bioisosterismo</u> <u>Clássico</u> <u>monovalente</u> <u>(funcional)</u>	<u>-8,9</u>	<u>298,9</u>
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

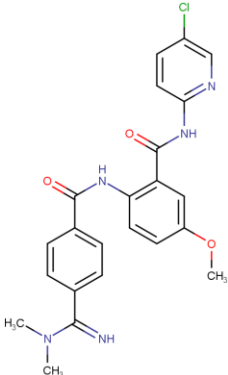
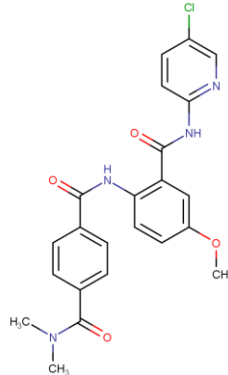
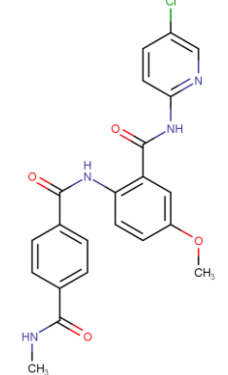
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB12364	0	NA	NA	-8,6	496,0
	0	C=N por C=O	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,7	419,0
	0	CH3 por H	Bioisosterismo Não clássico	-8,6	496,0
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

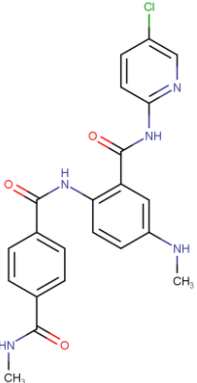
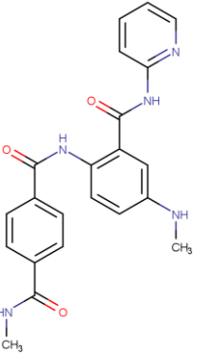
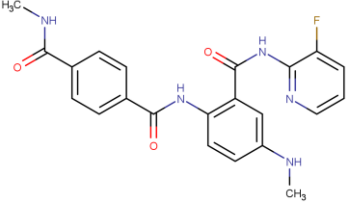
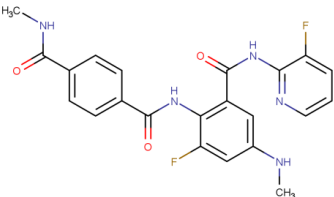
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB12364_BI_003	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,5	587,2
					
DB12364_BI_004	0	Cl por H	Bioisosterismo Não clássico	-9,1	213,3
					
DB12364_BI_005	0	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-9,4	128,5
					
DB12364_BI_006	0	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-9,5	108,6
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

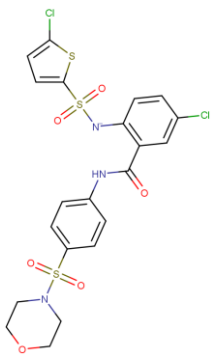
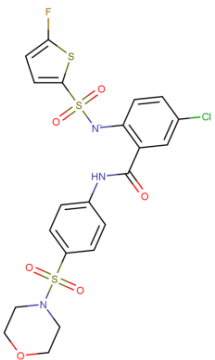
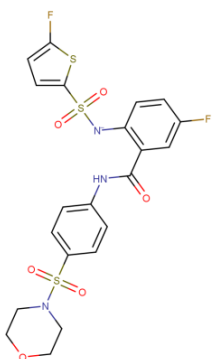
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB12805	0	NA	NA	-9,1	213,3
					
DB12805_BI_001	0	Cl por F (1)	Bioisosterismo Clássico monovalente	-8,2	974,4
					
DB12805_BI_002	0	Cl por F (2)	Bioisosterismo Clássico monovalente	-8,6	496,0
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i (continuação)

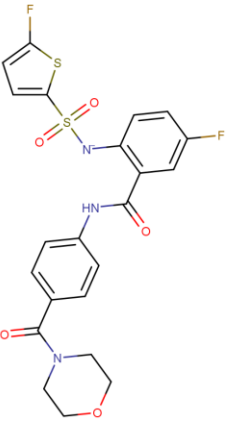
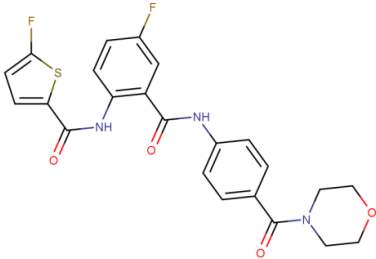
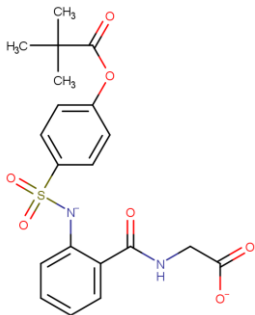
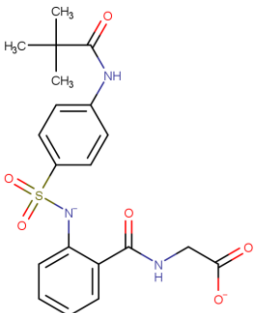
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB12805_BI_003	0	O=S=O por C=O (1)	Bioisosterismo Não clássico (funcional)	-9,0	252,5
					
DB12805_BI_004	0	O=S=O por C=O (2)	Bioisosterismo Não clássico (funcional)	-9,3	152,2
					
DB12863	0	NA	NA	-8,0	1365,7
					
DB12863_BI_001	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-7,7	2266,1
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

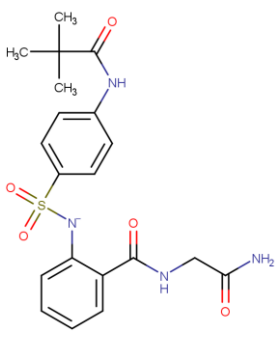
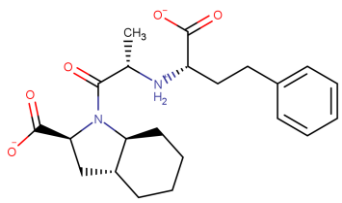
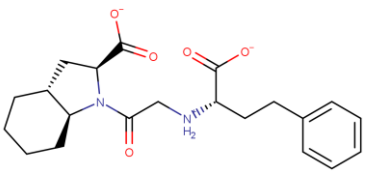
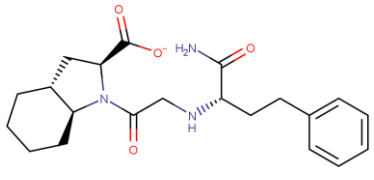
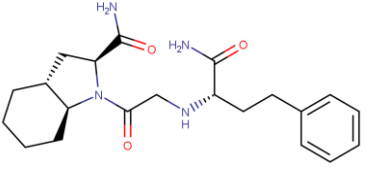
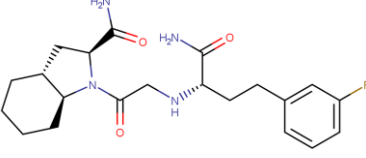
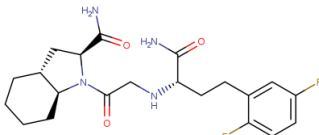
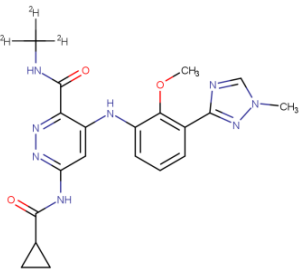
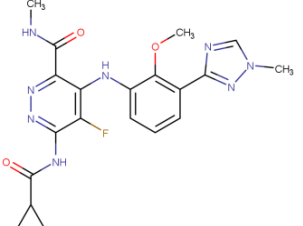
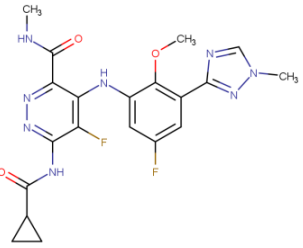
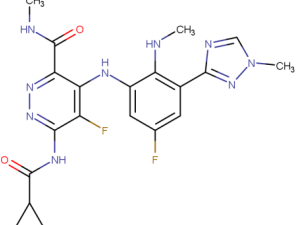
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB12863_BI_002	0	OH (O ⁻) por NH ₂	Bioisosterismo Clássico monovalente (funcional)	-8,5	587,4
					
DB14209	5	NA	NA	-7,6 ^(*)	2682,8
					
DB14209_BI_001	4	CH ₃ por H	Bioisosterismo Não clássico	-7,9 ^(*)	1616,8
					
DB14209_BI_002	4	OH (O ⁻) por NH ₂ (1)	Bioisosterismo Clássico monovalente (funcional)	-7,9/-7,6	1616,8/ 2682,8
					
DB14209_BI_003	4	OH (O ⁻) por NH ₂ (2)	Bioisosterismo Clássico monovalente (funcional)	-7,9 ^(*)	1616,8
					
DB14209_BI_004	4	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,1/-7,7	1153,6/ 2266,1
					

Tabela 1 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i (conclusão)

Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB14209_BI_005	4	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,5	587,4
					
DB16650	0	NA	NA	-8,9	298,9
					
DB16650_BI_001	0	² H por ¹ H e H por F (1)	Bioisosterismo Clássico monovalente/ Bioisosterismo Não clássico	-9,0	252,5
					
DB16650_BI_002	0	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,9	298,9
					
DB16650_BI_003	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-9,0	252,5
					

Fonte: do autor.

Nota: Todas as siglas e abreviaturas utilizadas encontram-se na lista de siglas e abreviaturas; os melhores resultados obtidos com as modificações bioisotéricas foram sublinhados e destacados em **negrito verde**.

Tabela 2 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 1 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continua)

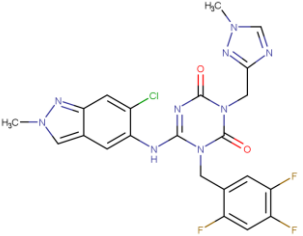
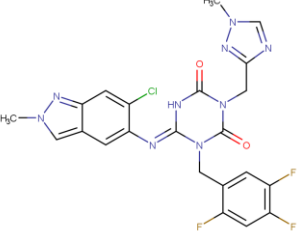
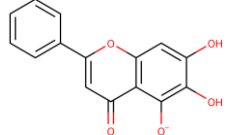
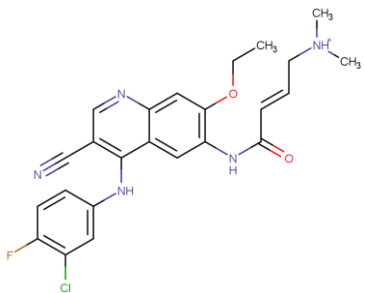
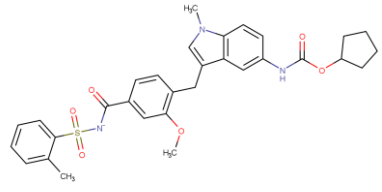
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
<p>Ensitrelevir_1</p> 	0	NA	NA	-8,3	823,1
<p>Ensitrelevir_2</p> 	0	NA	NA	-7,6	2682,8
<p>Baicalein</p> 	0	NA	NA	-6,7/- 6,6 ^(*)	12256,3/ 14510,1
<p>Pelitinib</p> 	1	NA	NA	-6,8	1035,3
<p>DB00549</p> 	0	NA	NA	-7,8	1914,1

Tabela 2 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 1 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

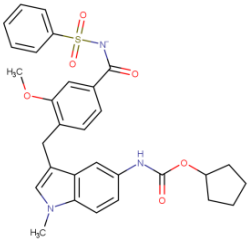
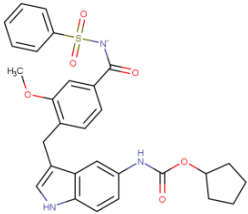
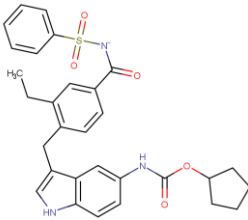
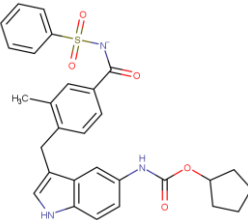
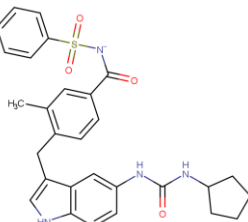
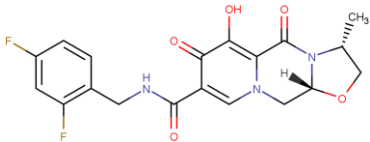
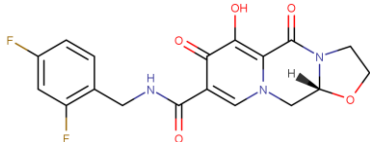
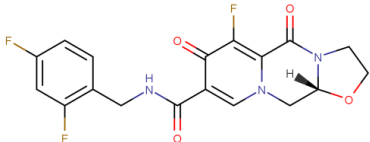
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB00549_BI_001	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-7,3	4451,6
					
DB00549_BI_002	0	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-7,6	2682,8
					
DB00549_BI_003	0	O por CH ₂	Bioisosterismo Clássico divalente	-7,6	2682,8
					
DB00549_BI_004	0	CH ₃ por H (3)	Bioisosterismo Não clássico	-7,4	3760,2
					
DB00549_BI_005	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,5	587,2
					

Tabela 2 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 1 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(conclusão)

Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB11751	2	NA	NA	-8,4	695,22
					
DB11751_BI_001	1	CH ₃ por H (no C quiral)	Bioisosterismo Não clássico/ Simplificação molecular	-8,0	1365,7
					
DB11751_BI_002	1	OH por F	Bioisosterismo Clássico monovalente	-8,5	587,2
					

Fonte: do autor.

Nota: Todas as siglas e abreviaturas utilizadas encontram-se na lista de siglas e abreviaturas.

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continua)

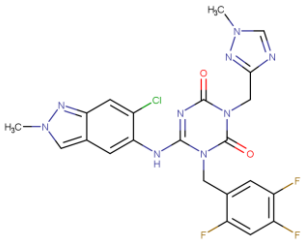
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
Ensirelvir_1	0	NA	NA	-8,0	1365,7
					

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

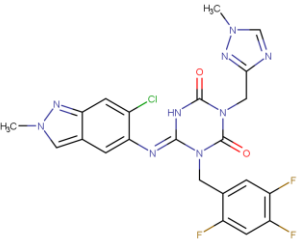
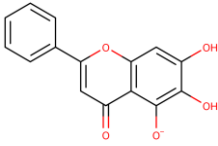
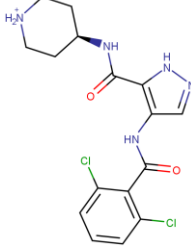
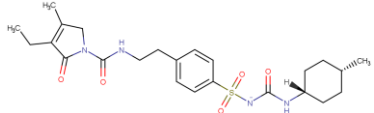
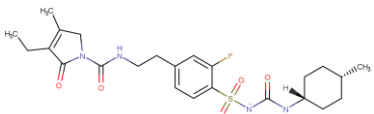
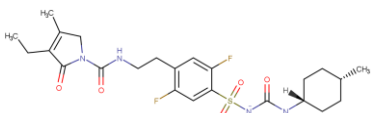
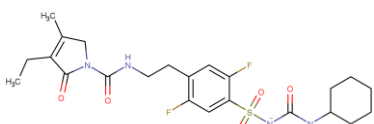
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
 <p>Ensitrelvir_2</p>	0	NA	NA	-9,3	152,2
 <p>Baicalein</p>	0	NA	NA	-7,9/ -7,5/ -7,7	1616,8/ 3176,1/ 2266,1
 <p>AT-7519</p>	1	NA	NA	-7,0	7386,4
 <p>DB00222</p>	2	NA	NA	-9,0	252,5
 <p>DB00222_BI_001</p>	2	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,8	353,9
 <p>DB00222_BI_002</p>	2	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-9,2	180,2
 <p>DB00222_BI_003</p>	0	CH ₃ por H (1) – no C quiral	Bioisosterismo Não clássico/ Simplificação molecular	-8,6	496,0

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

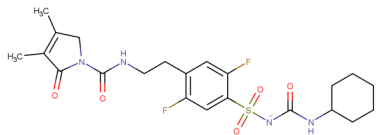
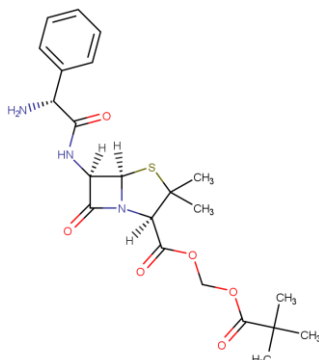
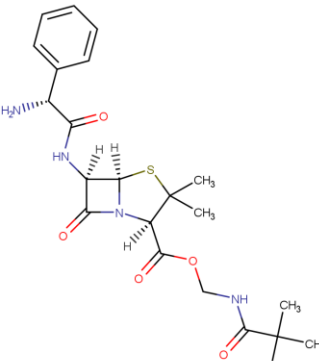
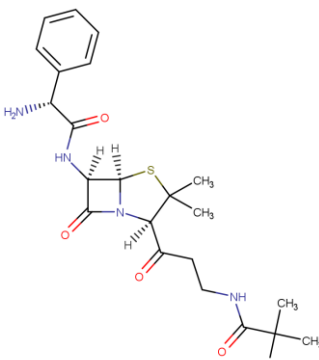
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB00222_BI_004 	0	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-9,2	180,2
DB01604 	4	NA	NA	-7,7 ^(*)	2266,1
DB01604_BI_001 	4	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-7,8 ^(*)	1914,1
DB01604_BI_002 	4	O por CH ₂	Bioisosterismo Clássico divalente	-7,8/-7,7	1914,1/ 2266,1

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

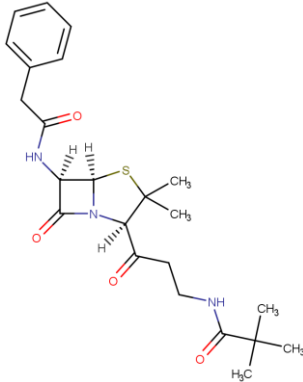
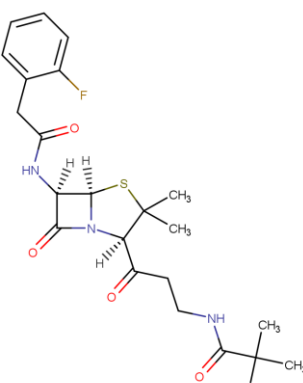
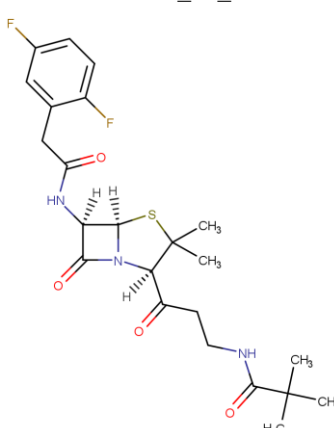
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB01604_BI_003	3	NH ₂ por H	Bioisosterismo Não clássico	-8,2	974,4
					
DB01604_BI_004	3	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,5	587,2
					
DB01604_BI_005	3	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,4	695,2
					

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

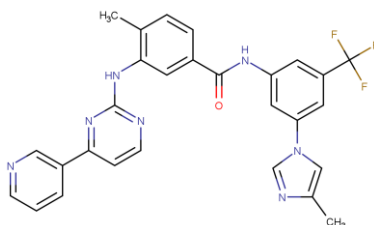
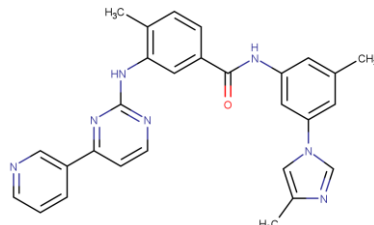
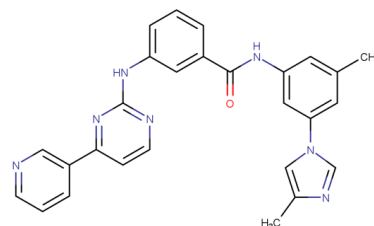
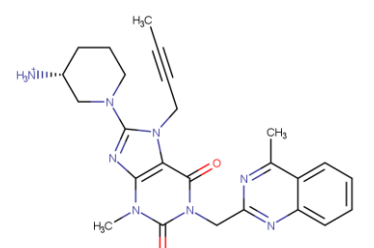
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB04868	0	NA	NA	-9,3	152,2
	0	CF ₃ por CH ₃	Bioisosterismo Não clássico	-9,3	152,2
DB04868_BI_001	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-9,2	180,2
	0	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-9,4	128,5
DB04868_BI_002	0	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-9,4	128,5
	1	NA	NA	-8,2	974,4
DB08882	1	NA	NA	-8,2	974,4
					

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

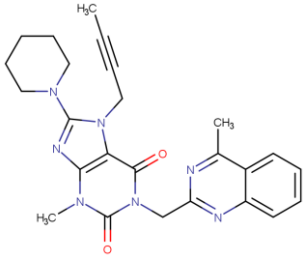
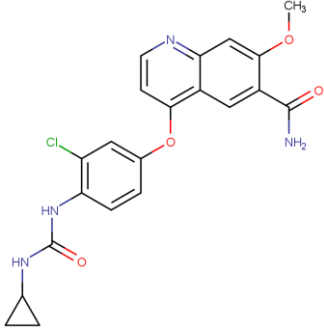
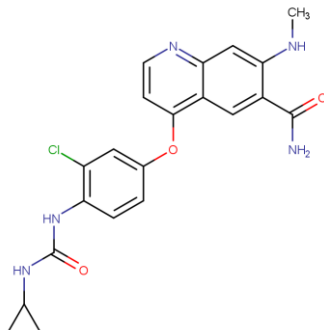
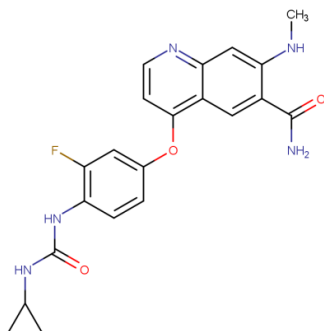
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB08882 BI 001 	0	NH ₂ por H (no C quiral)	Bioisosterismo Não clássico/ Simplificação molecular	-8,2	974,4
DB09078 	0	NA	NA	-8,7	419,0
DB09078_BI_001 	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,5	587,2
DB09078_BI_002 	0	Cl por F	Bioisosterismo Clássico monovalente	-9,0	252,5

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB09079	0	NA	NA	-8,2 ^(*)	974,4
DB09079_BI_001	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,2/-8,5	974,4/ 587,2
DB09079_BI_002	0	CH ₃ por H	Bioisosterismo Não clássico	-9,1 ^(*)	213,3

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

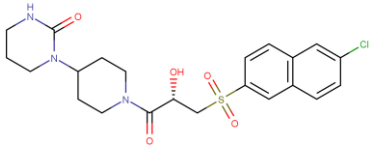
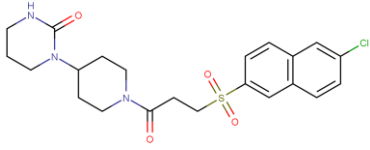
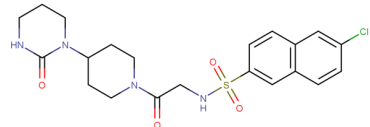
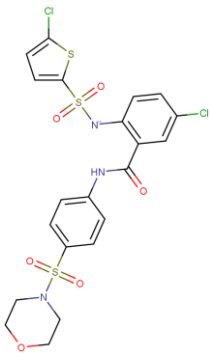
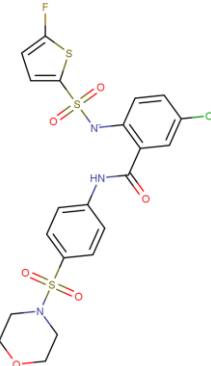
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB11984	1	NA	NA	-8,2	974,4
					
DB11984_BI_001	0	OH por H (no C quiral)	Bioisosterismo Não clássico/ Simplificação molecular	-8,1	1153,6
					
DB11984_BI_002	0	CH ₂ por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,7	419,0
					
DB12805	0	NA	NA	-8,1	1153,6
					
DB12805_BI_001	0	Cl por F (1)	Bioisosterismo Clássico monovalente	-8,2	974,4
					

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

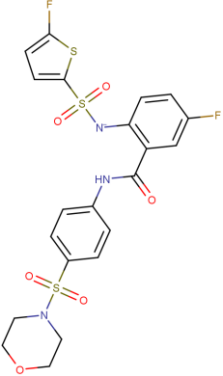
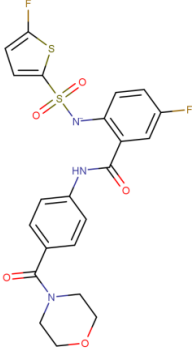
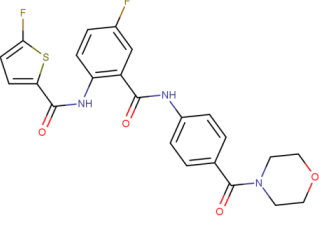
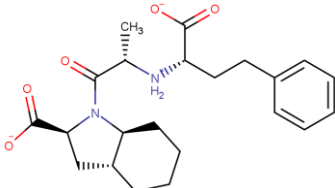
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB12805_BI_002	0	Cl por F (2)	Bioisosterismo Clássico monovalente	-8,1	1153,6
					
DB12805_BI_003	0	O=S=O por C=O (1)	Bioisosterismo Não clássico (funcional)	-9,0	252,5
					
DB12805_BI_004	0	O=S=O por C=O (2)	Bioisosterismo Não clássico (funcional)	-9,5	108,6
					
DB14209	5	NA	NA	-7,6/-7,7	2682,8/ 2266,1
					

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

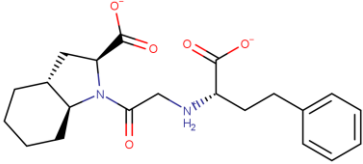
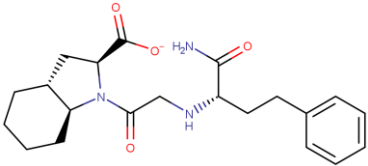
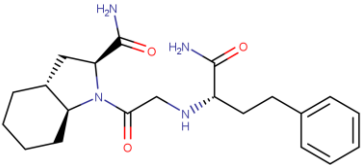
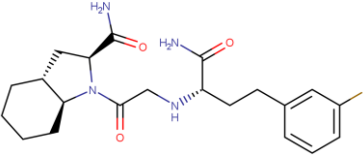
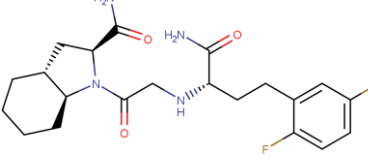
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB14209_BI_001	4	CH ₃ por H	Bioisosterismo Não clássico	-7,8/-7,6	1914,1/ 2266,1
					
DB14209_BI_002	4	OH por NH ₂ (1)	Bioisosterismo Clássico monovalente (funcional)	-8,5/-8,1	587,2/ 1153,6
					
DB14209_BI_003	4	OH por NH ₂ (2)	Bioisosterismo Clássico monovalente (funcional)	-8,3 ^(*)	823,1
					
DB14209_BI_004	4	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,2 ^(*)	974,4
					
DB14209_BI_005	4	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,4	695,2
					

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

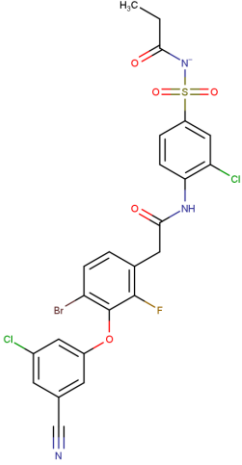
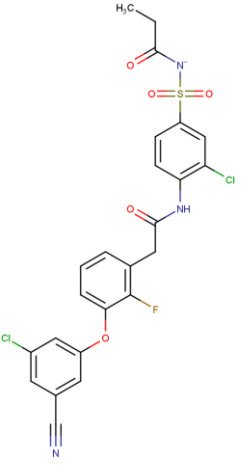
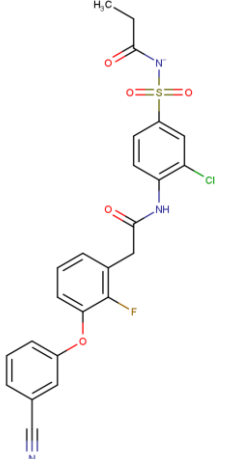
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
	0	NA	NA	-8,1	1153,6
DB14929_BI_001	0	Br por H	Bioisosterismo Não clássico	-8,4	695,2
	0	Cl por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,0	1365,7
DB14929_BI_002	0	Cl por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,0	1365,7
	0	Cl por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,0	1365,7

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

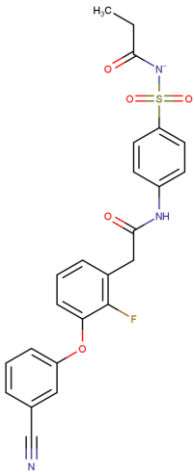
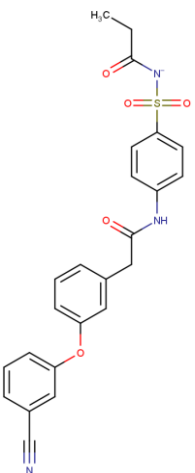
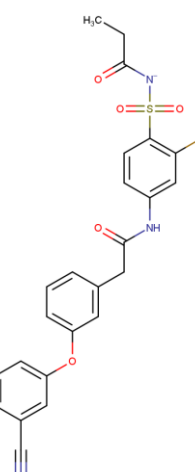
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB14929_BI_003	0	Cl por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,2	974,4
					
DB14929_BI_004	0	F por H	Bioisosterismo Não clássico	-7,4	3760,2
					
DB14929_BI_005	0	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,2	974,4
					

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(continuação)

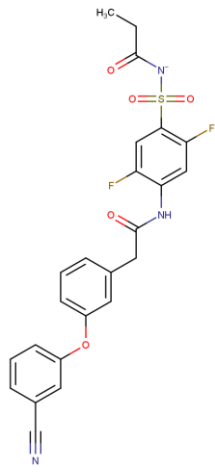
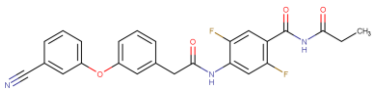
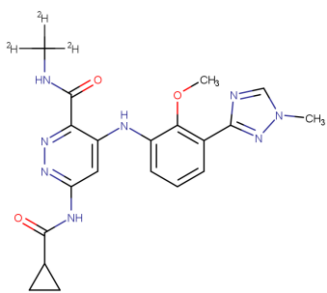
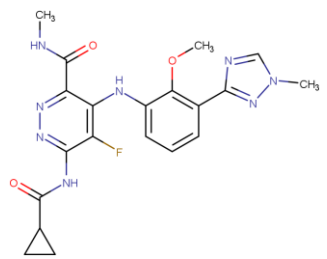
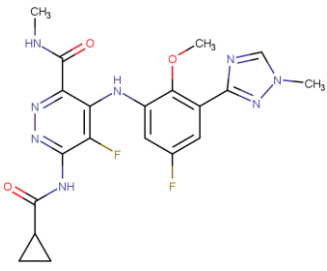
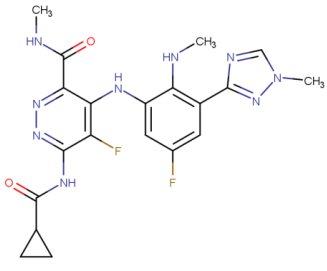
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB14929_BI_006	0	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-7,8	1914,1
					
DB14929_BI_007	0	O=S=O por C=O	Bioisosterismo Não clássico (funcional)	-7,7/-9,4	2266,1/ 128,5
					
DB16650	0	NA	NA	-7,8	1914,1
					
DB16650_BI_001	0	H ² por H ¹ e H por F (1)	Bioisosterismo Clássico monovalente/ Bioisosterismo Não clássico	-8,0	1365,7
					

Tabela 3 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos contra o sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) e valores preditos de K_i

(conclusão)

Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB16650_BI_002	0	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,3	823,1
					
DB16650_BI_003	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,2	974,4
					

Fonte: do autor.

Nota: Todas as siglas e abreviaturas utilizadas encontram-se na lista de siglas e abreviaturas; os melhores resultados obtidos com as modificações bioisostéricas foram sublinhados e destacados em negrito verde.

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continua)

Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
XR8-83	3	NA	NA	-10,5	20,1

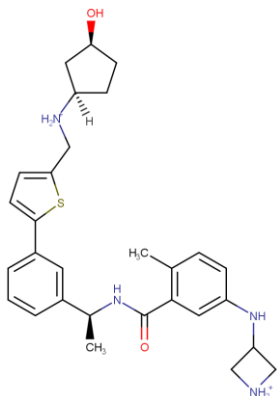


Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continuação)

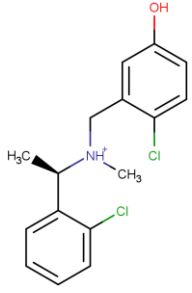
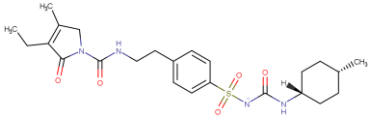
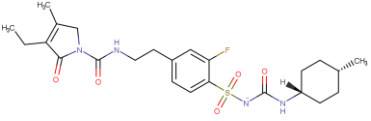
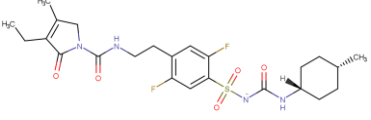
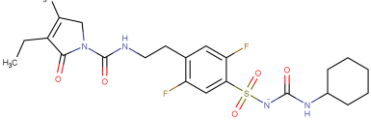
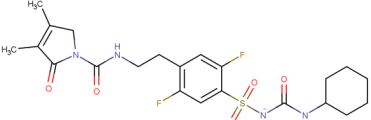
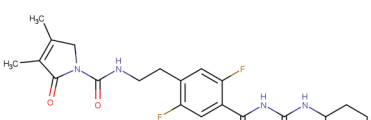
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
Jun9-13-7	1	NA	NA	-6,9 ^(*)	8744,7
 DB00222	2	NA	NA	-8,8	353,9
 DB00222_BI_001	2	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,6	496,0
 DB00222_BI_002	2	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,7	419,0
 DB00222_BI_003	0	CH ₃ por H (1) – no C quiral	Bioisosterismo Não clássico/ Simplificação molecular	-8,9	298,9
 DB00222 BI 004	0	CH₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-9,1	213,3
 DB00222 BI 005	0	O=S=O por C=O	Bioisosterismo Não clássico	-9,3	152,2
					

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continuação)

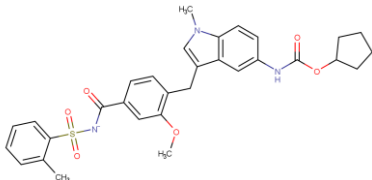
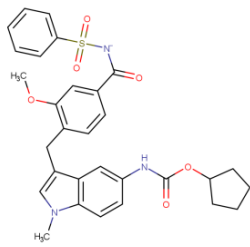
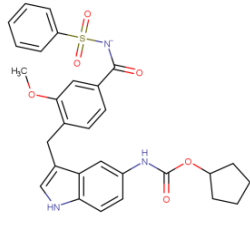
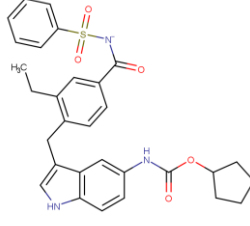
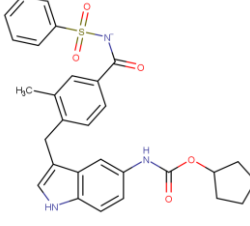
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB00549	0	NA	NA	-8,1	1153,6
					
DB00549_BI_001	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,4	695,2
					
DB00549_BI_002	0	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,2	974,4
					
DB00549_BI_003	0	O por CH ₂	Bioisosterismo Clássico divalente	-9,0	252,5
					
DB00549_BI_004	0	CH ₃ por H (3)	Bioisosterismo Não clássico	-8,6	496,0
					

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i (continuação)

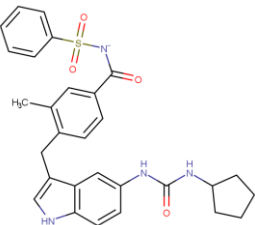
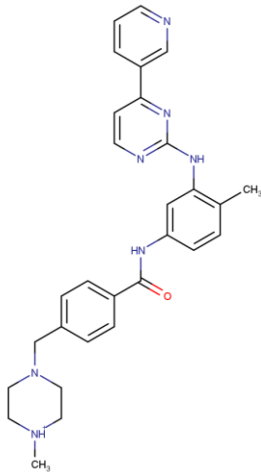
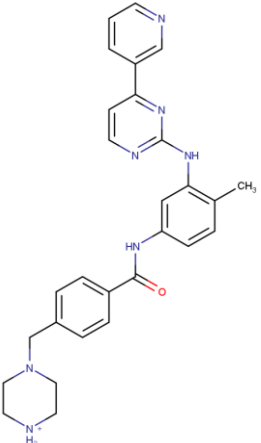
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
<u>DB00549 BI 005</u>	<u>0</u>	<u>O por NH</u>	<u>Bioisosterismo</u> <u>Clássico</u> <u>divalente</u>	<u>-10,1</u>	<u>39,4</u>
	0	NA	NA	-7,9/ -8,8(*)	1616,8/ 353,9
DB00619	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,5	587,2
	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,5	587,2
DB00619_BI_001	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,5	587,2
	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,5	587,2

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continuação)

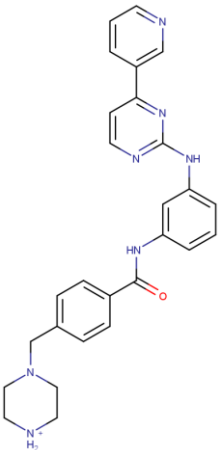
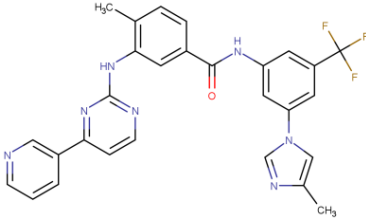
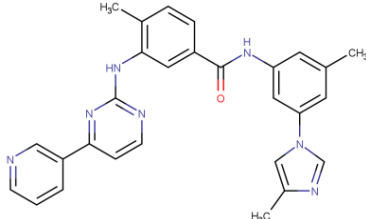
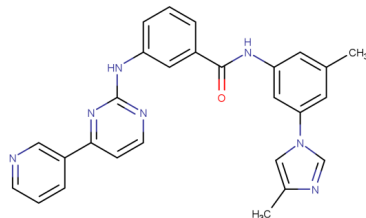
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB00619_BI_002	0	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,8	353,9
					
DB04868	0	NA	NA	-9,1	213,3
					
DB04868_BI_001	0	CF ₃ por CH ₃	Bioisosterismo Não clássico	-9,4	128,5
					
DB04868_BI_002	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-10,2	33,3
					

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continuação)

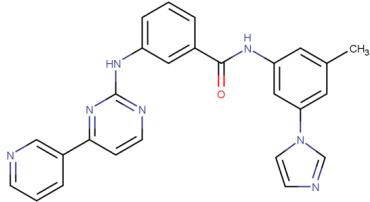
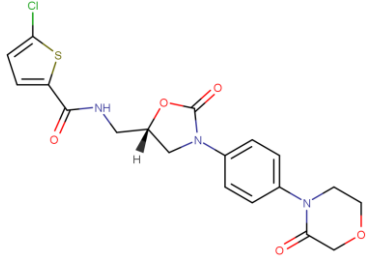
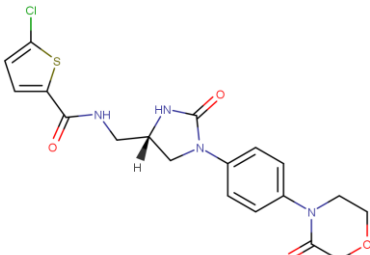
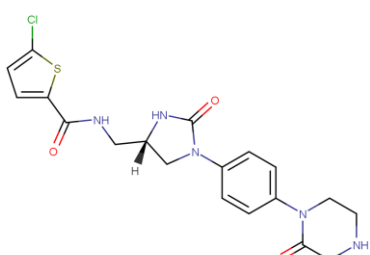
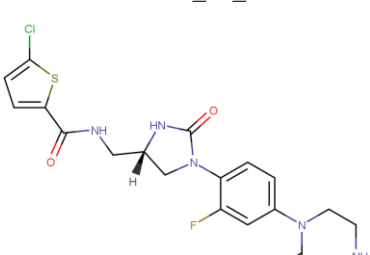
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB04868_BI_003	0	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-9,6	91,7
					
DB06228	1	NA	NA	-7,8	1914,1
					
DB06228_BI_001	1	O por NH (1)	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,1	1153,6
					
DB06228_BI_002	1	O por NH (2)	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,2	974,4
					
DB06228_BI_003	1	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,4	695,2
					

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i (continuação)

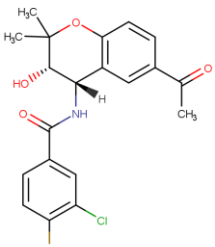
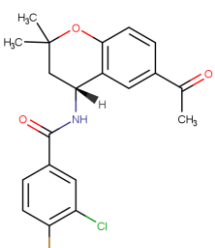
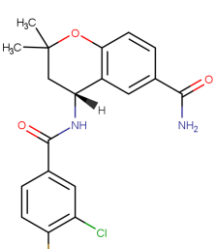
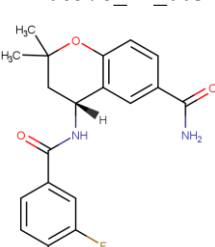
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB06578 	2	NA	NA	-7,0	7386,5
DB06578_BI_001 	1	OH por H (no C quiral)	Bioisosterismo Não clássico/ Simplificação molecular	-7,4	3760,2
DB06578_BI_002 	1	CH ₃ por NH ₂	Bioisosterismo Clássico monovalente (funcional)	-7,8	1914,1
DB06578_BI_003 	1	Cl por F	Bioisosterismo Clássico monovalente	-8,2	974,4

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i (continuação)

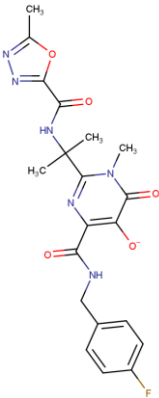
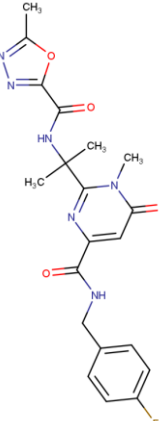
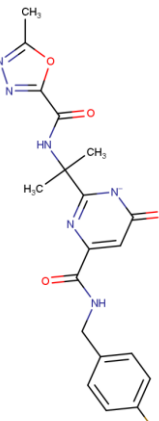
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB06817	0	NA	NA	-8,3/-8,5	823,1/ 587,2
					
DB06817_BI_001	0	OH por H	Bioisosterismo Não clássico	-8,2	974,4
					
DB06817_BI_002	0	CH ₃ por H	Bioisosterismo Não clássico	-8,5	587,2
					

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continuação)

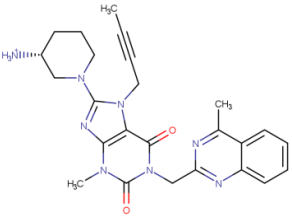
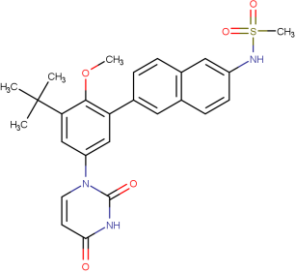
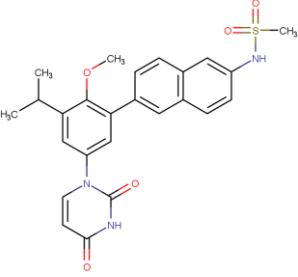
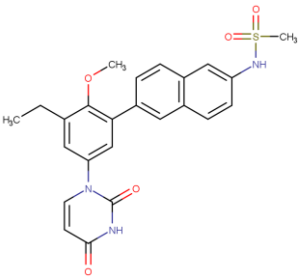
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB08882	1	NA	NA	-6,9	8744,7
	<u>0</u>	<u>NH₂ por H (no C quiral)</u>	<u>Bioisosterismo Não clássico/Simplificação molecular</u>	<u>-8,7</u>	<u>419,0</u>
DB09183	0	NA	NA	-7,8	1914,1
	0	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,5	587,2
DB09183_BI_001	0	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,3	823,1
					
					

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continuação)

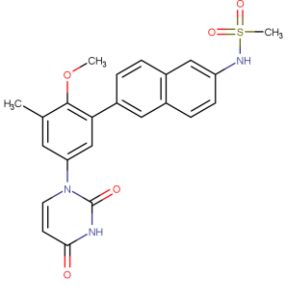
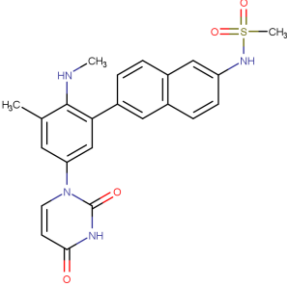
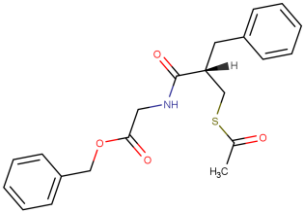
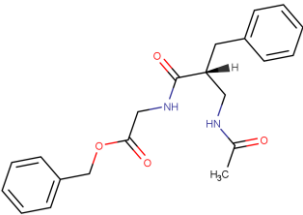
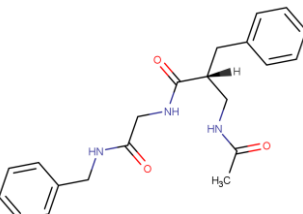
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB09183_BI_003	0	CH3 por H (3)	Bioisosterismo Não clássico	-8,4	695,2
					
DB09183_BI_004	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,4	695,2
					
DB11696	1	NA	NA	-7,0	7386,5
					
DB11696_BI_001	1	S por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,0	1365,7
					
DB11696_BI_002	1	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-8,3	823,1
					

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i (continuação)

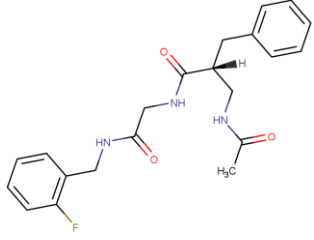
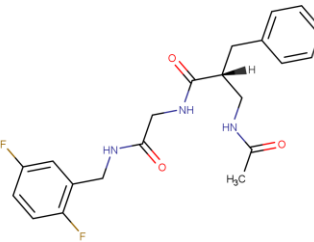
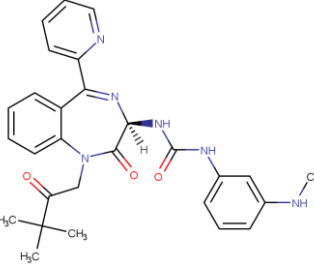
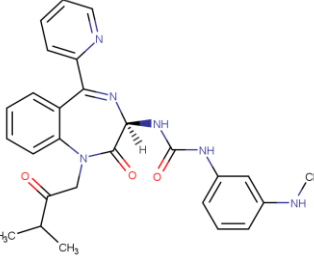
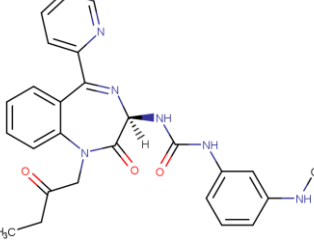
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB11696_BI_003	1	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,4	695,2
					
DB11696_BI_004	1	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,3	823,1
					
DB12355	1	NA	NA	-7,5	3176,1
					
DB12355_BI_001	1	CH ₃ por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-7,5	3176,1
					
DB12355_BI_002	1	CH ₃ por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-7,5	3176,1
					

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continuação)

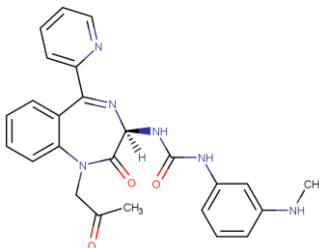
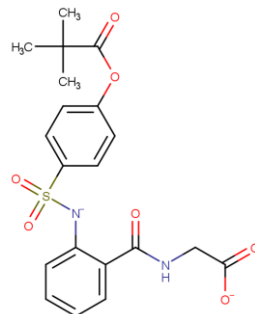
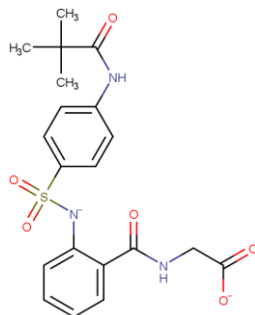
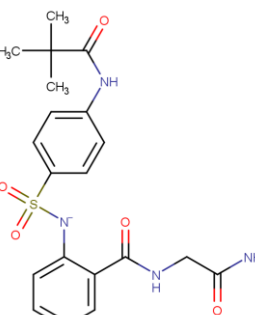
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB12355_BI_003	1	CH ₃ por H (3)	Bioisosterismo Não clássico	-8,4	695,2
					
DB12863	0	NA	NA	-7,7	2266,1
					
DB12863_BI_001	0	O por NH	Bioisosterismo Clássico divalente	-7,9	1616,8
					
DB12863_BI_002	0	OH por NH ₂	Bioisosterismo Clássico monovalente	-8,0	1365,7
					

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continuação)

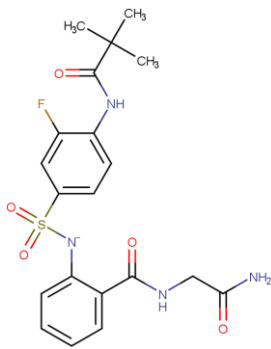
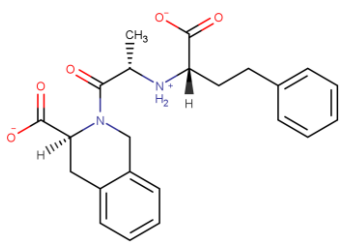
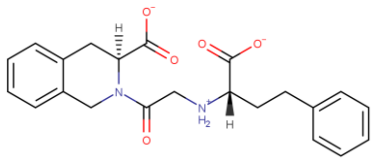
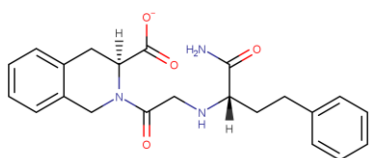
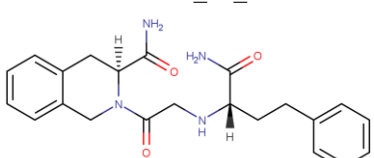
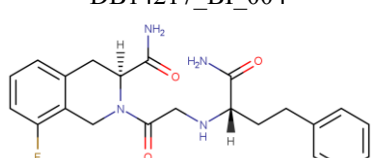
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB12863_BI_003	0	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,2	974,4
					
DB14217	3	NA	NA	-8,1/-7,5	1153,6/ 3176,1
					
DB14217_BI_001	2	CH ₃ por H (no C quiral)	Bioisosterismo Não clássico/ Simplificação molecular	-8,0/-8,1	1365,7/ 1153,6
					
DB14217_BI_002	2	OH por NH ₂ (1)	Bioisosterismo Clássico monovalente (funcional)	-8,6/-7,8	496,0/ 1914,1
					
DB14217_BI_003	2	OH por NH ₂ (2)	Bioisosterismo Clássico monovalente (funcional)	-7,7/-7,8	2266,1/ 1914,1
					
DB14217_BI_004	2	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,9/-8,1	298,9/ 1153,6
					

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continuação)

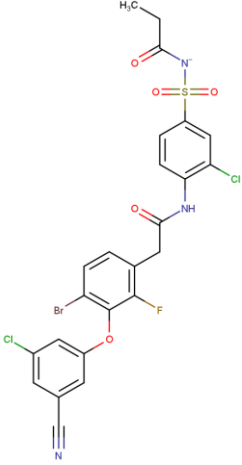
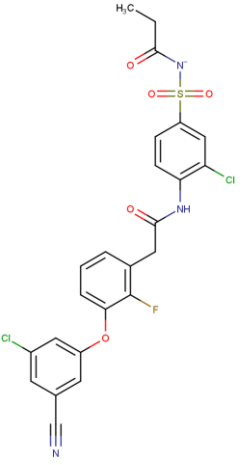
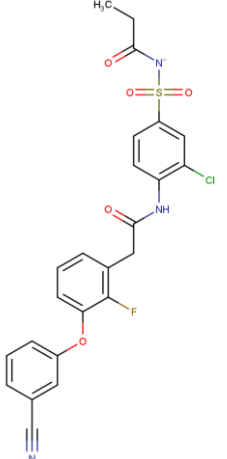
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
	0	NA	NA	-7,8	1914,1
DB14929_BI_001	0	Br por H	Bioisosterismo Não clássico	-7,7	2266,1
	0	Cl por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,3	823,1
DB14929_BI_002	0	Cl por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,3	823,1
	0	Cl por H (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,3	823,1

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i

(continuação)

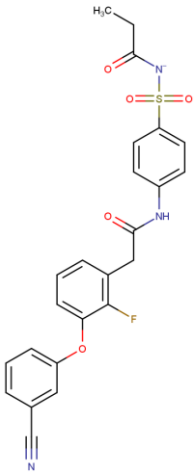
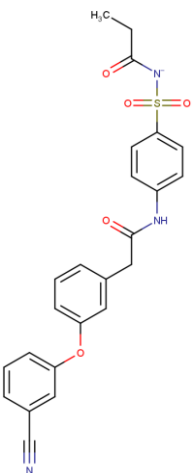
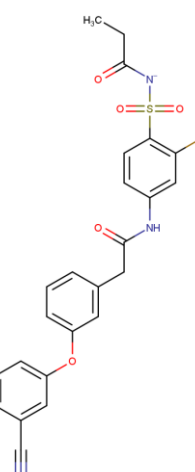
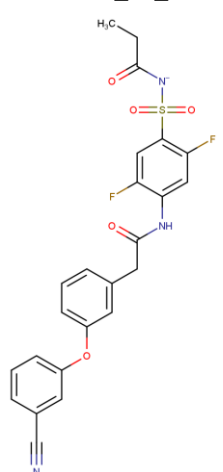
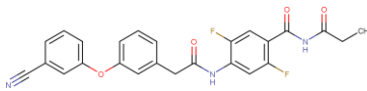
Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisotérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB14929_BI_003 	0	Cl por H (2)	Bioisosterismo Não clássico	-7,9	1616,8
DB14929_BI_004 	0	F por H	Bioisosterismo Não clássico	-8,1	1153,6
DB14929_BI_005 	0	H por F (1)	Bioisosterismo Não clássico	-8,0	1365,7

Tabela 4 – Aspectos moleculares, resultados de *score* dos estudos de *docking* contra o sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) e valores preditos de K_i (conclusão)

Ligante	Carbonos quirais	Substituição bioisostérica	Tipo de modificação	<i>Score</i> (Kcal/mol)	K_i (nM)
DB14929_BI_006	0	H por F (2)	Bioisosterismo Não clássico	-8,3	823,1
					
DB14929_BI_007	0	O=S=O por C=O	Bioisosterismo Não clássico (funcional)	-8,5/-9,0	587,2/ 252,5
					

Fonte: do autor.

Nota: Todas as siglas e abreviaturas utilizadas encontram-se na lista de siglas e abreviaturas; os melhores resultados obtidos com as modificações bioisostéricas foram sublinhados e destacados em negrito verde.

Os resultados acima evidenciam aumentos bastante expressivos de afinidade para com as cisteíno proteases do SARS-CoV-2, com destaque para o derivado DB12355_BI_004 contra o sítio ativo da enzima M^{pro}, elencado na tabela 1, assim como para os derivados DB08882_BI_001 e DB00549_BI_005 contra o sítio ativo da enzima PL^{pro}, presentes na tabela 4. Ademais, mesmo quando o bioisosterismo não alterou a afinidade predita do ligante pelo sítio de interesse da enzima em estudo, a molécula foi simplificada mediante eliminação de centros quirais, como demonstrado na tabela 3 para o ligante DB08882_BI_001 contra o sítio alostérico 2 da enzima M^{pro}. No contexto da quiralidade, houve modificações bioisostéricas que ocasionaram uma diminuição do número de carbonos quirais nas estruturas químicas resultantes, quando comparadas às dos seus respectivos ligantes precursores. Além disso, e sobretudo, a quiralidade que estava presente nos ligantes precursores que deram origem aos derivados finais DB00222_BI_004, DB00222_BI_005, DB06188_BI_005, DB08882_BI_001 e DB11984_BI_002 foi favoravelmente eliminada.

Durante as modificações bioisostéricas apresentadas nas tabelas 1 a 4, além do aumento da afinidade pelas cisteíno proteases do SARS-CoV-2, objetivou-se, simultaneamente, a melhoria da lipofilicidade para favorecimento da absorção oral, bem como a otimização de aspectos de drogabilidade. Sendo assim, para todos os ligantes apresentados nas tabelas anteriores, a lipofilicidade e três aspectos de drogabilidade foram preditos mediante uso da plataforma SwissADME. A lipofilicidade foi avaliada segundo valores do logaritmo do coeficiente de partição ou Log P, o qual representa, em uma escala logarítmica, a relação entre os perfis de lipo e hidrossolubilidade de um fármaco, isto é, a razão matemática entre as concentrações dissolvidas do fármaco em uma fase orgânica e em uma fase aquosa, nesta ordem. A principal correlação do Log P é com a absorção intestinal, de maneira que valores entre 1 e 3 são considerados ideais para que o fármaco permeie a MP das células intestinais por difusão passiva. Como consequência, incrementos no valor de Log P acima de 3 reduzem progressivamente a taxa de absorção intestinal de um fármaco.⁸²

O primeiro aspecto de drogabilidade escolhido foi o das regras de Lipinski *et al.* (2001) e das regras de Veber *et al.* (2002). Baseados em uma análise do extenso acervo do *Derwent World Drug Index*, Lipinski e colaboradores defenderam a “Regra dos Cinco”, que definiu três simples critérios estruturais e um critério físico-químico com base em características em comum de fármacos administrados oralmente que atingiram 90% de taxa de absorção intestinal.^{109,110} Os critérios são os seguintes: peso molecular < 500 Da; número de grupos doadores de ligação de H presentes na molécula ≤ 5 ; número de grupos aceptores de ligação de H presentes na molécula ≤ 10 ; e valor de Log P calculado ≤ 5 . Baseados nessas regras, Lipinski e colaboradores afirmaram que fármacos oralmente ativos, em geral, não apresentam mais do que uma violação a elas.^{82,109,110} As regras de Veber e colaboradores, por outro lado, além de considerarem esses critérios, levam em consideração a desejabilidade de que a molécula seja flexível para permear a MP e o impacto negativo que a elevada área de superfície polar em uma molécula causa em sua absorção em nível intestinal.¹¹¹ Como resultado, eles propuseram as propriedades adicionais a seguir: número de ligações rotacionáveis ≤ 10 e TPSA $\leq 140 \text{ \AA}$.^{82,111}

O segundo aspecto, intitulado alerta estrutural, consiste em uma lista de 105 fragmentos moleculares identificados como supostamente tóxicos, quimicamente reativos, metabolicamente instáveis ou responsáveis por fornecerem propriedades que causam uma farmacocinética deficiente na entidade molecular. O terceiro e último aspecto de drogabilidade, denominado acessibilidade sintética, é uma ferramenta robusta baseada na análise de mais de 13 milhões de fragmentos moleculares para a determinação da frequência de aparecimento destas frações moleculares somada a termos que consideram tamanho e complexidade

estruturais, como, por exemplo, quiralidade e presença ou não de cadeias cíclicas. Os valores gerados variam de 1 a 10, sendo que quanto menor for o valor, maior será a viabilidade sintética predita da molécula em estudo.¹⁰⁷ A tabela 5 elucida esses resultados acrescidos das estruturas 2D dos ligantes precursores e dos derivados finais com melhorias mais significativas.

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continua)

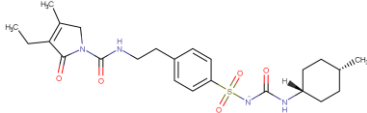
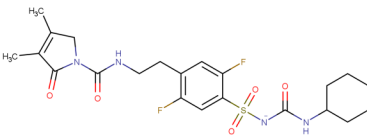
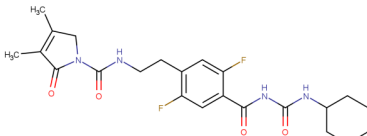
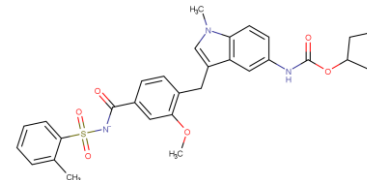
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
Ensitrelvir	3,05	2/0	1	3,56
Baicalein	2,24	0/0	1	3,02
Pelitinib	4,10	0/0	1	3,44
AT-7519	2,12	0/0	0	2,63
XR8-83	3,97	1/0	0	4,82
Jun9-13-7	4,10	1/0	0	2,24
DB00222	2,76	0/1	0	4,71
				
DB00222_BI_001	3,46	1/1	0	4,76
DB00222_BI_002	3,74	1/1	0	4,83
DB00222_BI_003	3,54	1/1	0	3,99
DB00222_BI_004	3,35	0/0	0	3,85
				
DB00222_BI_005	3,26	0/0	0	3,57
				
DB00549	4,65	1/1	0	4,18
				

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

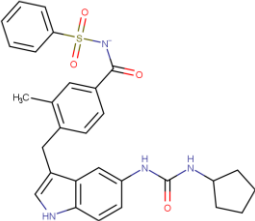
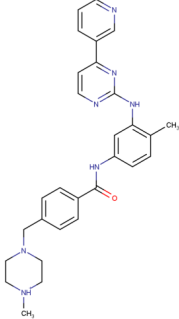
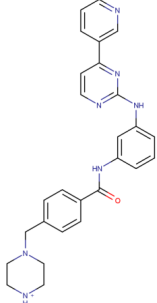
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
DB00549_BI_001	4,72	1/1	0	4,01
DB00549_BI_002	4,35	1/1	0	3,90
DB00549_BI_003	4,95	1/1	0	4,01
DB00549_BI_004	4,70	1/0	0	3,86
DB00549_BI_005	4,28	1/0	0	3,70
 DB00619	3,38	0/0	0	3,78
 DB00619_BI_001	3,11	0/0	0	3,66
 DB00619_BI_002	2,76	0/0	0	3,52

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

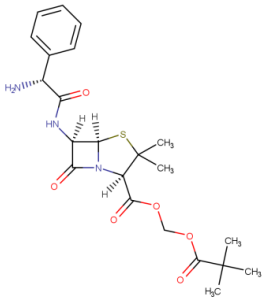
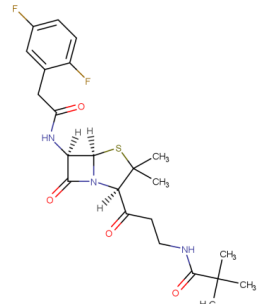
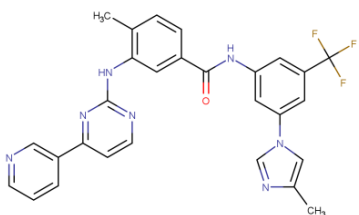
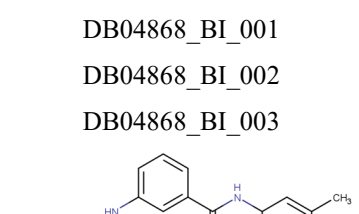
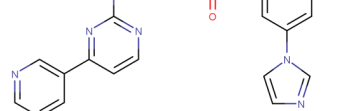
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética	
DB01604 	1,99	0/1	2	5,01	
DB01604_BI_001	1,53	0/1	1	5,09	
DB01604_BI_002	1,75	0/1	0	4,93	
DB01604_BI_003	2,35	0/0	0	4,74	
DB01604_BI_004	2,77	0/0	0	4,79	
DB01604_BI_005	2,89	0/0	0	4,86	
	DB04868	4,63	1/0	0	3,81
	DB04868_BI_001	4,02	0/0	0	3,75
	DB04868_BI_002	3,68	0/0	0	3,60
	DB04868_BI_003	3,35	0/0	0	3,41

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

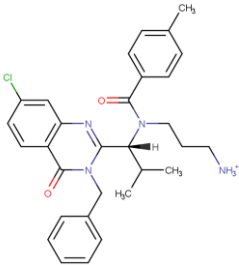
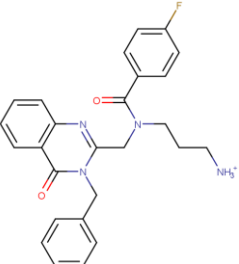
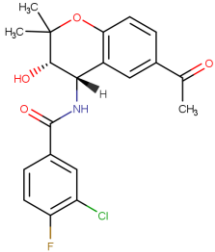
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
DB06188	4,97	2/0	0	4,23
				
DB06188_BI_001	4,45	0/0	0	4,20
DB06188_BI_002	4,15	0/0	0	4,08
DB06188_BI_003	3,77	0/0	0	3,89
DB06188_BI_004	3,61	0/0	0	3,22
DB06188_BI_005	3,62	0/0	0	3,14
				
DB06228	2,23	0/0	0	3,63
DB06228_BI_001	1,87	0/0	0	3,61
DB06228_BI_002	1,53	0/0	0	3,60
DB06228_BI_003	1,88	0/0	0	3,71
DB06578	3,29	0/0	0	3,68
				
DB06578_BI_001	3,99	0/0	0	3,29
DB06578_BI_002	3,21	0/0	0	3,26

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

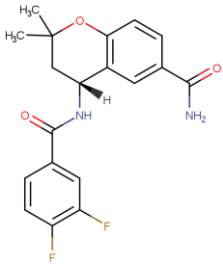
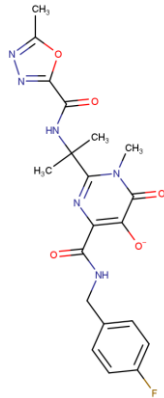
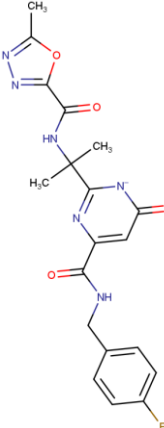
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
DB06578_BI_003 	2,94	0/0	0	3,22
DB06817 	1,46	1/1	0	3,49
DB06817_BI_001	1,55	0/0	0	3,36
DB06817_BI_002 	1,48	0/1	0	3,24

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

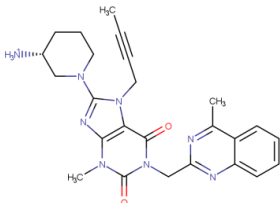
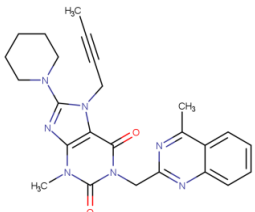
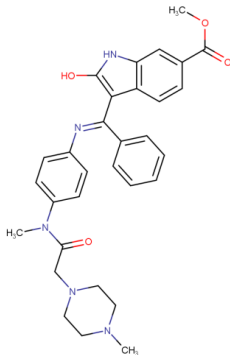
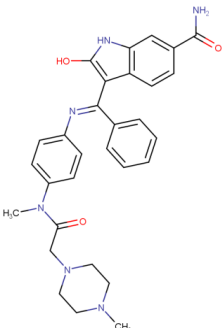
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
DB08882 	1,97	0/0	1	4,40
DB08882_BI_001 	2,98	0/0	1	3,85
DB09078	2,81	0/0	0	2,88
DB09078_BI_001	2,64	0/0	0	2,89
DB09078_BI_002	2,64	0/0	0	3,01
DB09079 	3,50	1/0	1	4,10
DB09079_BI_001	3,07	1/0	1	4,12
DB09079_BI_002 	2,81	1/0	1	4,01

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

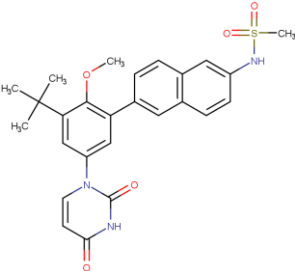
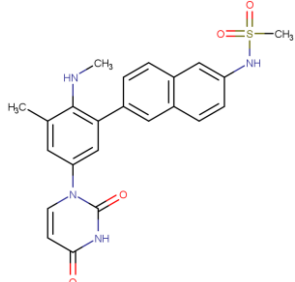
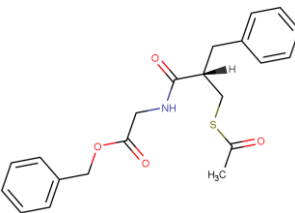
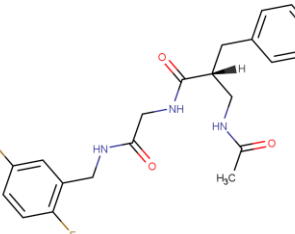
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
 DB09183	3,80	0/0	0	3,46
DB09183_BI_001	3,54	0/0	0	3,34
DB09183_BI_002	3,28	0/0	0	3,22
DB09183_BI_003	3,00	0/0	0	3,10
DB09183_BI_004	2,88	0/0	0	3,14
 DB11696	3,10	0/1	1	3,47
 DB11696_BI_001	2,41	0/1	0	3,05
DB11696_BI_002	2,01	0/1	0	2,84
DB11696_BI_003	2,42	0/1	0	3,04
DB11696_BI_004	2,64	0/1	0	3,12
				

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

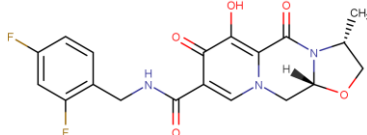
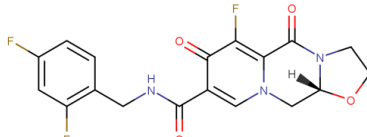
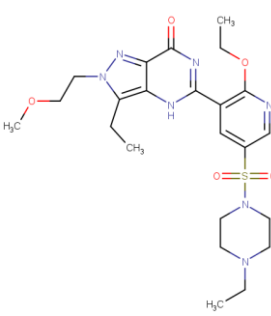
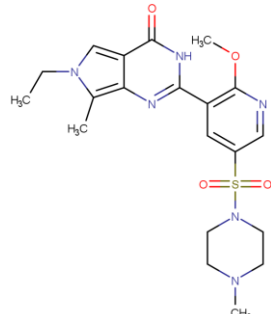
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
DB11751	1,79	0/0	0	4,05
				
DB11751_BI_001	1,51	0/0	0	3,65
DB11751_BI_002	2,01	0/0	0	3,65
				
DB11902	1,43	2/1	0	4,38
				
DB11902_BI_001	1,81	2/0	0	4,35
DB11902_BI_002	2,79	1/0	0	4,39
DB11902_BI_003	2,56	1/0	0	4,27
DB11902_BI_004	2,17	0/0	0	4,15
DB11902_BI_005	1,87	0/0	0	4,01
DB11902_BI_006	1,58	0/0	0	3,89
DB11902_BI_007	1,22	0/0	0	3,80
				
DB11902_BI_008	0,87	0/0	0	3,69

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

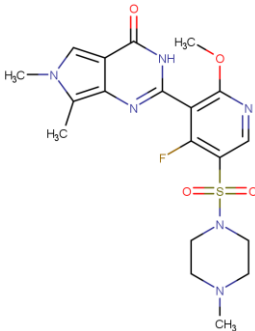
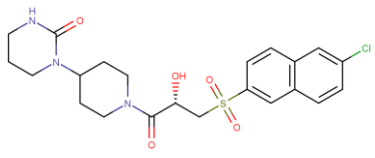
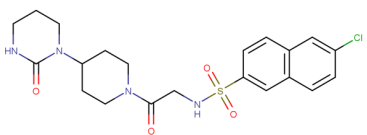
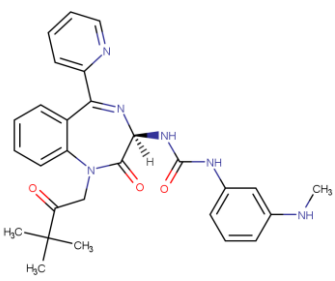
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
DB11902_BI_009	1,12	0/0	0	3,85
				
DB11984	2,01	0/0	0	4,24
				
DB11984_BI_001	2,76	0/0	0	3,42
DB11984_BI_002	2,01	0/0	0	3,29
				
DB12355	3,17	0/0	0	4,81
				
DB12355_BI_001	2,90	0/0	0	4,69
DB12355_BI_002	2,44	0/0	0	4,57

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

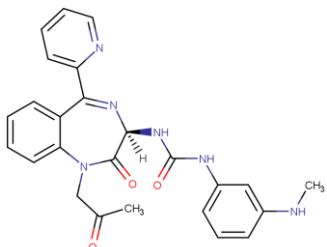
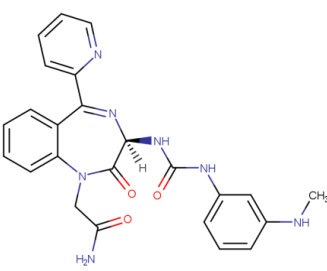
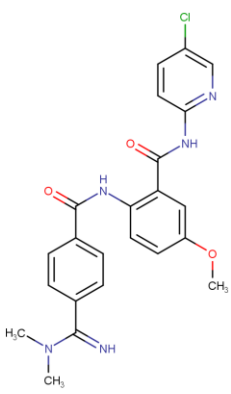
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
DB12355_BI_003	2,10	0/0	0	4,50
				
DB12355_BI_004	1,35	0/1	0	4,50
				
DB12364	3,22	0/0	2	3,05
				
DB12364_BI_001	2,91	0/0	0	2,96
DB12364_BI_002	2,77	0/0	0	2,85
DB12364_BI_003	2,58	0/0	0	2,93
DB12364_BI_004	2,12	0/0	0	2,84
DB12364_BI_005	2,54	0/0	0	3,02

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

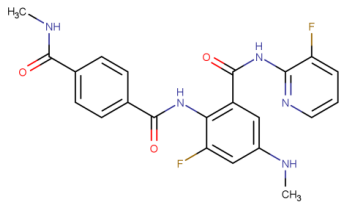
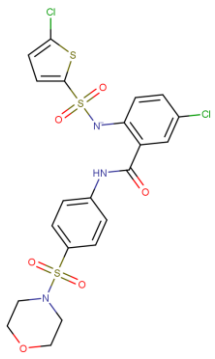
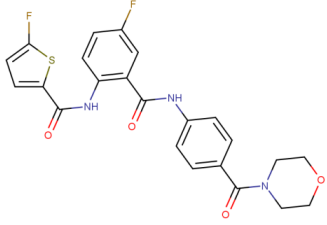
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
DB12364_BI_006	2,74	0/0	0	3,08
				
DB12805	3,62	1/1	0	3,72
				
DB12805_BI_001	3,35	1/1	0	3,67
DB12805_BI_002	3,18	1/1	0	3,64
DB12805_BI_003	3,50	1/1	0	3,51
DB12805_BI_004	3,72	0/0	0	3,25
				
DB12863	2,34	0/1	0	3,01
DB12863_BI_001	1,91	0/1	0	2,97
DB12863_BI_002	1,46	0/1	0	3,01
DB12863_BI_003	1,97	0/1	0	3,12
DB14209	1,34	0/0	0	3,94
DB14209_BI_001	1,12	0/0	0	3,71
DB14209_BI_002	1,16	0/0	0	3,76
DB14209_BI_003	1,23	0/0	0	3,72
DB14209_BI_004	1,49	0/0	0	3,90

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(continuação)

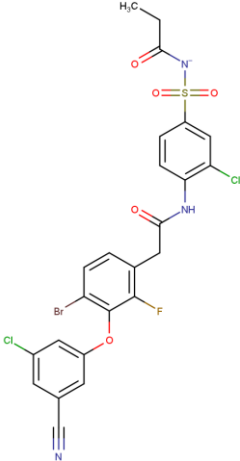
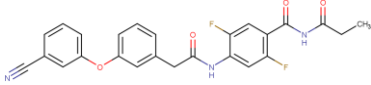
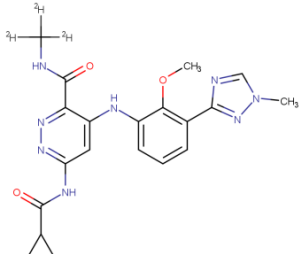
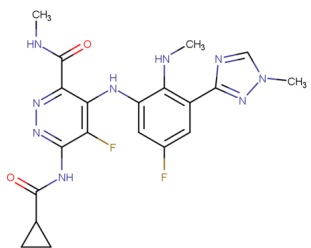
Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
DB14209_BI_005	1,88	0/0	0	4,07
DB14217	1,28	0/0	0	3,80
DB14217_BI_001	1,00	0/0	0	3,48
DB14217_BI_002	1,10	0/0	0	3,52
DB14217_BI_003	1,10	0/0	0	3,54
DB14217_BI_004	1,69	0/0	0	3,79
DB14929	4,98	1/0	0	3,45
				
DB14929_BI_001	4,40	1/0	0	3,40
DB14929_BI_002	3,87	1/0	0	3,33
DB14929_BI_003	3,39	0/0	0	3,21
DB14929_BI_004	3,03	0/0	0	3,10
DB14929_BI_005	3,34	0/0	0	3,23
DB14929_BI_006	3,70	0/0	0	3,30
DB14929_BI_007	4,05	0/0	0	3,02
				
DB16650	1,28	1/0	0	3,54
				

Tabela 5 – Predições de lipofilicidade e de aspectos de drogabilidade pela plataforma SwissADME

(conclusão)

Ligante	Log P (consenso)	Lipinski/ Veber (violações)	Alertas estruturais	Acessibilidade sintética
DB16650_BI_001	1,61	1/0	0	3,68
DB16650_BI_002	1,93	1/0	0	3,70
DB16650_BI_003	2,41	0/0	0	3,58



Fonte: do autor.

Nota: Log P (consenso) é a média aritmética dos valores de coeficiente de partição (Log P) calculados a partir de cinco metodologias preditivas distintas.¹⁰⁷

Os resultados apresentados na tabela 5 evidenciam que a aplicação da estratégia de bioisosterismo foi capaz de diminuir expressivamente valores elevados de Log P expressos por ligantes precursores que originaram as moléculas DB04868_BI_003 e DB06188_BI_005. As trocas bioisostéricas de CF₃ por CH₃ e de CH₃ por H em dois locais diferentes do ligante DB04868 diminuiu seu Log P de 4,63 para 3,35 no derivado DB04868_BI_003. Igualmente, uma mudança bioisostérica de Cl por H somada a três mudanças sequenciais de CH₃ por H e a uma última mudança de CH₃ por F ocasionou a diminuição do valor de Log P do precursor DB06188 de 4,97 para 3,62 em seu derivado DB06188_BI_005. Entretanto, embora esses valores se encontrem favoravelmente próximos à faixa ótima, eles ainda se mostram acima da faixa máxima ideal para absorção oral de um candidato a fármaco, conforme citado anteriormente. Por outro lado, duas trocas bioisostéricas de CH₃ por H no precursor DB00619 diminuiu seu Log P de 3,38 para 2,76 no derivado DB00619_BI_002. Além disso, o bioisosterismo clássico divalente de S por NH no precursor DB11696 foi crucial para que não somente o valor de Log P caísse de 3,10 para 2,64 no derivado DB11696_BI_004, como também para que um alerta estrutural devido à presença do grupo tioéster no precursor DB11696 fosse eliminado. Neste sentido, a aplicação do bioisosterismo clássico divalente mediante troca de C=N por C=O no precursor DB12364 foi igualmente essencial tanto para

que o valor de Log P do derivado DB12364_BI_006 diminuísse de 3,22 para 2,74 quanto para que os alertas estruturais decorrentes da presença de grupos imina (N=C e N-C=N) fossem extintos. No que se refere aos alertas estruturais, o feito mais expressivo foi o da eliminação de dois alertas apontados para o precursor DB01604; são eles, C ligado a dois heteroátomos em uma cadeia alifática e presença de dois grupos éster na estrutura. Para tanto, o bioisosterismo clássico divalente foi aplicado nas trocas de O por NH e de O por CH₂, carreadas pelo derivado DB01604_BI_005. Finalmente, ainda no tocante ao Log P, outras diminuições expressivas de valores ocorreram com os derivados DB09079_BI_002 e DB09183_BI_004, cujas mudanças foram de 3,50 para 2,81 e de 3,80 para 2,88, respectivamente, em relação aos seus precursores.

No que tange à drogabilidade, a mudança bioisostérica de CH₃ por H no derivado DB00222_BI_004, e conseqüentemente no derivado DB00222_BI_005, transformou uma etila em uma metila, fato que culminou na eliminação da violação à seguinte regra de Veber: ligações rotacionáveis ≤ 10 . Ademais, a eliminação da quiralidade ocasionou uma melhoria da acessibilidade sintética, fato que pode ser observado de igual maneira para os derivados DB08882_BI_001 e DB11984_BI_002. Aquela mesma violação às regras de Veber foi extinta no derivado DB00549_BI_005 mediante as mudanças bioisostéricas sequenciais de O por CH₂ e de CH₃ por H. Uma segunda violação às regras de Veber (TPSA >140 Å) pode ser eliminada nos derivados DB01604_BI_005, DB11902_BI_007, DB11902_BI_009 e DB12805_BI_004. Na esfera dos aspectos de drogabilidade que violam as regras de Lipinski, as trocas bioisostéricas que se processaram nos derivados DB04868_BI_003, DB06188_BI_005, DB11902_BI_007, DB11902_BI_009 e DB12805_BI_004 culminaram em valores de massas moleculares < 500 Da para estas moléculas. Além disso, a violação à regra de Lipinski que recomenda a quantidade de átomos de N e de O somados ≤ 10 foi extinta nos derivados DB06817_BI_002, DB11902_BI_007, DB11902_BI_009 e DB16650_BI_003.

Com base nas evidências observadas nas tabelas 1, 2, 3, 4 e 5, os derivados por bioisosterismo mais promissores, isto é, cujas modificações finais resultaram em valores preditos de $K_i < 500$ nM ou $score \leq -8,6$ Kcal/mol e concomitantemente melhoria da lipofilicidade e/ou de um ou mais aspectos de drogabilidade, foram selecionados para uma avaliação físico-química mais minuciosa; exceção seja feita para o sítio alostérico 1 da M^{Pro}, cujos melhores resultados de $score$ foram iguais a -8,5 Kcal/mol. Nessa análise, seis categorias de interações intermoleculares classificadas pelo software Discovery Studio foram levadas em consideração. A primeira delas é composta pelas ligações de H que são subdivididas em convencionais/clássicas, não clássicas e do tipo ponte salina. A segunda categoria representa as interações eletrostáticas que, por sua vez, são ramificadas em cargas atrativas, Pi-Cátion, Pi-

Ânion e do tipo ponte salina. A terceira classe abrange as interações hidrofóbicas que são separadas em van der Waals, Pi-Pi *Stacked*, Pi-Pi *T-Shaped*, Amida-Pi *Stacked*, Pi-Alquila, Alquila e Pi-Sigma. Por fim, as três últimas categorias são: interações com halogênio, interações variadas com átomos de enxofre envolvidos (Pi-Enxofre) e interações desfavoráveis, que incluem os casos de impedimento estérico, de conflitos entre átomos aceptores e entre átomos doadores de ligações de H e de repulsão de cargas, inclusive a do tipo metálica, que acontece entre um íon metálico e um átomo doador de ligação de H.

As ligações de H clássicas são interações fortes estabelecidas entre átomos doadores clássicos (N, O, P, S; e H, quando conectado a um destes quatro átomos) e átomos aceptores clássicos (F, Cl, Br, I, mas também N, O, P e S quando eles apresentam pelo menos um par de elétrons livres, e.g. NH₃ para originar o íon NH₄⁺, exceção seja feita para átomos de N com hibridização do tipo sp² conectados por ligação simples a um segundo átomo com hibridização do tipo sp²).^{112,113} As ligações de H não clássicas são consideradas interações fracas em que o átomo doador é um carbono polarizado, como, por exemplo, o carbono que compõe um grupo acetileno, ou um outro átomo que não o carbono, e neste caso interagindo com umceptor presente em anéis Pi.^{113,114} Interações do tipo ponte salina, por outro lado, são julgadas como fortes e estabelecem-se entre pares de átomos ou grupos com cargas opostas que, ao mesmo tempo, realizam ligações de H convencionais. Essas interações são classificadas como pertencentes tanto à categoria de ligações de H quanto à de interações eletrostáticas.¹¹³ As ramificações destas interações eletrostáticas, representadas pelas subclasses Pi-Cátion e Pi-Ânion, por sua vez, formam-se entre átomos carregados positivamente e elétrons deslocalizados de um sistema conjugado/de ligações π . Na interação Pi-Cátion, os átomos envolvidos têm carga formal maior ou igual a +0,5, enquanto na Pi-Ânion, menor ou igual a -0,5.^{113,115-118}

















Na categoria das interações hidrofóbicas, as subclasses Pi-Pi *Stacked* e Pi-Pi *T-Shaped* formam-se entre sistemas de anéis planares compostos por átomos com hibridização do tipo sp² (anéis Pi), os quais incluem anéis aromáticos, mas não se restringem a eles. A diferença entre essas subclasses é a distância calculada entre os ângulos θ e γ que caracterizam os vetores centrais de cada um dos anéis envolvidos nas interações desses tipos. As subclasses Amida-Pi *Stacked* e Pi-Alquila, por sua vez, compartilham desta mesma diferença. Ademais, enquanto a primeira subcategoria caracteriza-se pela interação entre um grupamento amida e um anel Pi, a segunda representa interações entre cadeias alifáticas e anéis Pi. Neste sentido, a quinta subclasse Alquila envolve interações entre cadeias laterais de aminoácidos predominantemente alifáticos e grupos hidrofóbicos dos ligantes, i.e., um conjunto de átomos que não estão adjacentes a átomos carregados nem que sejam altamente eletronegativos. Finalmente, a

subclasse Pi-Sigma, também referida como “CH- π ”, é um tipo de interação hidrofóbica considerada fraca que se dá entre o átomo de hidrogênio ligado a um átomo de carbono não aromático e um sistema cíclico de orbitais conjugados (sistema Pi), e.g. anel benzênico.¹¹⁹⁻¹²¹

Interações da categoria halogênio têm uma significância similar à de ligações de H não clássicas, e elas acontecem entre um átomo de carbono e um átomo de F, Cl, Br ou I.^{122,123} As interações Pi-Enxofre, por outro lado, envolvem átomos de enxofre e átomos com hibridização do tipo sp^2 que compõem anéis Pi.¹²⁴ Por fim, as interações desfavoráveis supracitadas são definidas por distâncias máximas predefinidas, e nos casos de impedimento estérico, raios de Van der Waals são considerados nos cálculos.¹¹³

É importante salientar que todos os átomos de hidrogênio, incluindo os polares, e.g. do grupo hidroxila, são omitidos nos diagramas 2D gerados pelo software Discovery Studio quando eles não participam de interações intermoleculares. Ademais, este software não evidencia no diagrama duas ligações de H clássicas que se estabelecem entre um mesmo átomo doador do ligante e diferentes átomos aceptores de um mesmo aminoácido. No tocante ao cálculo dos valores das distâncias das ligações de H clássicas que aparecerão nas tabelas 6 a 9, o software supracitado não leva em consideração neste cálculo a distância da ligação covalente estabelecida entre o hidrogênio e o átomo ligado a ele, e.g. N e O, que se comporta como doador da ligação de H. Por esse motivo, para que as distâncias dessas ligações de H sejam interpretadas segundo a categorização de Jeffrey (1997), a todos os valores tabelados deve-se somar, aproximadamente, 0,95 Å, referente à distância aproximada da ligação covalente entre N e H e entre O e H.^{125,126} Em 1997, Jeffrey classificou as ligações de H de acordo com os valores de suas distâncias de ligação, de maneira que valores entre 2,2 e 2,5 Å classificam-nas como fortes; entre 2,5 e 3,2 Å, como moderadas; e entre 3,2 e 4,0 Å, como fracas.¹²⁵ A figura 13 elenca todos os tipos de interações apresentadas nas tabelas 6 a 9.

Figura 13 – Legenda dos diagramas 2D presentes nas tabelas 6 a 9

 Ligação de H clássica	 van der Waals
 Ligação de H não clássica	 Alquila
 Pi-Ânion	 Pi-Alquila
 Pi-Cátion	 Pi-Sigma
 Ponte salina	 Pi-Pi <i>Stacked</i>
 Cargas atrativas	 Pi-Pi <i>T-Shaped</i>
 Pi-Enxofre	 Amida-Pi <i>Stacked</i>
 Halogênio	 Doador-doador/Aceptor-aceptor

Fonte: do autor.

Nota: Subclasses de interações intermoleculares bastante similares são identificadas com colorações iguais.

Tabela 6 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continua)

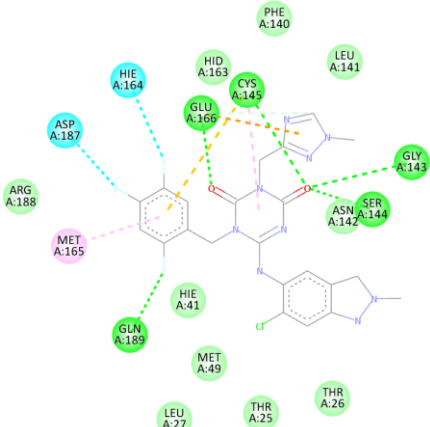
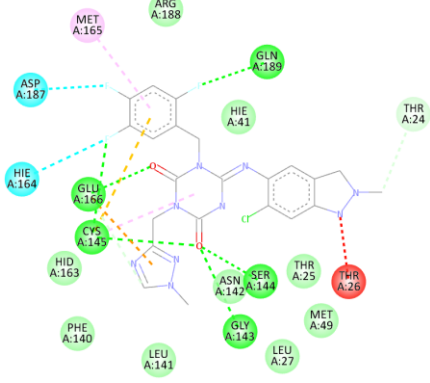
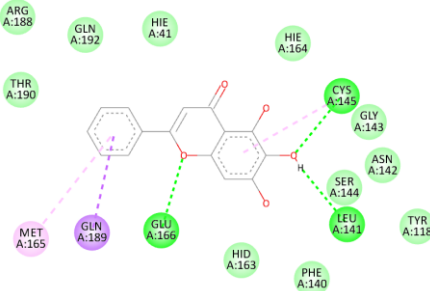
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>Ensitrelvir_1</p> 	<p>6/ 2,23 – Glu166; 2,32 – Ser144; 2,55 – Cys145; 2,60 – Ser144; 2,61 – Gln189; 2,70 – Gly143</p>	<p>Ligação de H (não clássica) Pi-Ânion Pi-Enxofre (Cys145) Halogênio</p>	<p>van der Waals (Hie41) Pi-Alquila (Cys145)</p>	0
<p>Ensitrelvir_2</p> 	<p>7/ 2,31 – Ser144; 2,41 – Glu166; 2,47 – Gly143; 2,56 – Cys145; 2,65 – Gln189; 2,78 – Ser144; 2,85 – Cys145</p>	<p>Ligações de H (não clássicas) Pi-Ânion Pi-Enxofre (Cys145) Halogênio</p>	<p>van der Waals (Hie41) Pi-Alquila (Cys145)</p>	<p>Doador-doador (Thr26)</p>
<p>Baicalein (36%)</p> 	<p>3/ 2,06 – Leu141; 2,25 – Glu166; 2,37 – Cys145</p>	0	<p>van der Waals (Hie41) Pi-Alquila Pi-Sigma</p>	0

Tabela 6 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína M^{Pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

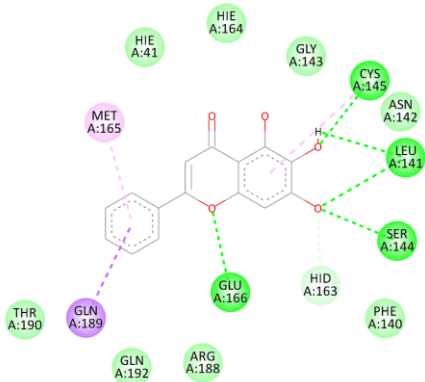
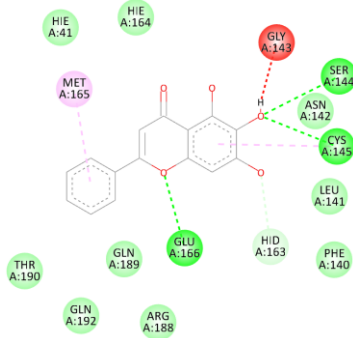
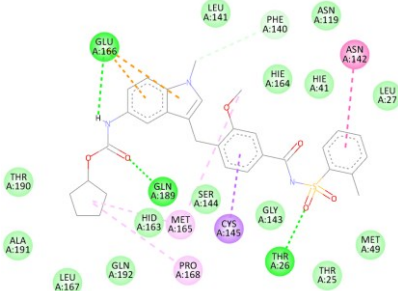
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>Baicalein (29%)</p> 	<p>5/ 2,27 – Glu166; 2,39 – Cys145; 2,49 – Leu141; 2,51 – Ser144; 3,14 – Leu141</p>	<p>Ligação de H (não clássica)</p>	<p>van der Waals (Hie41) Pi-Alquila</p>	0
<p>Baicalein (27%)</p> 	<p>3/ 2,26 – Glu166; 2,38 – Cys145; 2,52 – Ser144</p>	<p>Ligação de H (não clássica)</p>	<p>van der Waals (Hie41) Pi-Alquila</p>	<p>Doador-doador (Gly143)</p>
<p>DB00549</p> 	<p>3/ 1,83 – Gln189; 2,22 – Thr26; 3,02 – Glu166</p>	<p>Ligação de H (não clássica) Pi-Ânion</p>	<p>van der Waals (Hie41) Pi-Alquila Pi-Sigma Amida-Pi <i>Stacked</i></p>	0

Tabela 6 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

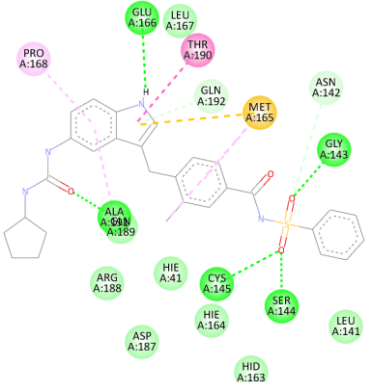
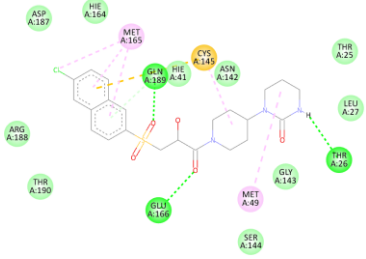
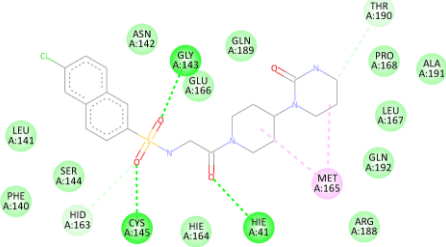
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB00549_BI_005 	6/ 2,10 – Gly143; 2,16 – Ser144; <u>2,33 – Cys145</u> ; 2,45 – Glu166; 2,64 – Ser144; 2,84 – Ala191	Ligações de H (não clássicas) Pi-Enxofre	<u>van der Waals</u> <u>(Hie41)</u> Alquila Pi-Alquila Amida-Pi <i>Stacked</i>	0
DB11984 	3/ 2,24 – Thr26; 2,49 – Gln189; 2,61 – Glu166	Ligação de H (não clássica) Pi-Enxofre <u>(Cys145)</u>	<u>van der Waals</u> <u>(Hie41)</u> <u>Alquila</u> <u>(Cys145)</u> Pi-Alquila	0
DB11984_BI_002 	3/ 2,28 – Gly143; <u>2,55 – Hie41</u> ; <u>2,69 – Cys145</u>	Ligações de H (não clássicas)	van der Waals Alquila	0

Tabela 6 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controlê, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB12355	2/ 2,42 – Gln189; 2,78 – Thr25	Pi-Enxofre (Cys145)	van der Waals (Hie41) Pi-Alquila	Doador-doador (Gln189)
DB12355_BI_004	8/ 2,11 – Cys145; 2,19 – Glu166; 2,39 – Hie164; 2,39 – Glu166; 2,43 – Ser144; 2,45 – Gln189; 2,63 – Gly143; 2,66 – Glu166	Ligação de H (não clássica) Pi-Enxofre (Cys145)	van der Waals (Hie41) Alquila Pi-Alquila Amida-Pi <i>Stacked</i>	0
DB12364	2/ 2,41 – Gln192; 2,67 – Gln189	0	van der Waals (Hie41) Alquila Pi-Alquila (Cys145)	Doador-doador (Gln189)

Tabela 6 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controlê, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína M^{Pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

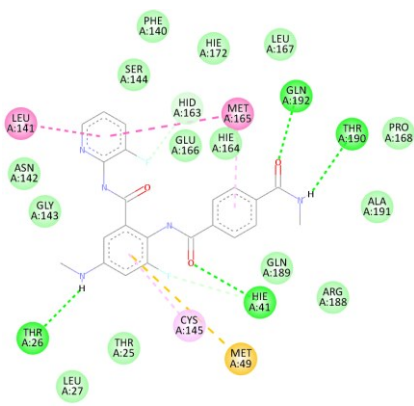
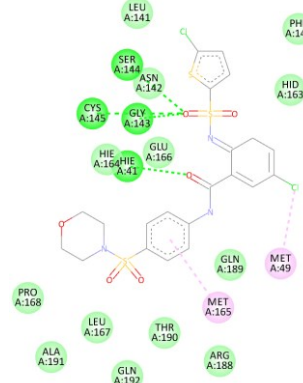
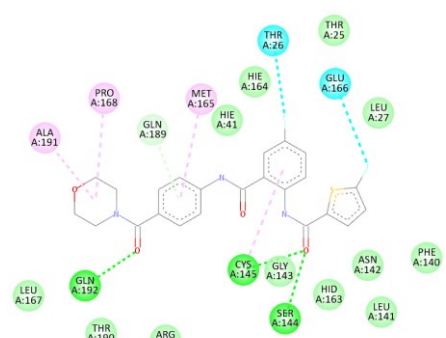
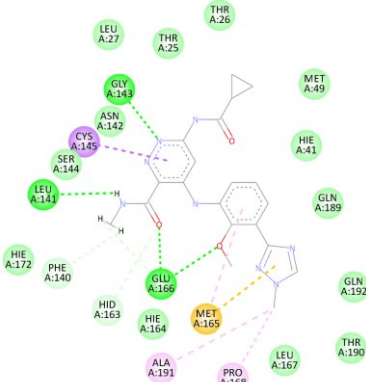
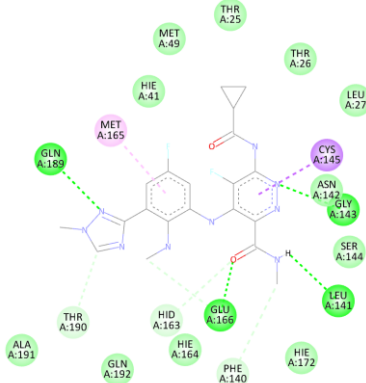
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB12364_BI_006 	4/ 2,25 – Gln192; 2,47 – Thr26; 2,53 – Thr190; <u>2,89 – Hie41</u>	Ligações de H (não clássicas – Hie41) Pi-Enxofre	van der Waals Pi-Alquila (Cys145) Amida-Pi <i>Stacked</i>	0
DB12805 	4/ 2,05 – Gly143; 2,19 – Ser144; 2,22 – Hie41; <u>2,40 – Cys145</u>	0	van der Waals Alquila Pi-Alquila	0
DB12805_BI_004 	3/ <u>2,31 – Cys145</u> ; 2,45 – Gln192; 2,64 – Ser144	Ligação de H (não clássica) Halogênio	van der Waals (Hie41) Alquila Pi-Alquila (Cys145)	0

Tabela 6 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(conclusão)

Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>DB16650</p> 	<p>4/ 2,14 – Gly143; 2,27 – Leu141; 2,35 – Glu166; 2,73 – Glu166</p>	<p>Ligações de H (não clássicas – Hie41) Pi-Enxofre</p>	<p>van der Waals Alquila Pi-Alquila Pi-Sigma (Cys145)</p>	0
<p>DB16650_BI_003</p> 	<p>4/ 2,07 – Gly143; 2,21 – Leu141; 2,45 – Gln189; 2,78 – Glu166</p>	<p>Ligações de H (não clássicas – Hie41)</p>	<p>van der Waals Pi-Alquila Pi-Sigma (Cys145)</p>	0

Fonte: do autor.

Nota: Os valores das distâncias das ligações de H são dados na unidade Å; os percentuais apresentados entre parênteses referem-se às espécies químicas do ligante que são predominantes em pH 7,4; resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo foram citados entre parênteses, e estes, assim como os tipos de interações que eles realizaram, foram sublinhados e destacados em negrito laranja.

Tabela 7 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 1 da proteína M^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continua)

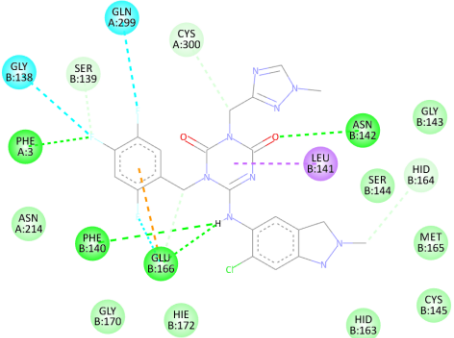
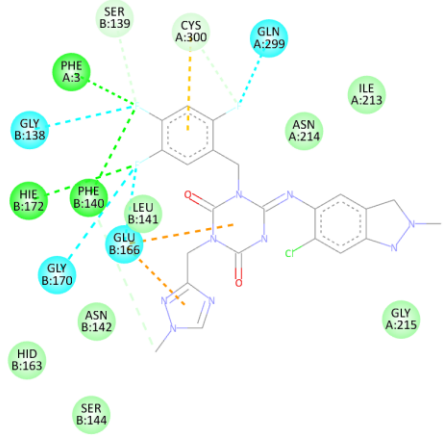
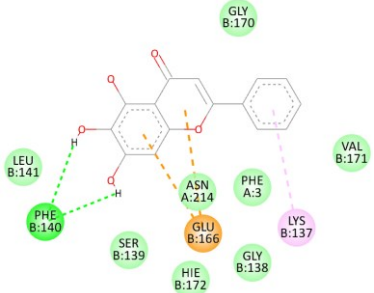
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>Ensitrelvir_1</p> 	<p>3/ 2,17 – Glu166 ou 3,06 – Phe140; 2,23 – Phe3; 2,25 – Asn142</p>	<p>Ligações de H (não clássicas – Cys300) Pi-Ânion Halogênio</p>	<p>van der Waals (Cys145) Pi-Sigma</p>	0
<p>Ensitrelvir_2</p> 	<p>3/ 2,28 – Phe3; 2,71 – Hie172; 2,73 – Phe140</p>	<p>Ligações de H (não clássicas – Cys300) Pi-Ânion Pi-Enxofre (Cys300) Halogênio</p>	<p>van der Waals (Ile213)</p>	0
<p>Baicalein (36%)</p> 	<p>2/ 2,04 – Phe140; 2,45 – Phe140</p>	<p>Pi-Ânion</p>	<p>van der Waals Pi-Alquila</p>	0

Tabela 7 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 1 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

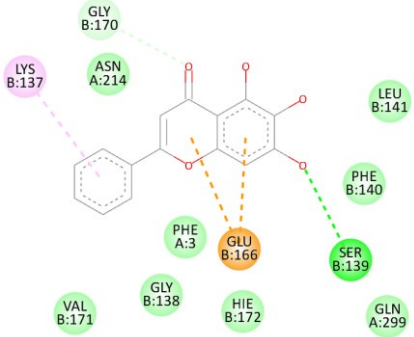
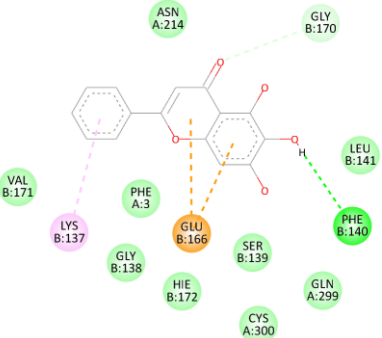
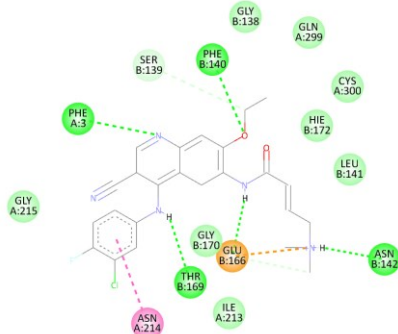
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>Baicalein (29%)</p> 	1/ 3,08 – Ser139	Ligação de H (não clássica) Pi-Ânion	van der Waals Pi-Alquila	0
<p>Baicalein (27%)</p> 	1/ 2,53 – Phe140	Ligação de H (não clássica) Pi-Ânion	van der Waals (Cys300) Pi-Alquila	0
<p>Pelitinib</p> 	5/ 1,87 – Glu166; 2,06 – Asn142; 2,12 – Thr169; 2,41 – Phe140; 2,94 – Phe3	Ligações de H (não clássicas) Cargas atrativas	van der Waals (Cys300) Amida-Pi <i>Stacked</i>	0

Tabela 7 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 1 da proteína M^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

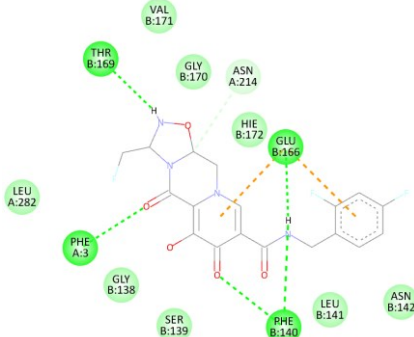
(continuação)

Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB00549	4/ 2,33 – Phe140; 2,42 – Arg217; 2,59 – Hie172; 2,71 – Asn214	Ligação de H (não clássica)	van der Waals (Gly256) Alquila (Cys300) Pi-Sigma (Ile213) Amida-Pi <i>Stacked</i>	0
DB00549_BI_005	5/ 2,43 – Arg217; 2,55 – Gly170 ou 2,55 – Gly138; 2,83 – Gly170 ou 2,96 – Gly138; 2,85 – Phe3; 3,11 – Ile213	Pi-Ânion	van der Waals (Gln256, Cys300) Alquila Pi-Sigma (Ile213)	0
DB11751	3/ 1,92 – Glu166 ou 2,79 – Phe140; 2,49 – Phe140; 2,81 – Phe3	Ligações de H (não clássicas) Pi-Ânion	van der Waals	0

Tabela 7 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 1 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(conclusão)

Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB11751_BI_002	4/ 1,91 – Glu166 ou 2,75 – Phe140; 2,30 – Thr169; 2,45 – Phe140; 2,88 – Phe3	Ligação de H (não clássica) Pi-Ânion	van der Waals	0



Fonte: do autor.

Nota: Os valores das distâncias das ligações de H são dados na unidade Å; o “ou” refere-se a duas possibilidades evidenciadas pelo software Discovery Studio para valores de distâncias de ligação de H entre um mesmo átomo do ligante e dois resíduos de aminoácidos diferentes da enzima M^{pro}; os percentuais apresentados entre parênteses referem-se às espécies químicas do ligante que são predominantes em pH 7,4; resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo ou apontados como importantes por Gunther *et al.* (2021) foram citados entre parênteses.

Tabela 8 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continua)

Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
---------	--	---------------------------	---------------------	--------------------------

Tabela 8 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 2 da proteína M^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

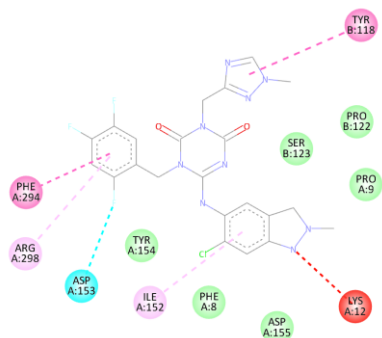
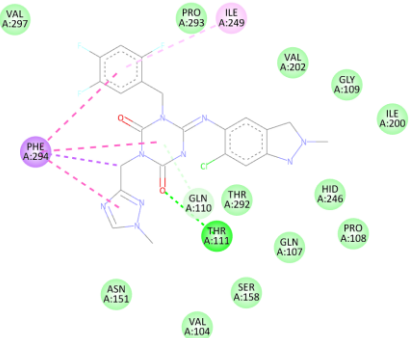
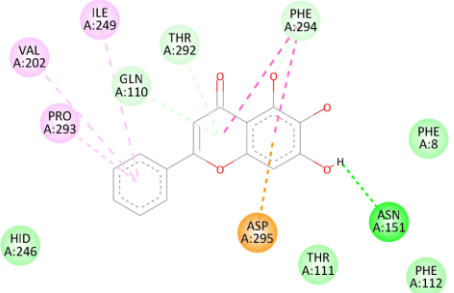
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>Ensitrelvir_1</p> 	0	Halogênio (Asp153)	van der Waals (Cys145, Cys300) Pi-Alquila (Arg298) Pi-Pi T- <i>Shaped</i> (Phe294)	Doador-doador (Lys12)
<p>Ensitrelvir_2</p> 	1/ 1,88 – Thr111	Ligação de H (não clássica – Gln110)	van der Waals (Val202, Thr292, Val297) Pi-Alquila (Ile249) Pi-Sigma (Phe294) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294) Pi-Pi T- <i>Shaped</i> (Phe294)	0
<p>Baicalein (36%)</p> 	1/ 2,04 – Asn151	Ligações de H (não clássicas – Gln110; Thr292, Phe294) Pi-Ânion	van der Waals Pi-Alquila (Val202) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294)	0

Tabela 8 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 2 da proteína M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

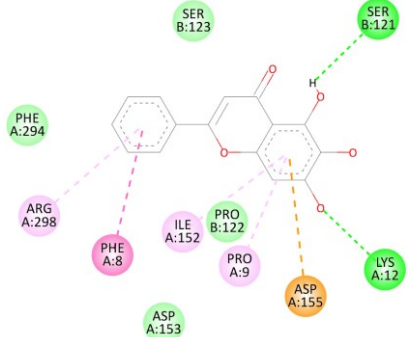
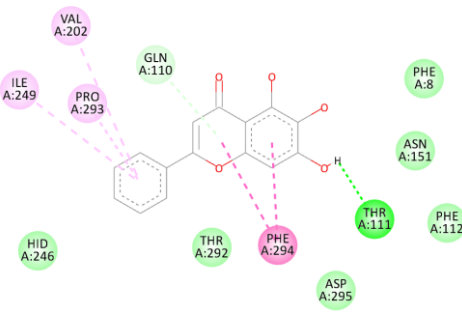
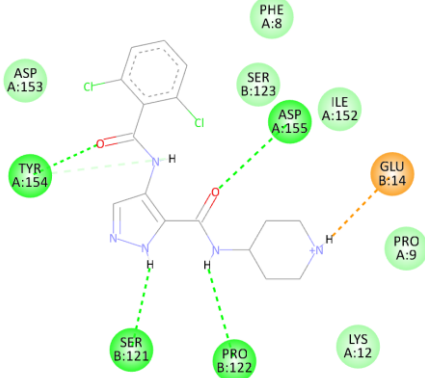
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>Baicalein (29%)</p> 	2/ 2,37 – Lys12; 2,52 – Ser121	Pi-Ânion	van der Waals (Asp153, Phe294) Pi-Alquila (Arg298) Pi-Pi <i>T-Shaped</i>	0
<p>Baicalein (27%)</p> 	1/ 1,94 – Thr111	Ligação de H (não clássica – Gln110)	van der Waals (Thr292) Pi-Alquila (Val202, Ile249) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294)	0
<p>AT-7519</p> 	4/ 1,94 – Tyr154; 2,06 – Ser121; 2,47 – Asp155; 2,55 – Pro122	Ligação de H (não clássica) Ponte salina	van der Waals (Asp153)	0

Tabela 8 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 2 da proteína M^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

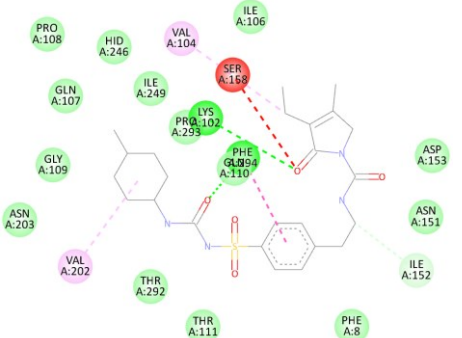
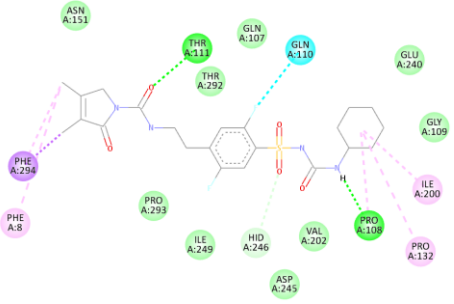
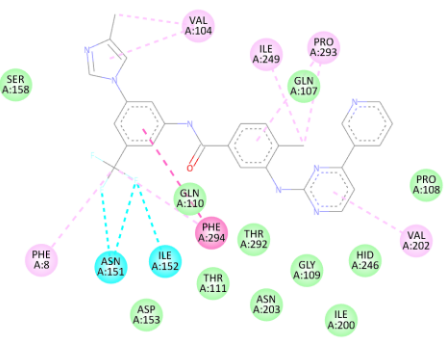
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>DB00222</p> 	<p>2/ 2,04 – Phe294; 3,08 – Lys102</p>	Ligação de H (não clássica)	van der Waals (Gln110, Asp153, Thr292) Alquila (Val202) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294)	Acceptor-acceptor (Ser158)
<p>DB00222_BI_004</p> 	<p>2/ 2,15 – Thr111; 2,84 – Pro108</p>	Ligação de H (não clássica) Halogênio (Gln110)	van der Waals (Val202, Ile249, Thr292) Alquila Pi-Alquila (Phe294) Pi-Sigma (Phe294)	0
<p>DB04868</p> 	0	Halogênio	van der Waals (Gln110, Asp153, Thr292) Alquila (Ile249) Pi-Alquila (Val202, Phe294) Pi-Pi <i>T-Shaped</i> (Phe294)	0

Tabela 8 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 2 da proteína M^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

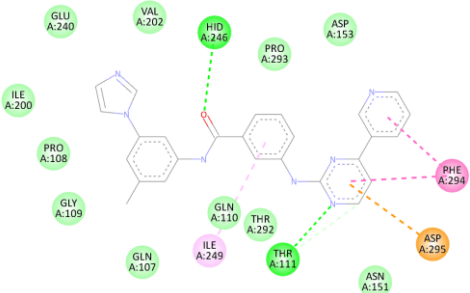
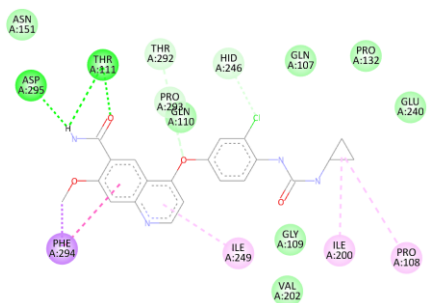
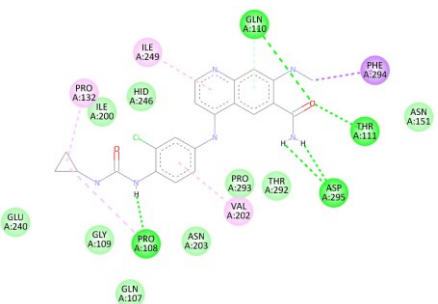
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>DB04868_BI_003</p> 	<p>2/ 2,49 – Thr111; 3,04 – Hid246</p>	<p>Ligação de H (não clássica) Pi-Ânion</p>	<p>van der Waals (Gln110, Asp153, Val202, Thr292) Pi-Alquila (Ile249) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294)</p>	0
<p>DB09078</p> 	<p>2/ 1,80 – Thr111; 2,44 – Thr111 ou 2,86 – Asp295</p>	<p>Ligações de H (não clássicas – Thr292)</p>	<p>van der Waals (Gln110, Val202) Alquila Pi-Alquila (Ile249) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294) Pi-Sigma (Phe294)</p>	0
<p>DB09078_BI_002</p> 	<p>5/ 2,13 – Thr111; 2,56 – Asp295; 2,61 – Asp295; 2,86 – Gln110; 3,06 – Pro108</p>	<p>Ligação de H (não clássica – Gln110)</p>	<p>van der Waals (Thr292) Alquila Pi-Alquila (Val202, Ile249) Pi-Sigma (Phe294)</p>	0

Tabela 8 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 2 da proteína M^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

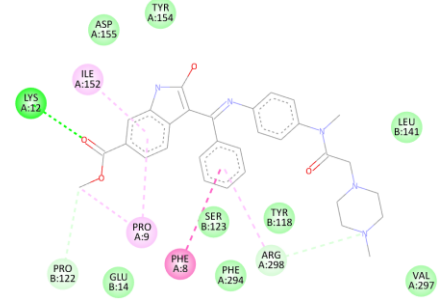
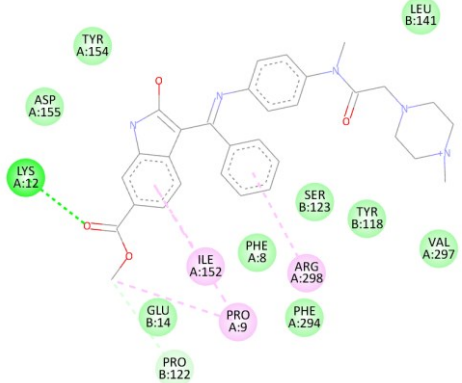
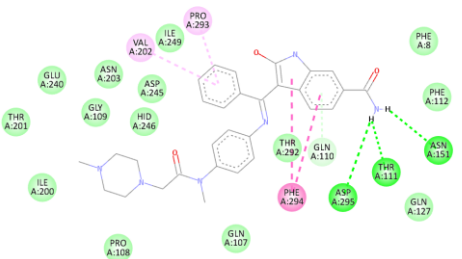
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB09079 (72%) 	1/ 2,22 –Lys12	Ligações de H (não clássicas – Arg298)	van der Waals (Phe294, Val297) Alquila Pi-Alquila (Arg298) Pi-Pi <i>Stacked</i>	0
DB09079 (25%) 	1/ 2,24 –Lys12	Ligação de H (não clássica)	van der Waals (Phe294, Val297) Alquila Pi-Alquila (Arg298)	0
DB09079_BI_002 (72%) 	2/ 1,98 – Thr111 ou 2,95 – Asp295; 2,52 – Asn151	Ligação de H (não clássica – Gln110)	van der Waals (Ile249, Thr292) Pi-Alquila (Val202) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294)	0

Tabela 8 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 2 da proteína M^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(continuação)

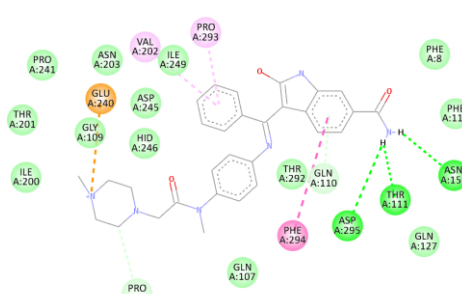
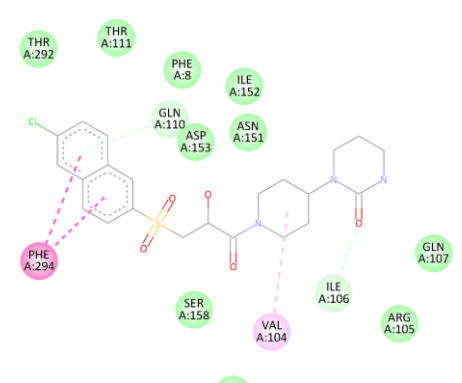
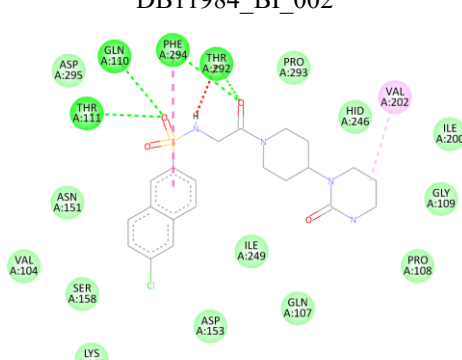
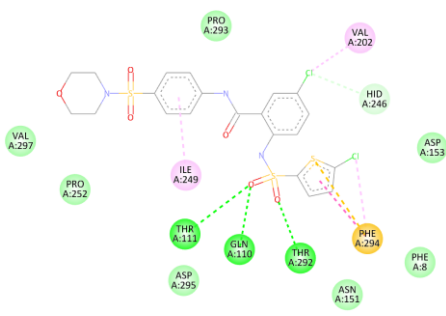
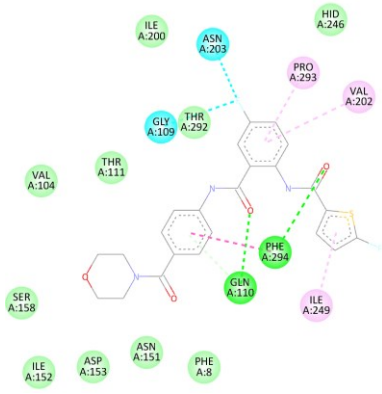
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB09079_BI_002 (25%) 	2/ 1,97 – Thr111 ou 3,03 – Asp295; 2,47 – Asn151	Ligações de H (não clássicas – Gln110) Cargas atrativas	van der Waals (Ile249, Thr292) Pi-Alquila (Val202) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294)	0
DB11984 	0	Ligações de H (não clássicas – Gln110)	van der Waals (Asp153, Thr292) Alquila (Val202) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294)	0
DB11984_BI_002 	4/ 2,25 – Thr292; 2,30 – Gln110; 2,34 – Thr111; 2,35 – Phe294	0	van der Waals (Asp153, Ile249) Alquila (Val202) Pi-Pi <i>T-Shaped</i> (Phe294)	Doador-doador (Thr292)

Tabela 8 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 2 da proteína M^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 7VU6) nos estudos de *docking*

(conclusão)

Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>DB12805</p> 	<p>3/ 2,07 – Thr292; 2,21 – Gln110; 2,72 – Thr111</p>	<p>Ligação de H (não clássica) Pi-Enxofre (Phe294)</p>	<p>van der Waals (Asp153, Val297) Alquila (Val202) Pi-Alquila (Ile249, Phe294) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294)</p>	0
<p>DB12805_BI_004</p> 	<p>2/ 2,19 – Phe294; 2,22 – Gln110</p>	<p>Ligação de H (não clássica – Gln110) Halogênio</p>	<p>van der Waals (Asp153, Thr292) Pi-Alquila (Val202, Ile249) Pi-Pi <i>Stacked</i> (Phe294)</p>	0

Fonte: do autor.

Nota: Os valores das distâncias das ligações de H são dados na unidade Å; o “ou” refere-se a duas possibilidades evidenciadas pelo software Discovery Studio para valores de distâncias de ligação de H entre um mesmo átomo do ligante e dois resíduos de aminoácidos diferentes da enzima M^{PRO}; os percentuais apresentados entre parênteses referem-se às espécies químicas do ligante que são predominantes em pH 7,4; resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo ou apontados como importantes por Gunther *et al.* (2021) foram citados entre parênteses.

Tabela 9 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) nos estudos de *docking*

(continua)

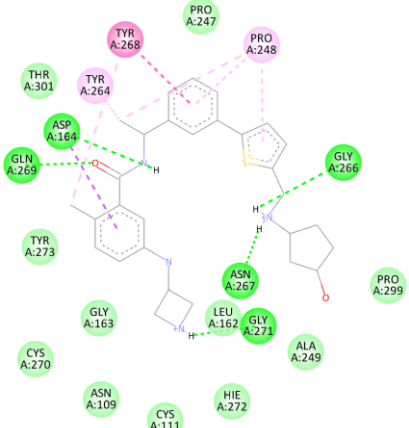
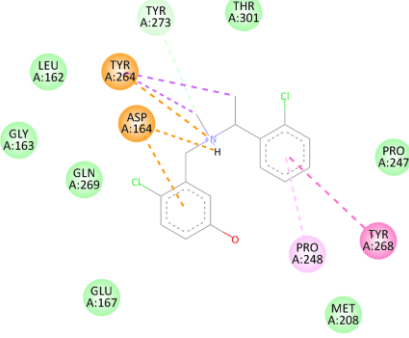
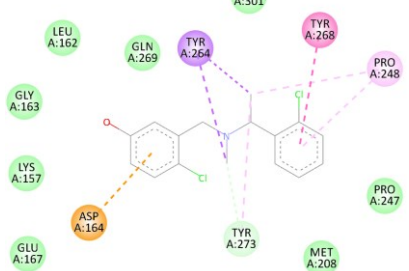
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>XR8-83</p> 	<p>5/</p> <p>1,82 – Gln269; 2,20 – Asp164; 2,22 – Asn267; 2,39 – Gly266; 2,43 – Gly271</p>	0	<p><u>van der Waals</u></p> <p><u>(Cys111,</u> <u>Hie272)</u></p> <p>Alquila Pi-Alquila Pi-Sigma Pi-Pi T-<i>Shaped</i></p>	0
<p>Jun9-13-7 (58%)</p> 	0	<p>Ligação de H (não clássica)</p>	<p>van der Waals Pi-Alquila Pi-Sigma Pi-Pi T-<i>Shaped</i></p>	0
<p>Jun9-13-7 (37%)</p> 	0	<p>Ligação de H (não clássica)</p>	<p>van der Waals Alquila Pi-Alquila Pi-Sigma Pi-Pi T-<i>Shaped</i></p>	0

Tabela 9 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) nos estudos de *docking*

(continuação)

Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB00222	3/ 2,10 – Tyr268; 2,37 – Gly266; 2,90 – Asp164		van der Waals Alquila Pi-Alquila Pi-Pi T- <i>Shaped</i> Amida-Pi <i>Stacked</i>	0
DB00222_BI_005	2/ 2,41 – Tyr268; 2,62 – Tyr268	Ligação de H (não clássica) Halogênio	van der Waals Alquila Pi-Alquila Pi-Pi T- <i>Shaped</i>	0
DB00549	2/ 2,05 – Gln250; 2,75 – Gln250		van der Waals Alquila Pi-Alquila Amida-Pi <i>Stacked</i>	Doador-doador (Gln269)

Tabela 9 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) nos estudos de *docking*

(continuação)

Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB00549_BI_005	3/ 2,33 – Asn267; 2,38 – Gln269; 3,02 – Asn267	Ligações de H (não clássicas)	van der Waals Alquila Pi-Alquila Pi-Sigma Pi-Pi <i>Stacked</i> Pi-Pi <i>T-Shaped</i> Amida-Pi <i>Stacked</i>	0
DB00619 (40%)	0	Pi-Ânion	van der Waals Pi-Alquila Pi-Pi <i>Stacked</i> Pi-Pi <i>T-Shaped</i>	0
DB00619 (39,5%)	0	Ligação de H (não clássica) Pi-Ânion	van der Waals Alquila Pi-Alquila Pi-Sigma Amida-Pi <i>Stacked</i>	0

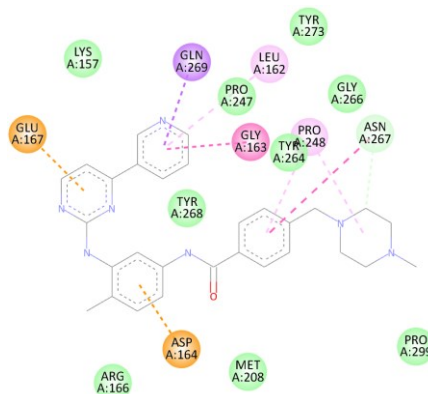
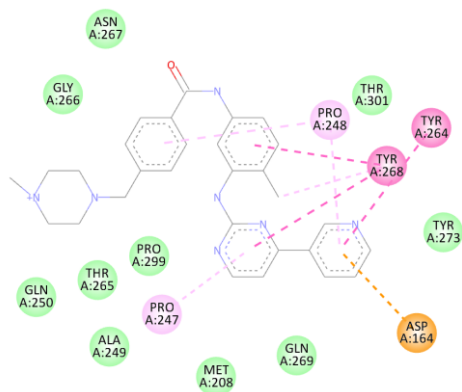
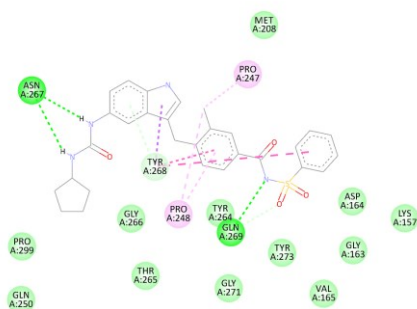


Tabela 9 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) nos estudos de *docking*

(continuação)

Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
<p>DB00619 (20%)</p>	1/ 2,54 – Gly266	Ligação de H (não clássica) Pi-Ânion	van der Waals Pi-Alquila Pi-Sigma Pi-Pi T- <i>Shaped</i> Amida-Pi <i>Stacked</i>	0
<p>DB00619_BI_002</p>	0	Ligações de H (não clássicas) Pi-Ânion	van der Waals Pi-Alquila Pi-Sigma Amida-Pi <i>Stacked</i>	0
<p>DB04868</p>	1/ 2,51 – Gly266	Ligações de H (não clássicas) Pi-Ânion	van der Waals Pi-Alquila Pi-Pi T- <i>Shaped</i>	0

Tabela 9 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) nos estudos de *docking*

(continuação)

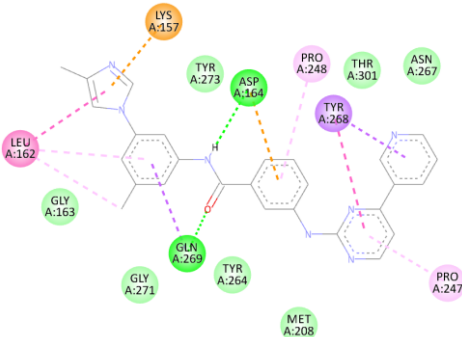
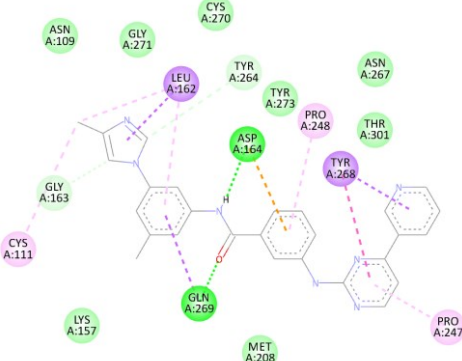
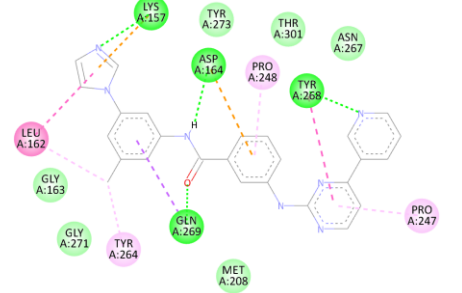
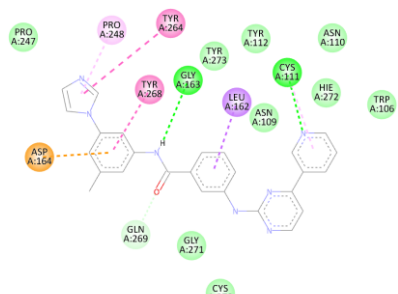
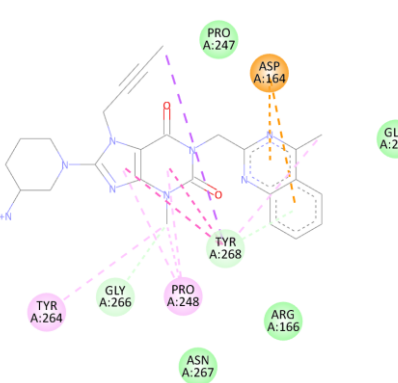
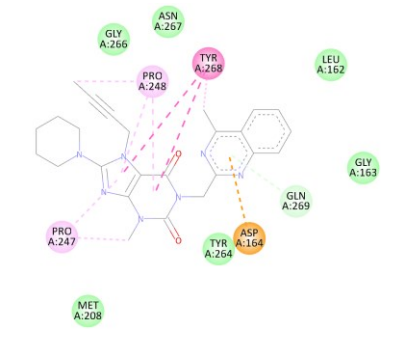
Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB04868_BI_002 (pose 1)	2/ 1,75 – Gln269; 2,23 – Asp164	Pi-Ânion Pi-Cátion	van der Waals Alquila Pi-Alquila Pi-Sigma Pi-Pi T- <i>Shaped</i> Amida-Pi <i>Stacked</i>	0
				
DB04868_BI_002 (pose 2)	2/ 1,75 – Gln269; 2,17 – Asp164	Ligações de H (não clássicas) Pi-Ânion	van der Waals Alquila (Cys111) Pi-Alquila Pi-Sigma Pi-Pi T- <i>Shaped</i>	0
				
DB04868_BI_003 (pose 1)	4/ 1,81 – Gln269; 2,08 – Asp164; 2,42 – Lys157; 2,51 – Tyr268	Pi-Ânion Pi-Cátion	van der Waals Alquila Pi-Alquila Pi-Sigma Pi-Pi T- <i>Shaped</i> Amida-Pi <i>Stacked</i>	0
				

Tabela 9 – Detalhamento das interações intermoleculares estabelecidas pelos ligantes-controle, derivados e seus precursores com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 7JN2) nos estudos de *docking*

(conclusão)

Ligante	Ligações de H clássicas (número/distâncias – resíduos)	Outras interações polares	Interações apolares	Interações desfavoráveis
DB04868_BI_003 (pose 3) 	2/ <u>2,70 – Cys111</u> ; 3,03 – Gly163	Ligação de H (não clássica) Pi-Ânion	<u>van der Waals (Hic272)</u> Pi-Alquila Pi-Sigma Pi-Pi T- <i>Shaped</i>	0
DB08882 	0	Ligações de H (não clássicas) Pi-Ânion	van der Waals Alquila Pi-Alquila Pi-Sigma Pi-Pi T- <i>Shaped</i>	0
DB08882_BI_001 	0	Ligação de H (não clássica) Pi-Ânion	van der Waals Alquila Pi-Alquila Pi-Pi T- <i>Shaped</i>	0

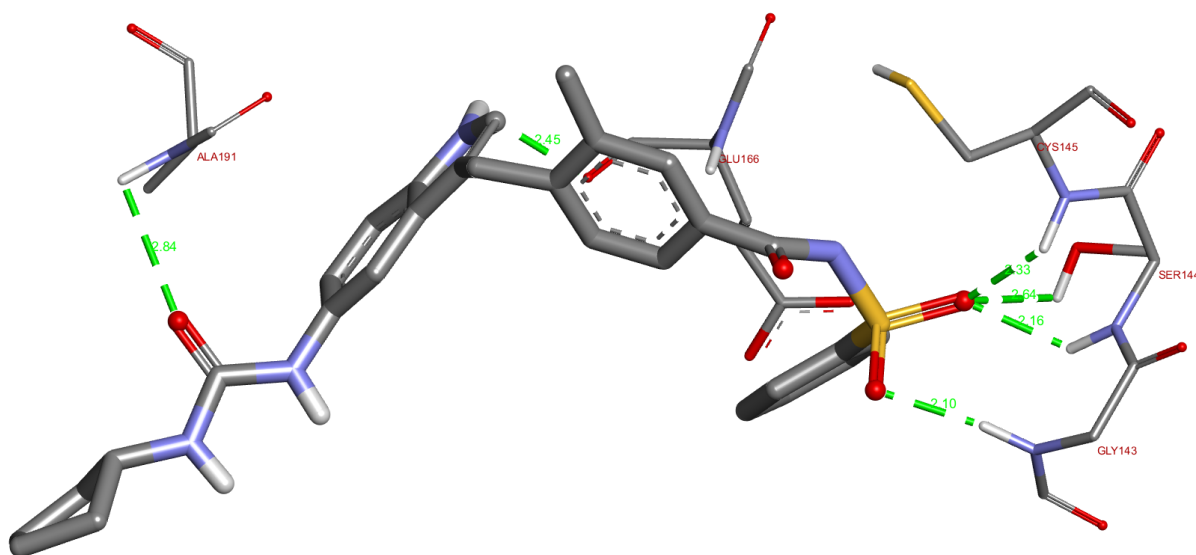
Fonte: do autor.

Nota: Os valores das distâncias das ligações de H são dados na unidade Å; os percentuais apresentados entre parênteses referem-se às espécies químicas do ligante que são predominantes em pH 7,4; resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo foram citados entre parênteses, e estes, assim como os tipos de interações que eles realizaram, foram sublinhados e destacados em negrito azul turquesa.

Pelo exposto nas tabelas 6 a 9, é evidente a melhoria da afinidade dos ligantes pelos sítios ativo e alostéricos da M^{pro} e pelo sítio ativo da PL^{pro} após o uso do bioisosterismo, haja vista o aumento das interações intermoleculares da maioria dos derivados em comparação com os seus respectivos precursores.

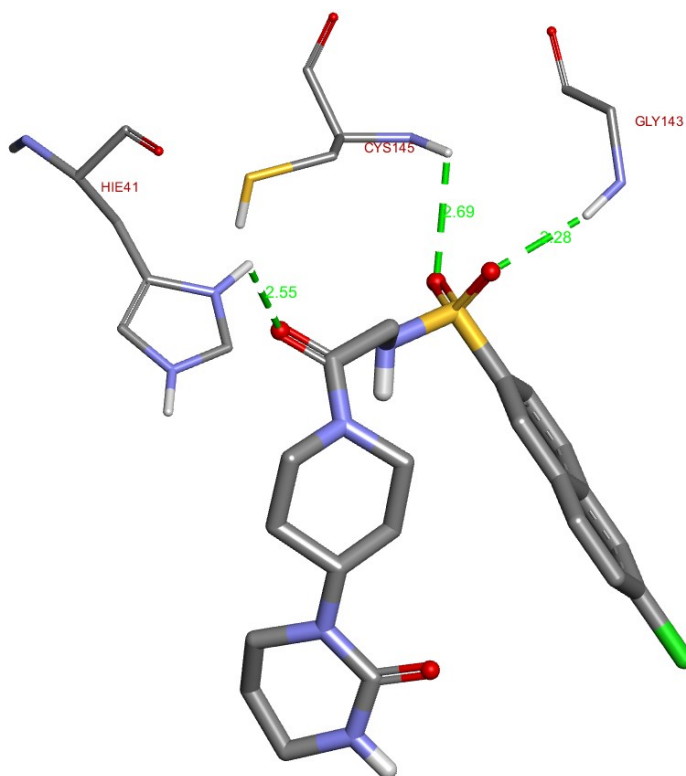
Com exceção do derivado DB16650_BI_003, e diferentemente de todos os ligantes precursores, exceto o DB12805, os demais ligantes contendo biosósteros presentes na tabela 6 interagiram por meio de ligações de H clássicas com pelo menos um dos dois resíduos de aminoácidos que compõem a díade catalítica da enzima M^{pro} (His41 e Cys145). Dentre esses resultados, o de maior destaque foi o do ligante DB12355_BI_004 devido a duas razões. A primeira delas é a realização de um número maior de ligações de H clássicas com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da M^{pro}, quando comparado aos dois tautômeros do ensitrelvir, inibidor não covalente de maior potência biológica já reportado na literatura.¹⁰¹ Este número, igual a 8, foi quatro vezes maior do que o expresso pelo seu respectivo ligante precursor (DB12355). A segunda razão se dá em virtude do valor da distância da ligação de H clássica com o resíduo de Cys145 ter sido menor do que as distâncias estabelecidas entre os ligantes-controle e este mesmo aminoácido. Tal fato foi igualmente observado no resultado do derivado DB00549_BI_005. Ademais, o único ligante que estabeleceu ligações de H clássicas tanto com His41 quanto com Cys145 foi o derivado DB11984_BI_002, e, ao contrário do tautômero 2 do ensitrelvir que manifestou uma interação desfavorável com o resíduo Thr26, os derivados DB00549_BI_005, DB11984_BI_002 e DB12355_BI_004 não tiveram alertas neste sentido. Finalmente, estas três moléculas derivadas por bioisosterismo garantiram, tal qual os tautômeros do ensitrelvir, interações intermoleculares com resíduos de aminoácidos de todos os 4 subsítios que compõem o sítio ativo da M^{pro} do SARS-CoV-2. O subsítio S1 é formado pelos resíduos Phe140, Asn142, Ser144, His163, Glu166 e His172; o S1', pela díade catalítica – His41 e Cys145 – e pelos resíduos Thr25 e Leu27; o S2, pelos resíduos His41, Met49, Tyr54, Met165 e Asp187; e o S4, pelos resíduos Met165, Leu167, Phe185, Gln189 e Gln192.^{40,127-130} As Figuras 14 a 19 ilustram os resultados em 3D dos derivados DB00549_BI_005, DB11984_BI_002 e DB12355_BI_004 na perspectiva das ligações de H clássicas estabelecidas, assim como destes derivados e de ambos os tautômeros do ensitrelvir no viés da complementaridade molecular; para fins de maior clareza, no zoom destas imagens, os átomos dos ligantes que interagiram com a díade catalítica – His41 e Cys145 – foram evidenciados com círculos verde-claros; ademais, houve diferenciação de coloração das superfícies eletrostáticas dos átomos dos resíduos de aminoácidos que compõem a enzima M^{pro} (carbono – cinza; enxofre – amarelo; hidrogênio – branco; nitrogênio – azul; oxigênio – vermelho).

Figura 14 – Ligações de H clássicas com suas respectivas distâncias entre o derivado DB00549_BI_005 e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da M^{pro}



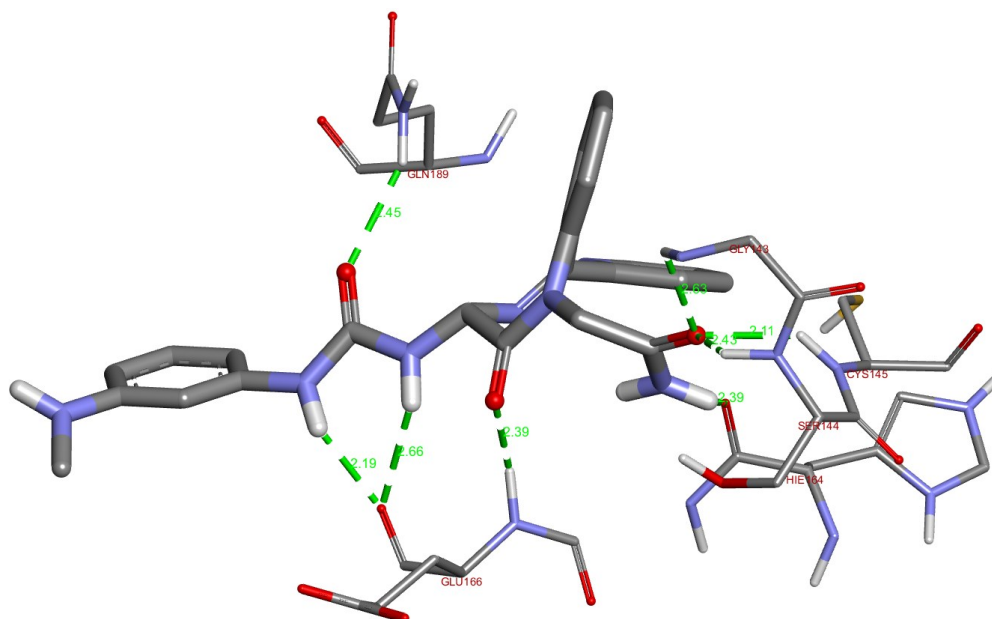
Fonte: do autor.

Figura 15 – Ligações de H clássicas com suas respectivas distâncias entre o derivado DB11984_BI_002 e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da M^{pro}



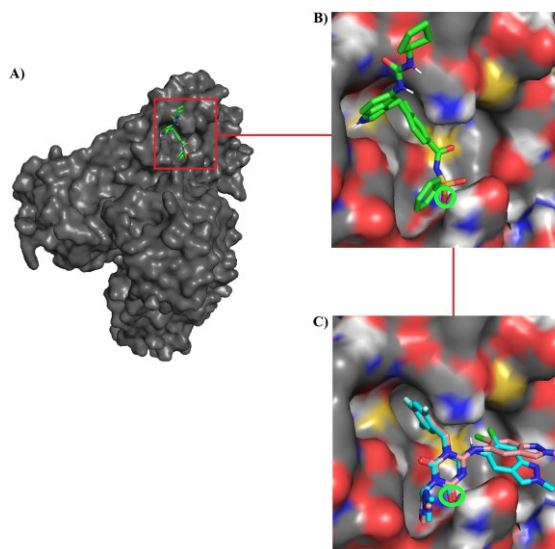
Fonte: do autor.

Figura 16 – Ligações de H clássicas com suas respectivas distâncias entre o derivado DB12355_BI_004 e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da M^{pro}



Fonte: do autor.

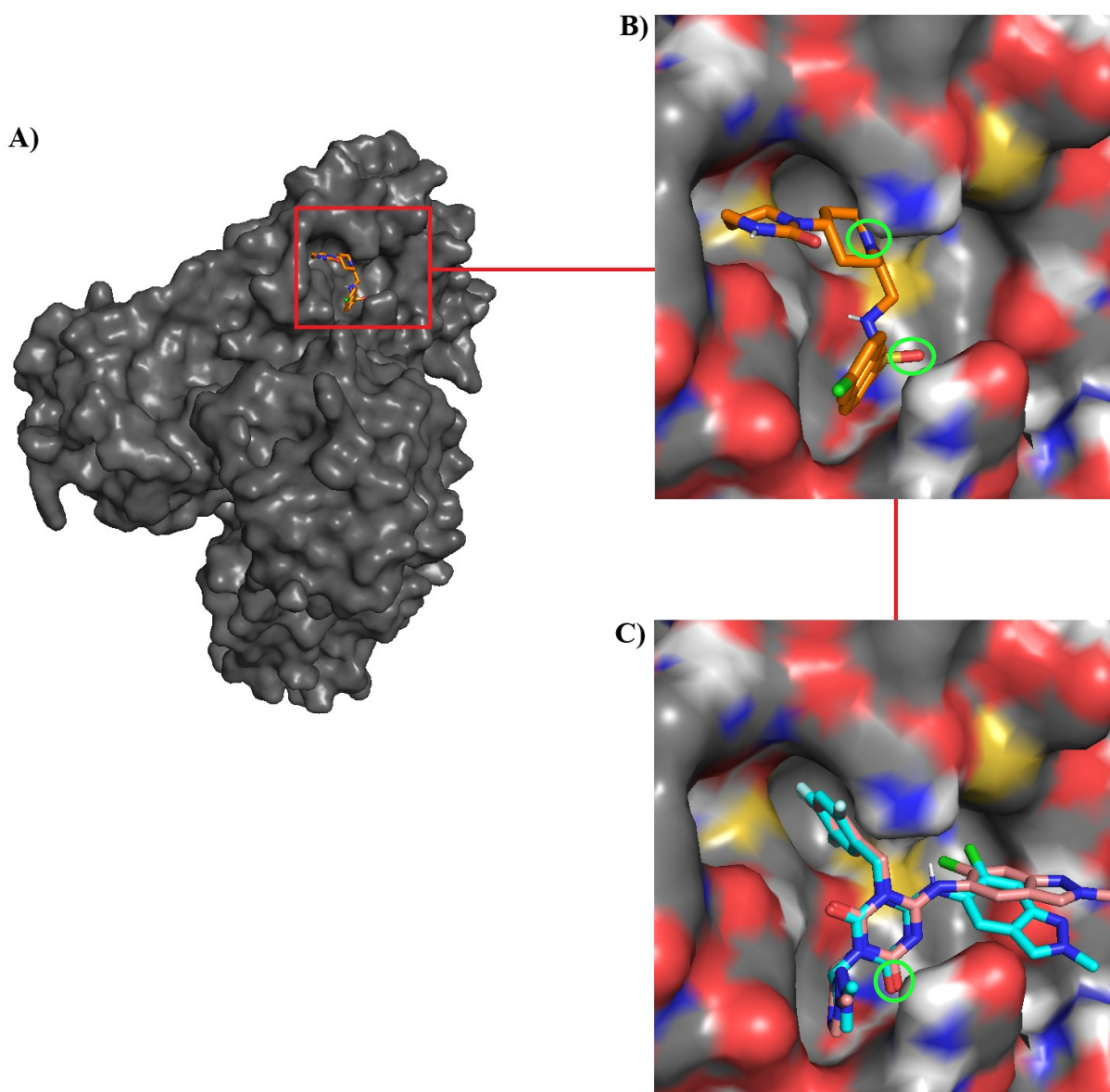
Figura 17 – Comparação entre a ancoragem do ligante DB00549_BI_005 e as ancoragens dos tautômeros do ensitrelvir no sítio ativo da M^{pro}



Fonte: do autor.

Legenda: A) Ligante DB00549_BI_005 ancorado no sítio ativo da enzima M^{pro}; seus átomos de carbono foram coloridos em verde claro;
 B) Zoom de A); os átomos do ligante envolvidos nas interações com o resíduo Cys145 foram circulos em verde;
 C) Zoom dos tautômeros 1 e 2 do ligante-controlado ensitrelvir ancorados no sítio ativo da enzima M^{pro}; seus átomos de carbono foram coloridos, respectivamente, em azul ciano e em rosa salmão; os átomos dos ligantes envolvidos nas interações com o resíduo Cys145 foram circulos em verde.

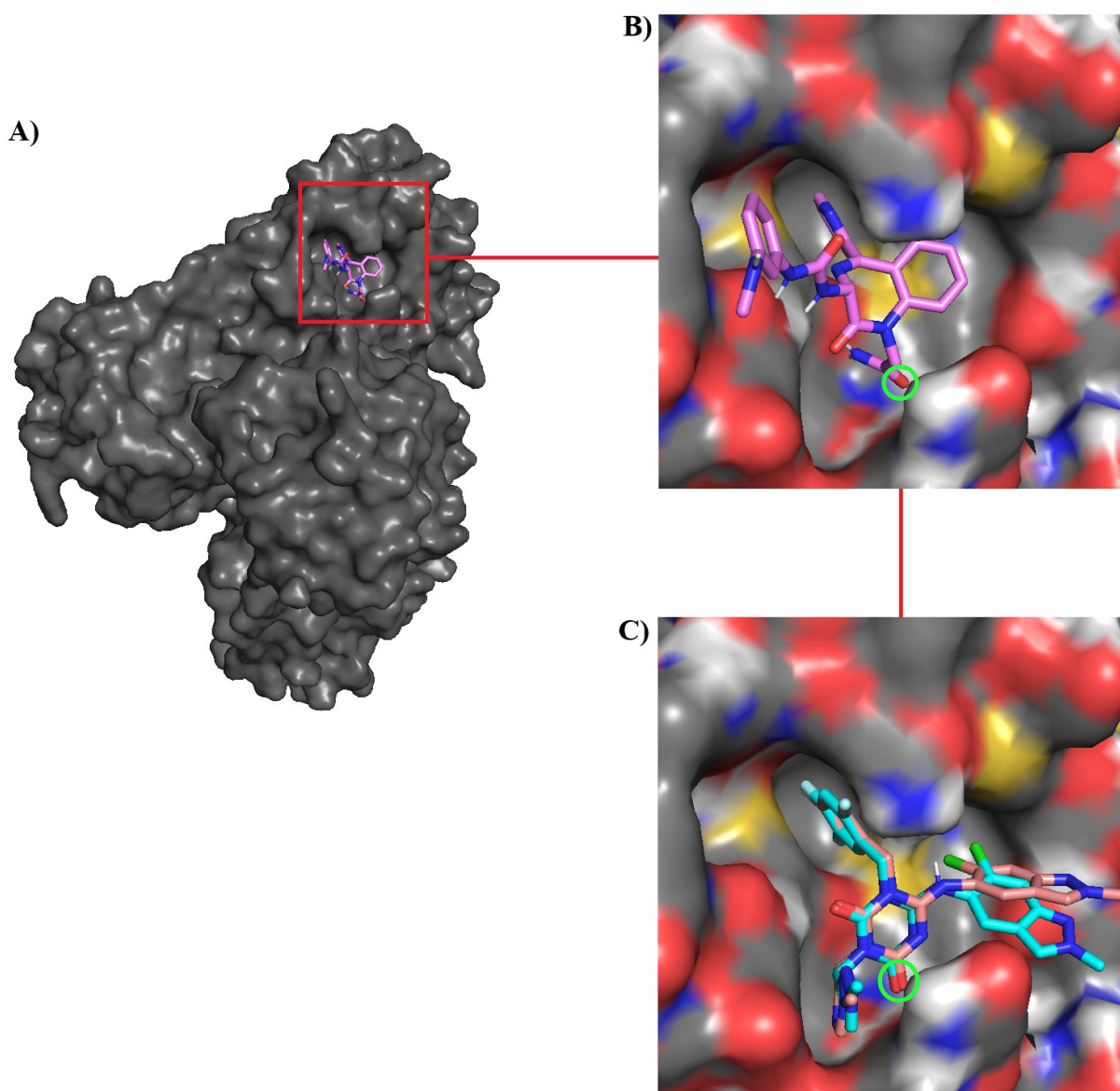
Figura 18 – Comparação entre a ancoragem do ligante DB11984_BI_002 e as ancoragens dos tautômeros do ensitrelevir no sítio ativo da M^{Pro}



Fonte: do autor.

Legenda: A) Ligante DB11984_BI_002 ancorado no sítio ativo da enzima M^{Pro} ; seus átomos de carbono foram coloridos em laranja;
 B) Zoom de A); os átomos do ligante envolvidos nas interações com os resíduos His41 e Cys145 foram circulos em verde;
 C) Zoom dos tautômeros 1 e 2 do ligante-controle ensitrelevir ancorados no sítio ativo da enzima M^{Pro} ; seus átomos de carbono foram coloridos, respectivamente, em azul ciano e em rosa salmão; os átomos dos ligantes envolvidos nas interações com o resíduo Cys145 foram circulos em verde.

Figura 19 – Comparação entre a ancoragem do ligante DB12355_BI_004 e as ancoragens dos tautômeros do ensitrelvir no sítio ativo da M^{pro}



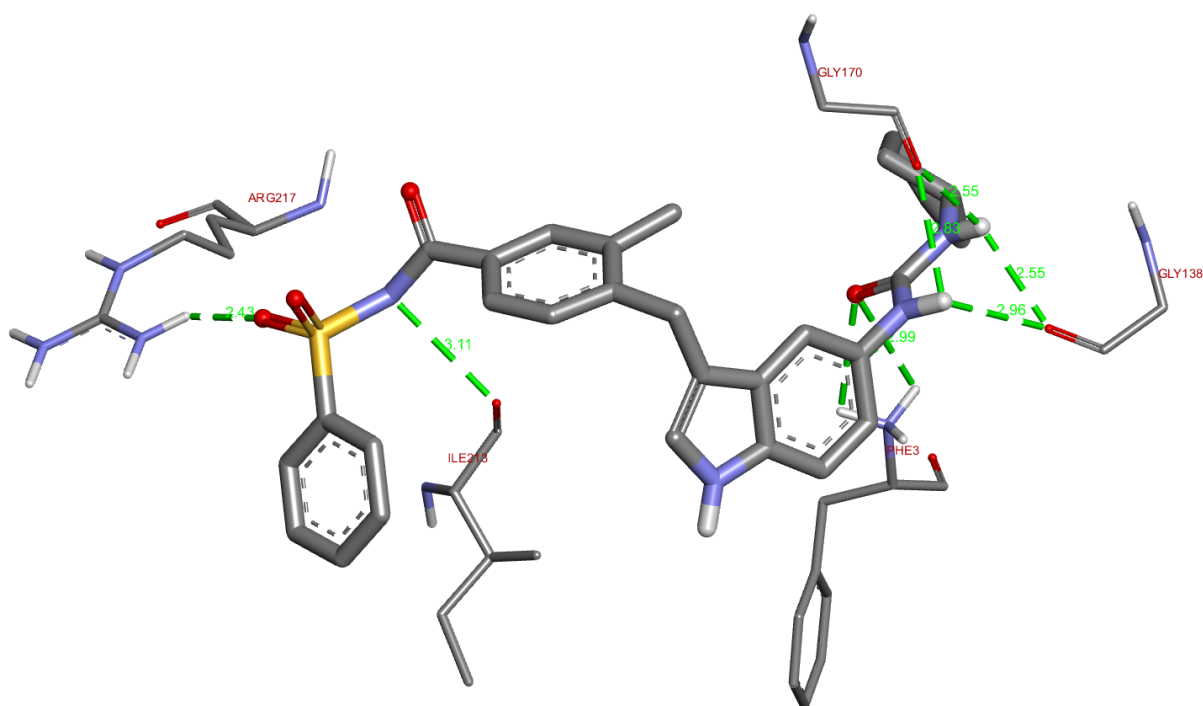
Fonte: do autor.

Legenda: A) Ligante DB12355_BI_004 ancorado no sítio ativo da enzima M^{pro} ; seus átomos de carbono foram coloridos em lilás;
 B) Zoom de A); os átomos do ligante envolvidos nas interações com o resíduo Cys145 foram circutados em verde;
 C) Zoom dos tautômeros 1 e 2 do ligante-controle ensitrelvir ancorados no sítio ativo da enzima M^{pro} ; seus átomos de carbono foram coloridos, respectivamente, em azul ciano e em rosa salmão; os átomos dos ligantes envolvidos nas interações com o resíduo Cys145 foram circutados em verde.

Dentre os principais resíduos de aminoácidos que compõem o sítio alostérico 1 da M^{pro} descrito por Gunther e colaboradores (2021), todos os ligantes-controle estabeleceram interações com o resíduo Cys300 mediante ligação de H não clássica ou interação apolar do

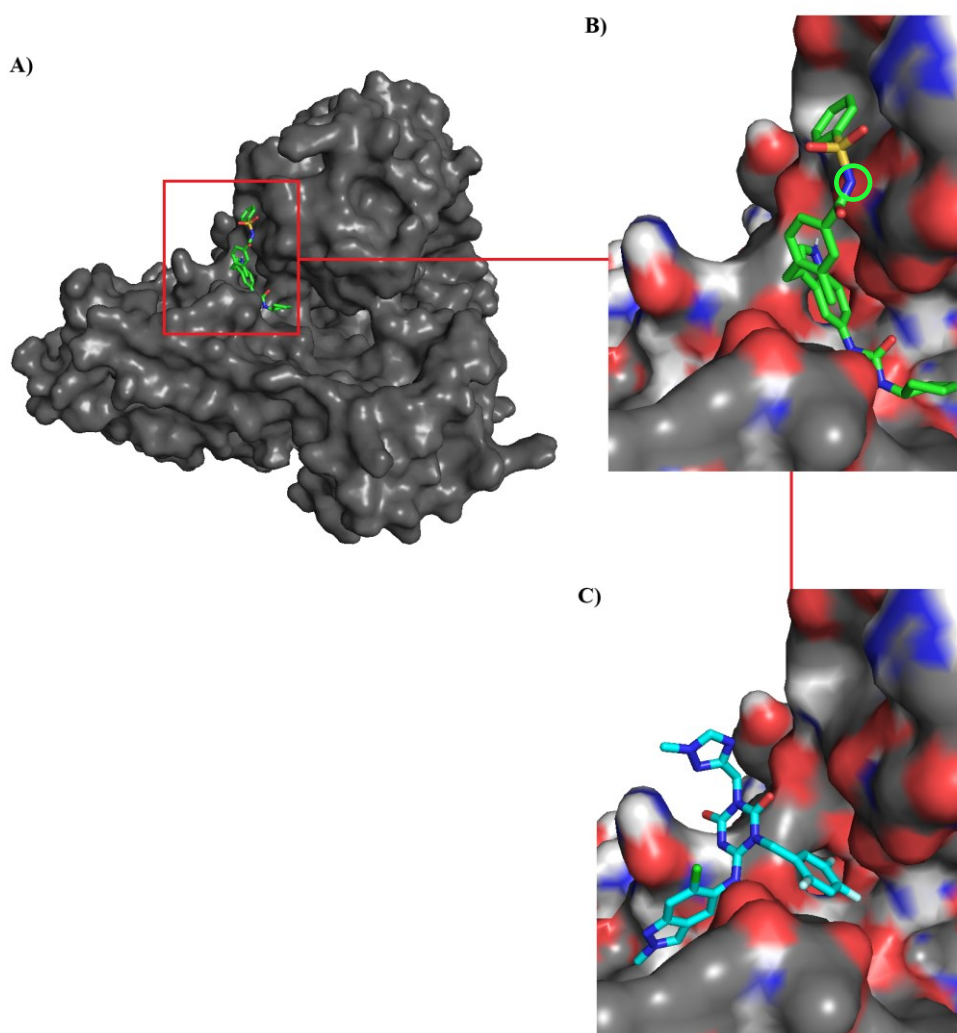
tipo van der Waals, a qual também foi expressa pelo tautômero 2 do ensitrelvir com o resíduo Ile213 e pelo tautômero 1 deste fármaco com o resíduo Cys145 do protômero B. Por outro lado, o ligante DB00549_BI_005, concebido pela estratégia de bioisosterismo, foi o único que estabeleceu uma ligação de H clássica com um dos resíduos de aminoácidos supracitados, nomeadamente a Ile213, além de interações apolares com três aminoácidos que integram o sítio alostérico 1; são elas, van der Waals com Gln256 e Cys300, e Pi-Sigma com Ile213. As Figuras 20 e 21 explicitam resultados em 3D do derivado DB00549_BI_005 na perspectiva das ligações de H clássicas estabelecidas, bem como os resultados em 3D deste derivado e do tautômero 1 do ensitrelvir no viés da complementaridade molecular, com o propósito de ilustrar a proximidade do nitrogênio sulfonamídico do ligante DB00549_BI_005, destacado por um círculo verde claro, do oxigênio da carbonila do resíduo Ile213; para fins de maior clareza, no zoom destas imagens, houve diferenciação de coloração das superfícies eletrostáticas dos átomos dos resíduos de aminoácidos que formam a enzima M^{pro} (carbono – cinza; enxofre – amarelo; hidrogênio – branco; nitrogênio – azul; oxigênio – vermelho).

Figura 20 – Ligações de H clássicas com suas respectivas distâncias entre o derivado DB00549_BI_005 e resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 1 da M^{pro}



Fonte: do autor.

Figura 21 – Comparação entre a ancoragem do ligante DB00549_BI_005 e as ancoragens dos tautômeros do ensitrelvir no sítio alostérico 1 da M^{pro}



Fonte: do autor.

Legenda: A) Ligante DB00549_BI_005 ancorado no sítio alostérico 1 da enzima M^{pro}; seus átomos de carbono foram coloridos em verde claro;

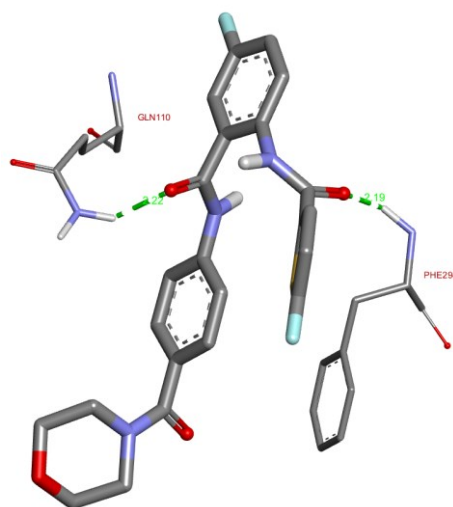
B) Zoom de A); o átomo do ligante DB00549_BI_005 envolvido na interação com o resíduo Ile213 foi circulado em verde;

C) Zoom do tautômero 1 do ligante-controle ensitrelvir ancorado no sítio alostérico 1 da enzima M^{pro}; seus átomos de carbono foram coloridos em azul ciano.

No tocante ao sítio alostérico 2, o resíduo Arg298, que, por sua vez, tem um papel crucial no processo de dimerização, isto é, de união dos dois protômeros que constituem a M^{pro}, interagiu apenas com o tautômero 1 do ensitrelvir, com uma das espécies químicas do ligante Baicalein e com ambas as espécies do precursor DB09079 mediante uma interação apolar do tipo Pi-Alquila.⁵³ A espécie predominante do precursor DB09079 interagiu adicionalmente com a Arg298 mediante uma ligação de H não clássica. Além disso, com exceção da molécula AT-7519, os demais ligantes-controle, assim como todos os derivados por bioisosterismo expostos

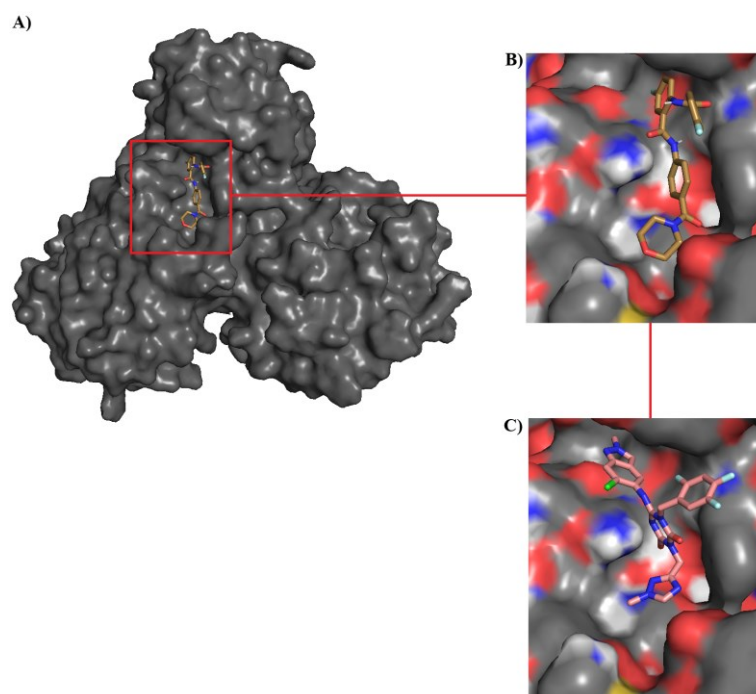
na tabela 8, interagiram com mais de um dos resíduos de aminoácidos que compõem o segundo sítio alostérico da M^{Pto}. A maioria das interações estabelecidas foram de natureza apolar, seguidas por interações polares mais fracas do tipo ligação de H não clássica, halogênio e Pi-Cátion. Os únicos ligantes que estabeleceram ligações de H clássicas com resíduos de aminoácidos específicos do sítio alostérico 2 foram o derivado DB09078_BI_002, com a Gln110, e os derivados DB11984_BI_002 e DB12805_BI_004, com a Gln110 e a Phe294. Interessantemente, este resíduo de aminoácido foi o mais versátil de todos, haja vista o estabelecimento, com átomos dos ligantes em estudo, de interações apolares do tipo van der Waals, Pi-Alquila, Pi-Sigma, Pi-Pi *Stacked* e Pi-Pi *T-Shaped*, bem como de interações polares do tipo Pi-Cátion e Pi-Enxofre, além de ligações de H clássicas e não clássicas. No que tange ao número de ligações de H clássicas realizadas, os derivados DB09078_BI_002 e DB11984_BI_002 foram os que apresentaram a maior quantidade, igualando-se ao ligante-controle AT-7519. No que se refere ao derivado DB11984_BI_002, enquanto ele apresentou 4 ligações de H clássicas, seu precursor realizou 0. Por fim, uma ocorrência incitante observada foi a coincidente relação entre os valores de *score* mais favoráveis e o estabelecimento de interações intermoleculares com 6 dos 7 principais resíduos de aminoácidos que compõem o sítio alostérico 2 da M^{Pto}. Esse fato aconteceu com os derivados DB12805_BI_004 e DB04868_BI_003, os quais apresentaram valores de *score* iguais a -9,5 Kcal/mol e a -9,4 Kcal/mol, respectivamente, e interagiram com os resíduos Gln110, Asp153, Val202, Ile249, Thr292, Phe294. Além destes dois ligantes, apenas o precursor DB12805 e o derivado DB11984_BI_002 estabeleceram interações com pelo menos um destes aminoácidos; todavia, o *score* menos favorável desta molécula concebida por bioisosterismo pode ser explicado pela ocorrência de uma interação desfavorável com o resíduo Thr292, conforme disposto na tabela 8. O ligante-controle com melhor *score*, igual a -9,3 kcal/mol, foi o tautômero 2 do ensitrelvir, o qual curiosamente interagiu com 5 dos 7 principais resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 2; foram eles, Gln110, Val202, Ile249, Thr292 e Phe294; e com 1 resíduo de aminoácido do sítio alostérico 1, a Val297. As Figuras 22 e 23 ilustram os resultados em 3D do derivado DB12805_BI_004 na perspectiva das ligações de H clássicas estabelecidas, assim como deste derivado e do tautômero 2 do ensitrelvir no viés da complementaridade molecular, com o intuito de ilustrar a proximidade dos oxigênios das carbonilas do ligante DB12805_BI_005 dos hidrogênios amídicos dos resíduos Gln110 e Phe294; para fins de maior clareza, no zoom destas imagens, houve diferenciação de coloração das superfícies eletrostáticas dos átomos dos resíduos de aminoácidos que integram a enzima M^{Pto} (carbono – cinza; enxofre – amarelo; hidrogênio – branco; nitrogênio – azul; oxigênio – vermelho).

Figura 22 – Ligações de H clássicas com suas respectivas distâncias entre o derivado DB12805_BI_004 e resíduos de aminoácidos do sítio alostérico 2 da M^{pro}



Fonte: do autor.

Figura 23 – Comparação entre a ancoragem do ligante DB12805_BI_004 e as ancoragens dos tautômeros do ensitrelvir no sítio alostérico 2 da M^{pro}



Fonte: do autor.

Legenda: A) Ligante DB12805_BI_004 ancorado no sítio alostérico 2 da enzima M^{pro}; seus átomos de carbono foram coloridos em marrom;

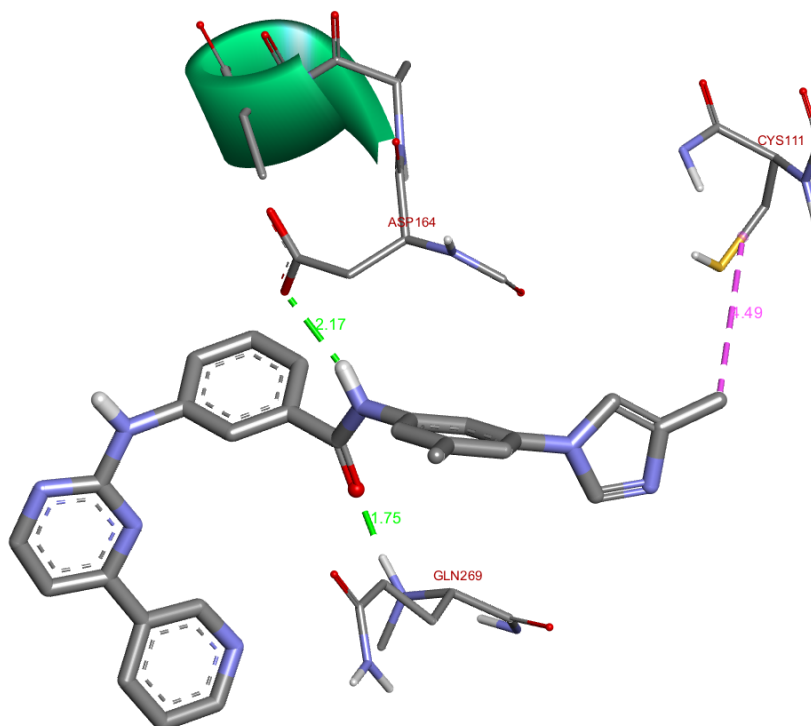
B) Zoom de A);

C) Zoom do tautômero 2 do ligante-controlado ensitrelvir ancorado no sítio alostérico 2 da enzima M^{pro}; seus átomos de carbono foram coloridos em rosa salmão.

Em 2022, Shen e colaboradores reportaram que moléculas com atividade promissora contra a enzima PL^{pro} estabeleceram ligações de H clássicas com os resíduos Gln49, Arg72, Asp164, Arg166, Glu167 e Gln269. Além destes, os resíduos Leu162, Pro248, Gly266, Asn267, Tyr268 e Pro 299 encontram-se nas proximidades, sendo, por esse motivo, igualmente susceptíveis a interações.¹⁰⁴ Com base nos resultados da tabela 9, é factível afirmar que, com exceção do derivado DB08882_BI_001, todos os demais ligantes concebidos pela estratégia de bioisosterismo interagiram com pelo menos 1 dos resíduos de aminoácidos supracitados mediante ligações de H clássicas. Ademais, outros tipos de interações intermoleculares distintas de menor força tanto polares quanto apolares aconteceram entre pelo menos um destes aminoácidos importantes e todos os ligantes-controle, precursores e derivados que se encontram na tabela 9.

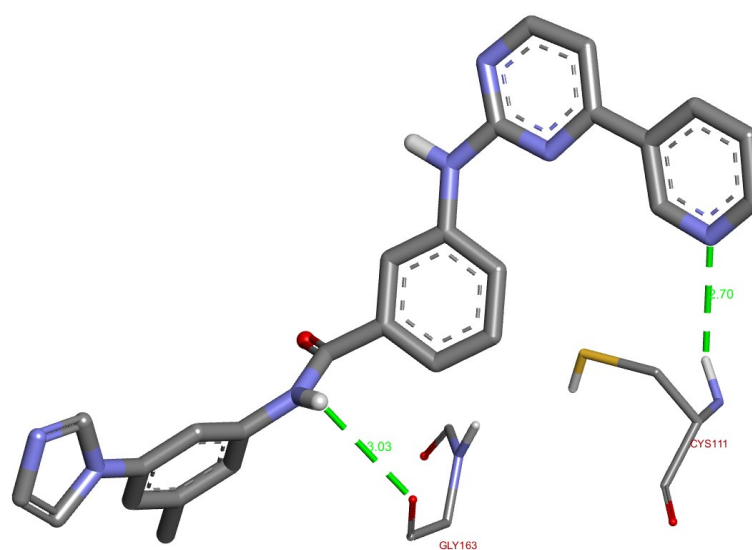
No tocante à tríade catalítica da enzima PL^{pro}, apenas o ligante-controle XR8-83 interagiu com os resíduos Cys111 e Hie272 por meio de interações hidrofóbicas de van der Waals. Entretanto, após uma análise mais minuciosa dos resultados, foi evidenciado que a segunda conformação (pose) mais estável do derivado DB04868_BI_002, cujos valores de *score* e K_i são, respectivamente, -10 Kcal/mol e 46,7 nM (versus -10,2 Kcal/mol e 33,3 nM da primeira pose), estabeleceu uma interação apolar do tipo Alquila com o resíduo Cys111. De igual maneira, a terceira pose mais estável do derivado DB04868_BI_003, cujos valores de *score* e K_i são, respectivamente, -9,1 Kcal/mol e 213,3 nM (versus -9,6 Kcal/mol e 91,7 nM da primeira pose), interagiu com o resíduo Cys111 por meio de uma ligação de H clássica e com o resíduo Hie272 mediante interações hidrofóbicas do tipo van der Waals. As Figuras 24 a 29 seguir ilustram os resultados em 3D da pose 2 do derivado DB04868_BI_002 e da pose 3 do derivado DB04868_BI_003 na perspectiva das ligações de H clássicas estabelecidas, assim como destes derivados, de suas primeiras poses e do ligante-controle XR8-83 no viés da complementaridade molecular, com o objetivo de ilustrar o acesso ao resíduo Cys111, o qual contém um átomo de enxofre; para fins de maior clareza, no zoom das Figuras 27 e 29 houve diferenciação de coloração das superfícies eletrostáticas dos átomos dos resíduos de aminoácidos que constituem a enzima PL^{pro} (carbono – cinza; enxofre – amarelo; hidrogênio – branco; nitrogênio – azul; oxigênio – vermelho).

Figura 24 – Ligações de H clássicas e interação apolar do tipo Alquila com suas respectivas distâncias entre a segunda conformação (pose) mais estável do ligante DB04868_BI_002 e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da PL^{pro}



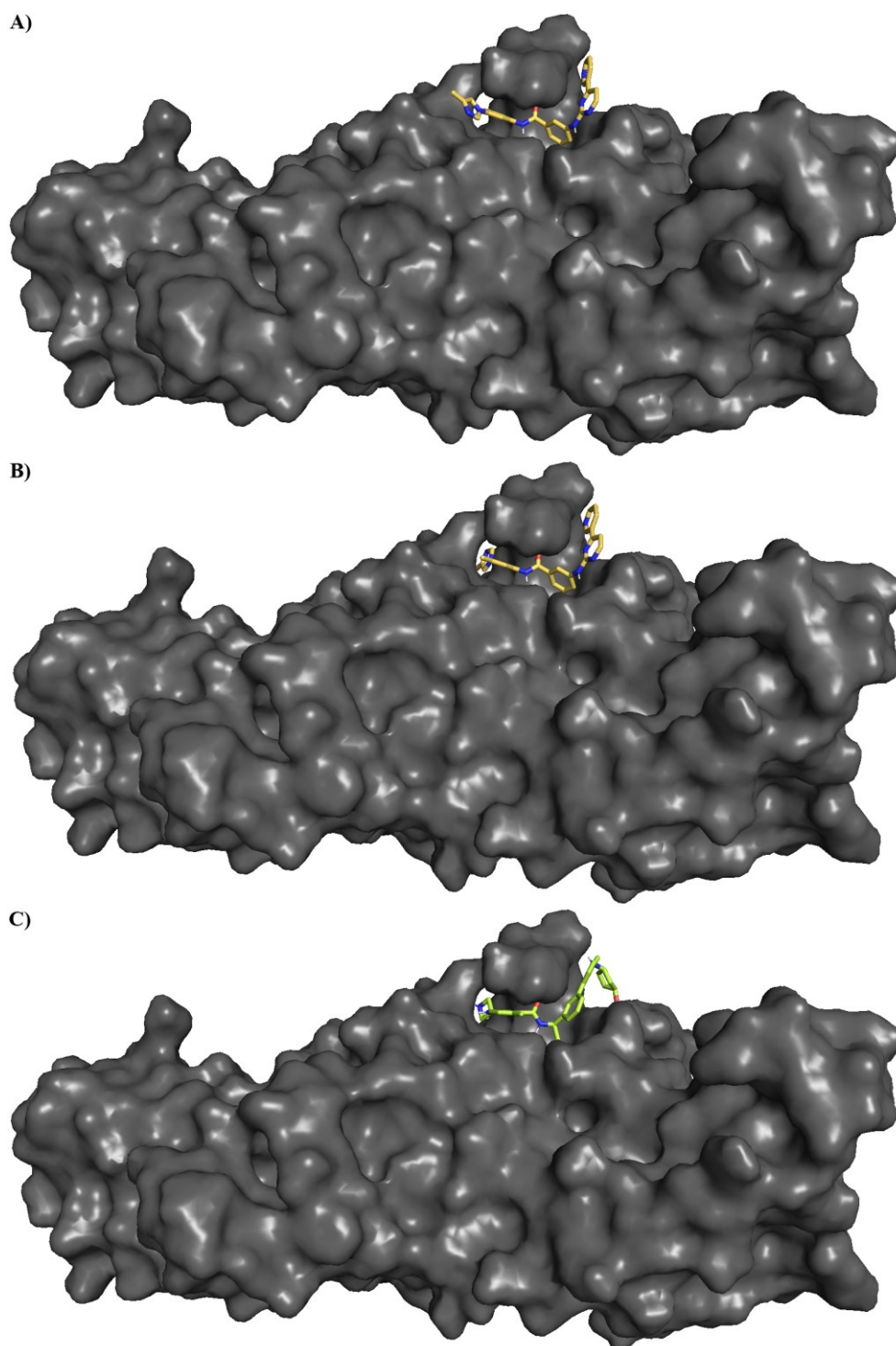
Fonte: do autor.

Figura 25 – Ligações de H clássicas com suas respectivas distâncias entre a terceira conformação (pose) mais estável do ligante DB04868_BI_003 e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da PL^{pro}



Fonte: do autor.

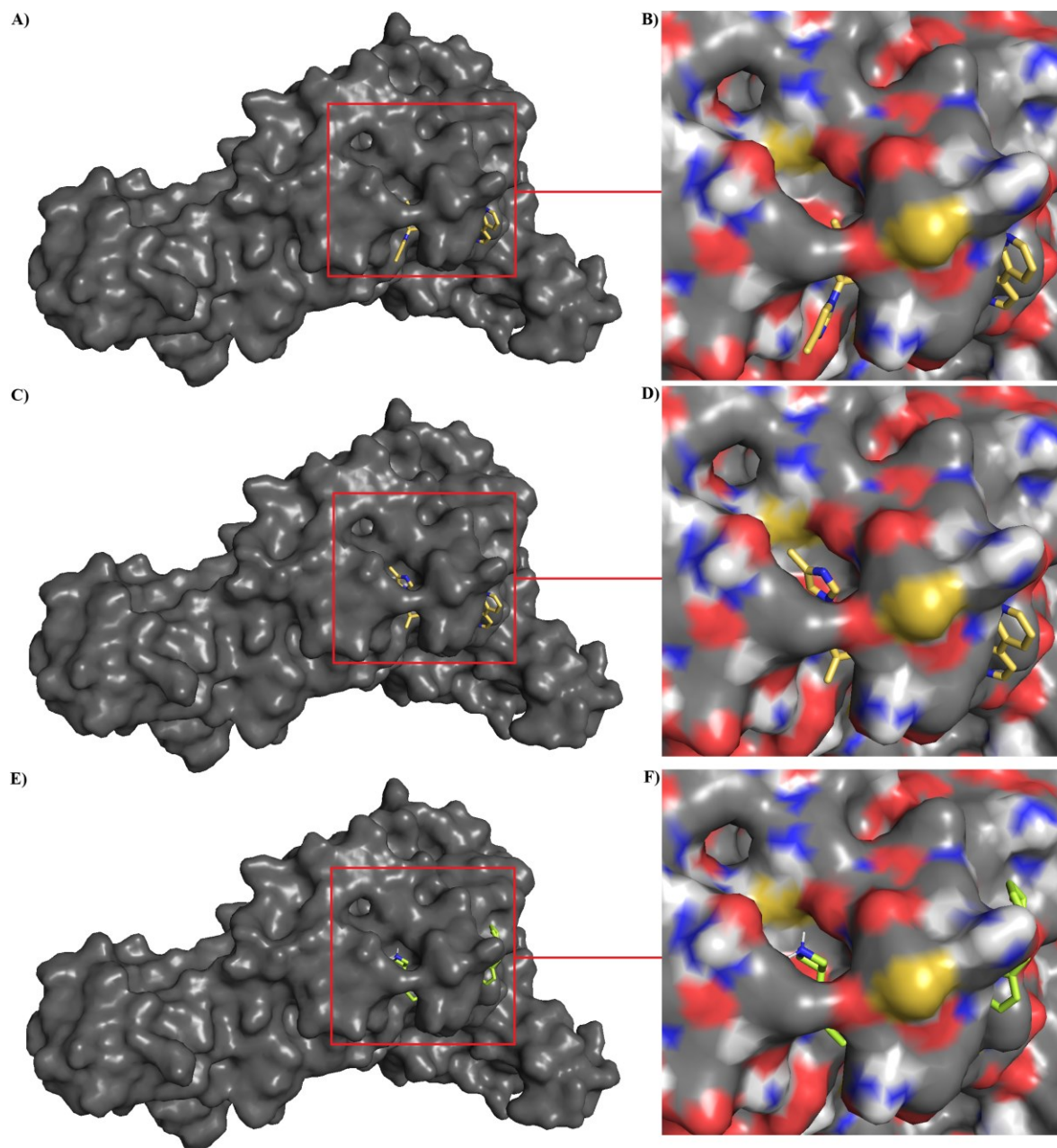
Figura 26 – Comparação entre as ancoragens das poses 1 e 2 do ligante DB04868_BI_002 e a ancoragem do ligante-controle XR8-83 no sítio ativo da PL^{pro}



Fonte: do autor.

Legenda: A) Pose 1 do ligante DB04868_BI_002 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro}; seus átomos de carbono foram coloridos em amarelo claro;
B) Pose 2 do ligante DB04868_BI_002 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro}; seus átomos de carbono foram igualmente coloridos em amarelo claro;
C) Ligante-controle XR8-83 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro}; seus átomos de carbono foram coloridos em um tom diferente de verde claro.

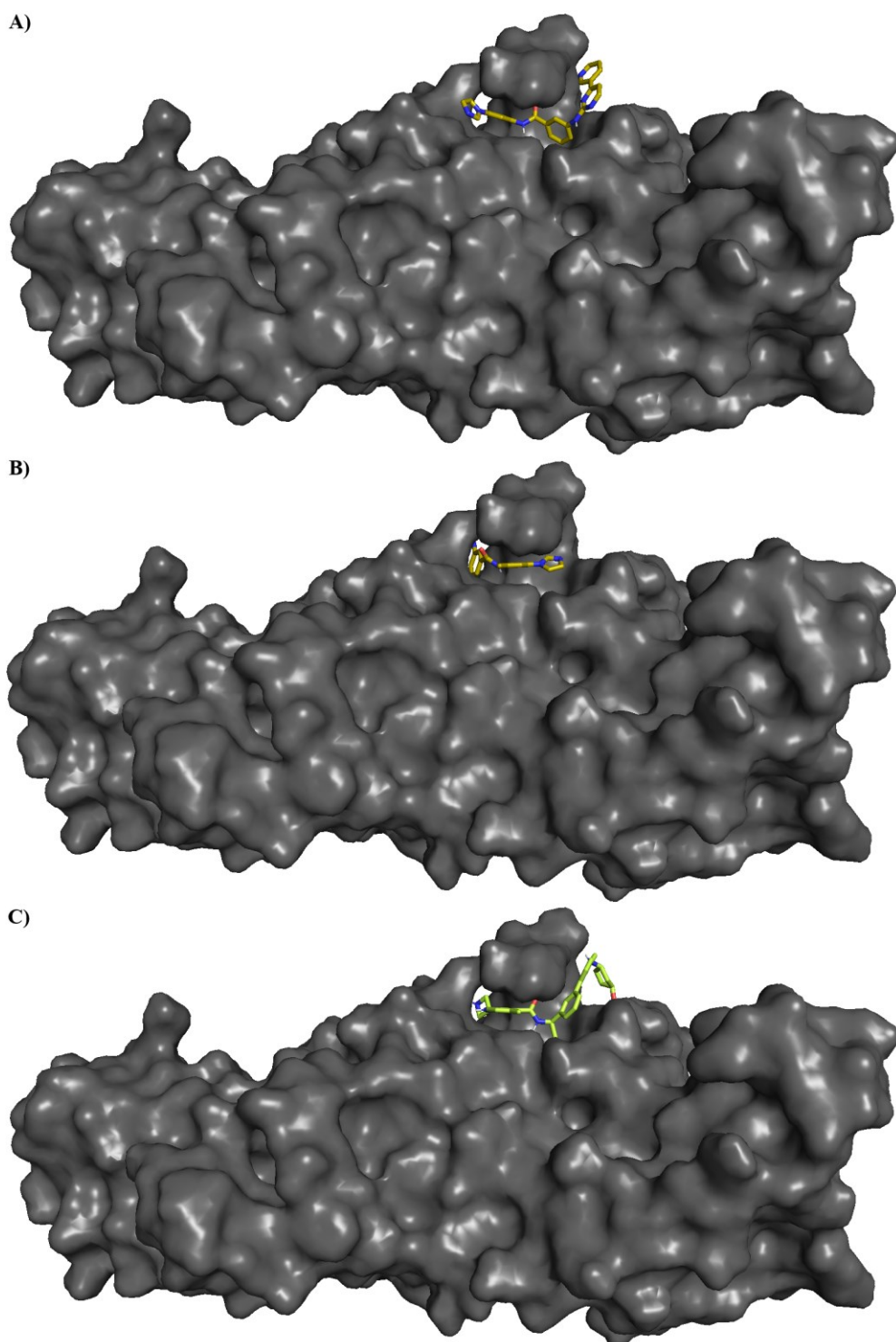
Figura 27 – Comparação entre as ancoragens das poses 1 e 2 do ligante DB04868_BI_002 e a ancoragem do ligante-controle XR8-83 no sítio ativo da PL^{pro} sob um diferente ângulo de visão



Fonte: do autor.

Legenda: A) Pose 1 do ligante DB04868_BI_002 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro} sob um diferente ângulo de visão; seus átomos de carbono foram coloridos em amarelo claro;
 B) Zoom de A);
 C) Pose 2 do ligante DB04868_BI_002 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro} sob um diferente ângulo de visão; seus átomos de carbono foram igualmente coloridos em amarelo claro;
 D) Zoom de C); o acesso ao resíduo Cys111 é evidenciado pela proximidade do ligante com o átomo de enxofre, cuja superfície eletrostática foi colorida em amarelo;
 E) Ligante-controle XR8-83 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro} sob um diferente ângulo de visão; seus átomos de carbono foram coloridos em um tom diferente de verde claro;
 F) Zoom de E); o acesso ao resíduo Cys111 é evidenciado pela proximidade do ligante com o átomo de enxofre, cuja superfície eletrostática foi colorida em amarelo.

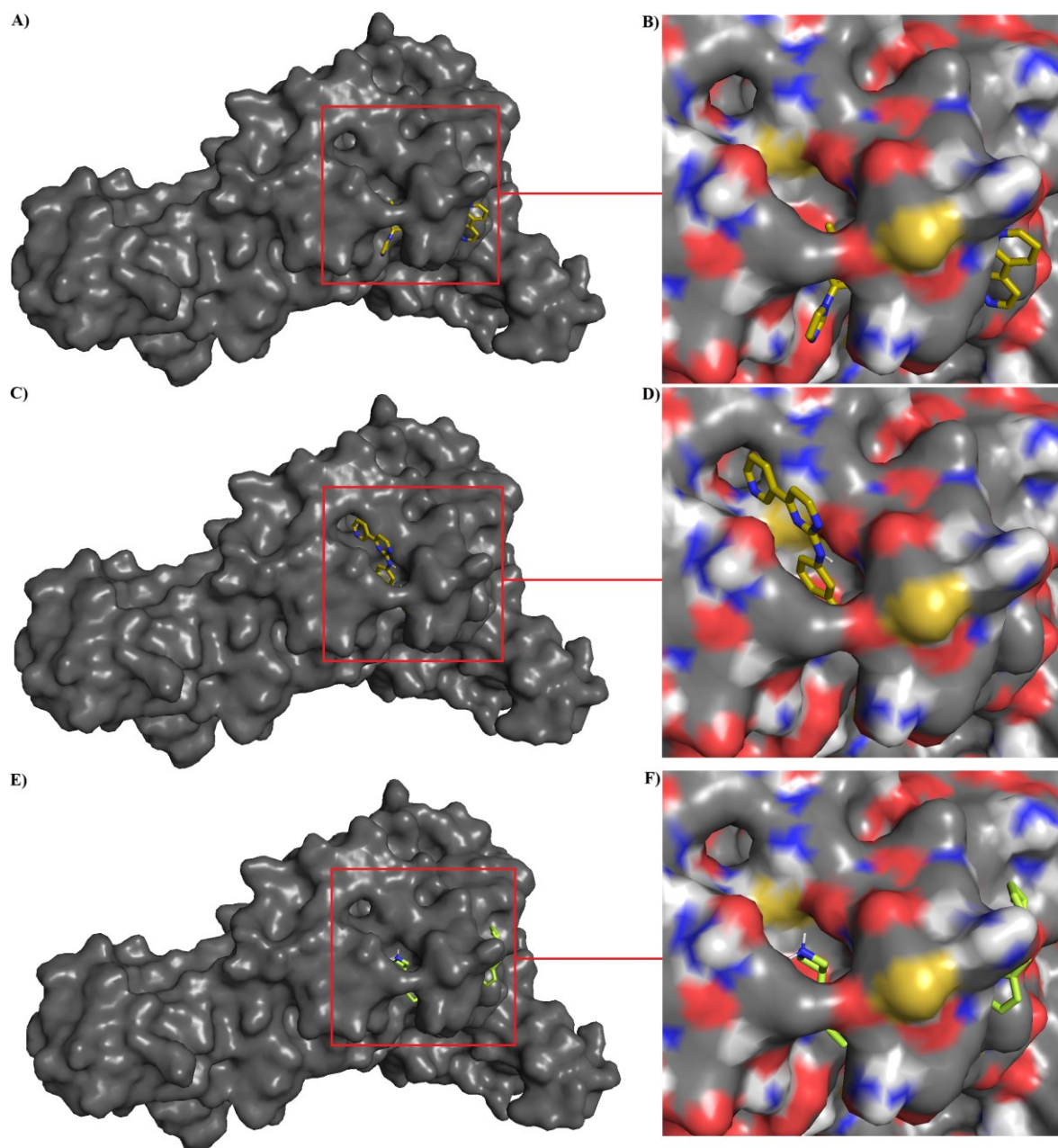
Figura 28 – Comparação entre as ancoragens das poses 1 e 3 do ligante DB04868_BI_003 e a ancoragem do ligante-controle XR8-83 no sítio ativo da PL^{pro}



Fonte: do autor.

Legenda: A) Pose 1 do ligante DB04868_BI_003 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro}; seus átomos de carbono foram coloridos em amarelo-mostrada escuro;
B) Pose 3 do ligante DB04868_BI_003 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro}; seus átomos de carbono foram igualmente coloridos em amarelo-mostrada escuro;
C) Ligante-controle XR8-83 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro}; seus átomos de carbono foram coloridos em um tom diferente de verde claro.

Figura 29 – Comparação entre as ancoragens das poses 1 e 3 do ligante DB04868_BI_003 e a ancoragem do ligante-controle XR8-83 no sítio ativo da PL^{pro} sob um diferente ângulo de visão

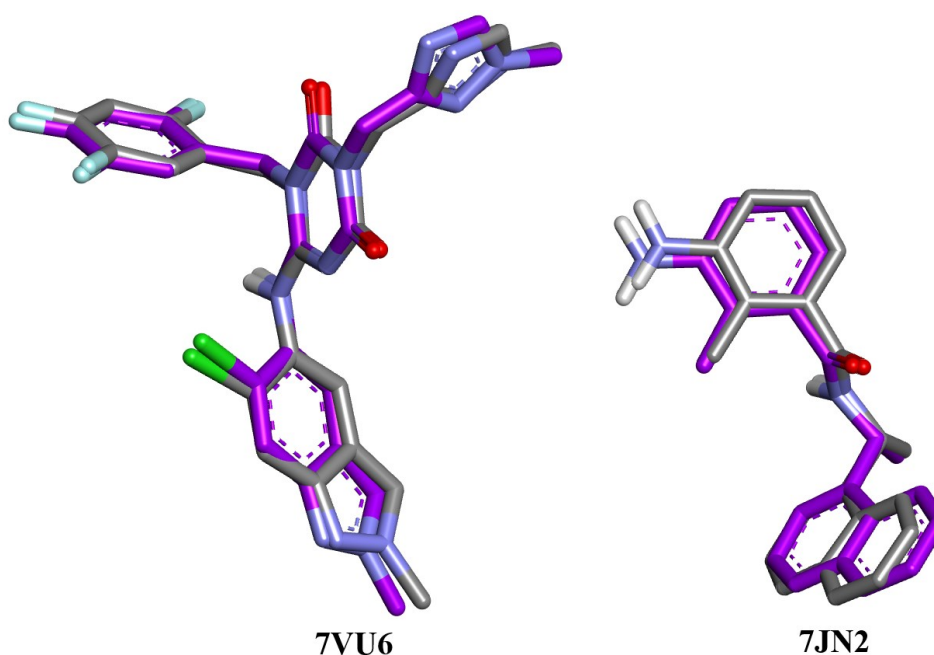


Fonte: do autor.

- Legenda: A) Pose 1 do ligante DB04868_BI_003 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro} sob um diferente ângulo de visão; seus átomos de carbono foram coloridos em amarelo-mostrada escuro;
 B) Zoom de A);
 C) Pose 3 do ligante DB04868_BI_003 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro} sob um diferente ângulo de visão; seus átomos de carbono foram igualmente coloridos em amarelo-mostrada escuro;
 D) Zoom de C); o acesso ao resíduo Cys111 é evidenciado pela proximidade do ligante com o átomo de enxofre, cuja superfície eletrostática foi colorida em amarelo;
 E) Ligante-controle XR8-83 ancorado no sítio ativo da enzima PL^{pro} sob um diferente ângulo de visão; seus átomos de carbono foram coloridos em um tom diferente de verde claro;
 F) Zoom de E); o acesso ao resíduo Cys111 é evidenciado pela proximidade do ligante com o átomo de enxofre, cuja superfície eletrostática foi colorida em amarelo.

Com a finalidade de validar o protocolo dos estudos de ancoragem molecular, o *redocking* foi conduzido com ambas as proteínas utilizadas. Os resultados de RMSD obtidos foram de 0,3501 Å e de 0,4984 Å para os ligantes cristalizados juntamente com as estruturas proteicas de códigos 7VU6 e 7JN2, respectivamente. A Figura 30 evidencia as sobreposições das estruturas originais, obtidas experimentalmente por cristalografia de raios X, e, *in silico*, por reancoragem.

Figura 30 – *Redocking* dos ligantes originais (cristalográficos) das proteínas 7VU6 e 7JN2



Fonte: do autor.

A seguir, na etapa final dos estudos, quatro adicionais propriedades físico-químicas, assim como parâmetros farmacocinéticos (de ADMET), foram preditos para os ligantes-controle, para os derivados por bioisosterismo mais promissores elencados nas tabelas 6 a 9 e para os seus respectivos precursores. Ademais, o fármaco nirmatrelvir foi concomitantemente avaliado para que se traçasse um comparativo dos resultados obtidos *in silico* com aqueles apresentados na bula do medicamento Paxlovid®.

As propriedades físico-químicas avaliadas foram massa molecular; volume molecular proveniente da equação de van der Waals; TPSA, em consonância com a regra de Veber; e Log D em função do pH 7,4.¹³¹ Este último indicador representa o Log P cujo coeficiente de partição é função do pH igual a 7,4. Ele é de vital importância, pois, para conseguir exercer o efeito terapêutico desejado, um fármaco de administração oral deve ser capaz de entrar na corrente

sanguínea e, subsequentemente, atingir o sítio de interesse no órgão-alvo. Neste contexto, devido ao equilíbrio adequado entre a taxa de permeabilidade por difusão passiva e a hidrossolubilidade, a faixa de 1,0 a 3,0 é considerada ótima para que um composto químico se difunda até o órgão-alvo após ser absorvido pelos enterócitos, i.e., as células intestinais.⁸² A tabela 10 lista os resultados obtidos para as 4 propriedades físico-químicas supracitadas. Os resultados de substâncias químicas que apresentaram massa molecular acima de 500 Da, mas abaixo de 600 Da, bem como os resultados de Log D cujas aproximações estão mais próximas de 3 do que de 3,5, foram sublinhados e coloridos em amarelo ouro. Por outro lado, valores de log D próximos de 3,5 e acima deste valor, assim como valores de TPSA < 75 e > 140 foram sublinhados e coloridos em vermelho. Todas as melhorias de resultados obtidas com os derivados por bioisosterismo foram sublinhados e coloridos em negrito verde. As estruturas químicas 2D destes compostos químicos assim como dos derivados por bioisosterismo que não apresentaram nenhum alerta foram adicionadas à tabela 10.

Tabela 10 – Predições de propriedades físico-químicas dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continua)

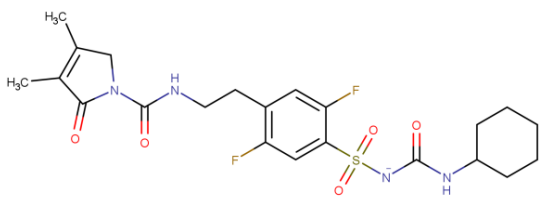
Ligante	Massa molecular	Volume molecular	TPSA	Log D (pH 7,4)
Ensitrelvir	<u>531,11</u>	464,61	120,68	2,81
Baicalein	270,05	265,19	90,90	2,25
Pelitinib	467,15	460,20	93,51	<u>3,40</u>
AT-7519	381,08	344,15	98,91	1,97
XR8-83	<u>504,26</u>	523,71	85,42	<u>3,21</u>
Jun9-13-7	309,07	302,57	<u>23,47</u>	<u>3,76</u>
Nirmatrelvir	499,24	473,22	131,40	2,65
DB00222	490,22	485,98	129,53	2,04
DB00222_BI_004	497,17	462,21	126,75	1,67
				
DB00222_BI_005	462,21	450,89	112,46	<u>3,63</u>
DB00549	<u>575,21</u>	574,55	115,73	2,37
DB00549_BI_005	<u>530,20</u>	533,38	120,16	2,10
DB04868	<u>529,18</u>	514,49	100,85	<u>3,88</u>

Tabela 10 – Predições de propriedades físico-químicas dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continuação)

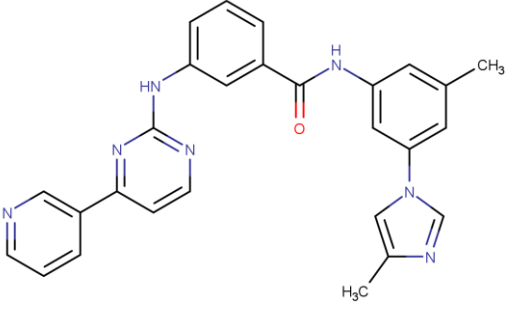
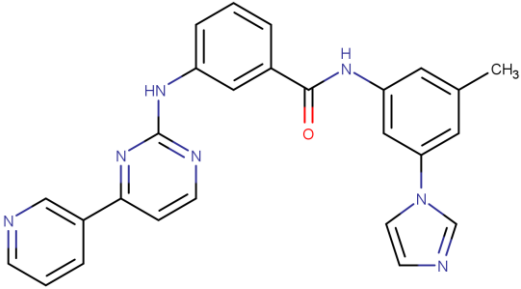
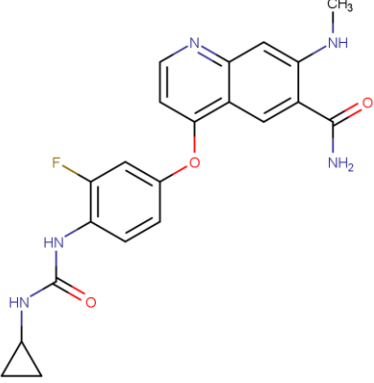
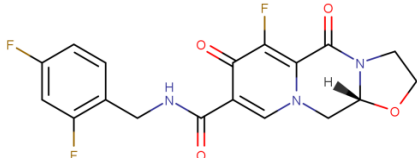
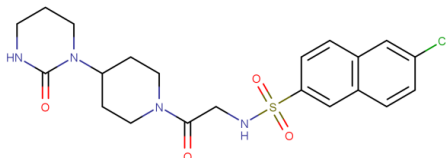
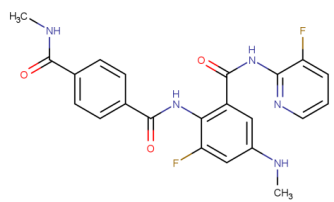
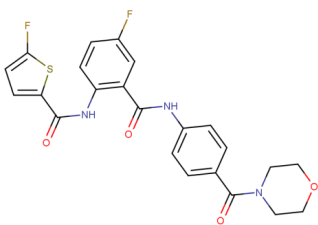
Ligante	Massa molecular	Volume molecular	TPSA	Log D (pH 7,4)
DB04868_BI_002	<u>461,20</u>	478,99	97,62	<u>3,49</u>
				
DB04868_BI_003	<u>447,18</u>	461,69	100,85	<u>3,25</u>
				
DB08882	472,23	474,73	116,86	2,18
DB08882_BI_001	457,22	463,73	90,84	<u>3,70</u>
DB09078	426,11	405,54	115,57	2,87
DB09078_BI_002	409,16	398,60	118,37	2,59
				
DB09079	<u>539,25</u>	557,82	101,47	3,04
DB09079_BI_002	<u>524,25</u>	542,73	118,26	1,61
DB11751	405,11	370,94	100,87	1,22

Tabela 10 – Predições de propriedades físico-químicas dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(conclusão)				
Ligante	Massa molecular	Volume molecular	TPSA	Log D (pH 7,4)
DB11751_BI_002	393,09	350,92	80,64	1,26
				
DB11984	479,13	447,05	107,02	1,41
DB11984_BI_002	464,13	431,96	98,82	2,08
				
DB12355	498,24	516,70	115,79	2,87
DB12355_BI_004	457,19	458,51	147,52	1,54
DB12364	451,14	445,62	110,64	2,52
DB12364_BI_006	439,15	425,25	115,45	1,96
				
DB12805	574,98	485,50	121,88	1,72
DB12805_BI_004	471,11	441,93	87,74	2,85
				
DB16650	425,20	408,23	139,18	1,41
DB16650_BI_003	457,18	422,57	141,98	2,35

Fonte: do autor.

Nota: A massa molecular evidenciada é a monoisotópica, isto é, a calculada a partir da massa do isótopo de ocorrência natural mais abundante de cada elemento químico presente na molécula; os valores de TPSA (área de superfície polar topológica) destacados em vermelho representam compostos que violam a regra da Pfizer no contexto de química medicinal, uma vez que estas substâncias químicas possuem tanto TPSA < 75 quanto log P < 3¹³¹; as unidades utilizadas foram g/mol para massa molecular, Å³ para volume molecular e Å² para TPSA.

Os valores das massas moleculares dos derivados DB04868_BI_002, DB04868_BI_003 e DB12805_BI_004 estão favoravelmente abaixo de 500 Da, ao contrário das massas de seus respectivos precursores. Além disso, os derivados DB00222_BI_004, DB09078_BI_002, DB11751_BI_002, DB11984_BI_002 e DB12364_BI_006 exibiram ótimos resultados em todas as propriedades avaliadas.

Os parâmetros de absorção (A) escolhidos para serem avaliados foram: potencial de o ligante inibir e/ou de se comportar como substrato de glicoproteína-P (P-gp); probabilidade de apresentar biodisponibilidade oral ($F < 20\%$ e/ou $< 30\%$); e triagem de permeabilidade por difusão passiva baseada no modelo *in vitro* de cultura de linhagens celulares do epitélio renal de cães “*Madin-Darby*” (MDCK).¹³¹ A P-gp foi a primeira proteína humana da classe dos transportadores de cassetes de ligação de ATP (ABC) identificada por pesquisadores. Isto significa que esta proteína do tipo transmembrana pertence à superfamília de proteínas transportadoras que utilizam a energia advinda da hidrólise do ATP para bombear de volta/expelir para o lúmen do trato gastrointestinal substâncias químicas hidrofóbicas neutras e catiônicas, incluindo fármacos, que foram previamente absorvidas pelo epitélio do intestino. Esta proteína do tipo ABC é expressa em tecidos que apresentam uma função de barreira, e.g. epitélios do fígado, do rim, do intestino delgado, do intestino grosso e das células endoteliais do ovário, dos testículos e do cérebro na barreira hematoencefálica (BHE/BBB).¹³² A principal consequência negativa da atuação da P-gp é diminuir a biodisponibilidade oral dos fármacos, i.e., a quantidade ou fração percentual de uma substância química administrada por via oral que atinge efetivamente a circulação sistêmica, após possíveis metabolizações prévias, seja na parede intestinal, seja no fígado por metabolismo de primeira passagem.^{82,132,133} Os valores preditos pela plataforma ADMETlab 2.0 tanto de P-gp quanto de $F (< 20\%/< 30\%)$ são de probabilidade, e, portanto, variam de 0 a 1.¹³¹ A metodologia considerada padrão-ouro para triagem da permeabilidade por difusão passiva de um fármaco tem como base o modelo *in vitro* de cultura de células Caco-2, as quais são derivadas de unidades celulares de adenocarcinoma do intestino grosso humano mediante um processo de diferenciação que origina células epiteliais altamente funcionalizadas e bastante similares tanto morfológica quanto bioquimicamente ao epitélio celular do intestino delgado.^{134,135} Entretanto, para a predição de permeabilidade pela técnica Caco-2, os resultados fornecidos pela plataforma ADMETlab 2.0 estão em escala logarítmica e não sofrem estratificação. Por outro lado, para a predição pelo modelo de células MDCK, os resultados são apresentados pela plataforma ADMETlab 2.0 em cm/s e representam o coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}), considerado a métrica padrão-ouro para avaliação da eficiência de absorção *in vitro* de compostos químicos. Ademais,

os valores são classificados de acordo com as seguintes categorias: 1) baixa permeabilidade por difusão passiva – $P_{app} < 2 \times 10^{-6}$ cm/s; 2) permeabilidade mediana por difusão passiva – P_{app} entre 2 e 20×10^{-6} cm/s; 3) elevada permeabilidade por difusão passiva – $P_{app} > 20 \times 10^{-6}$ cm/s).¹³¹ Por esse motivo, optou-se pela predição de permeabilidade segundo o modelo MDCK. A tabela 11 elenca os resultados encontrados para os 3 parâmetros de absorção supracitados. É importante mencionar que nesta tabela, bem como nas tabelas que ainda serão apresentadas, os valores de probabilidade na faixa de 0,26 a 0,67 foram identificados pela sigla “Indet.”, que significa indeterminado, haja vista o alerta de confiabilidade dos resultados encontrados neste intervalo de valores, conforme apontado pelos pesquisadores que desenvolveram a plataforma ADMETlab 2.0.¹⁰⁸ Os resultados de substâncias químicas que apresentaram uma alta probabilidade de ser inibidores e/ou substratos de P-gp, assim como de terem valores de $F < 20\%$ e/ou $< 30\%$, foram sublinhados e coloridos em vermelho. De igual maneira, resultados medianos de permeabilidade pela técnica MDCK foram sublinhados e coloridos em amarelo ouro. Todas as melhorias de resultados obtidas com os derivados por bioisosterismo foram sublinhados e coloridos em negrito verde, e as estruturas químicas 2D de suas substâncias químicas foram adicionadas à tabela 11.

Tabela 11 – Predições de parâmetros de Absorção dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continua)

Ligante	P-gp (inib.)	P-gp (subst.)	F ($< 20\%/30\%$)	MDCK perm.
Ensitrelvir	0,01	0,04	0,01/0,01	elevada
Baicalein	0,07	0,16	<u>0,99/1,00</u>	elevada
Pelitininib	Indet.	0,04	0,00/0,00	elevada
AT-7519	0,00	<u>1,00</u>	0,00/ <u>0,88</u>	<u>mediana</u>
XR8-83	<u>0,91</u>	<u>1,00</u>	<u>0,99/1,00</u>	<u>mediana</u>
Jun9-13-7	0,15	0,01	0,01/ <u>0,89</u>	elevada
Nirmatrelvir	<u>0,99</u>	0,04	<u>0,97/0,82</u>	elevada
DB00222	0,08	<u>0,99</u>	0,00/0,00	<u>mediana</u>
DB00222_BI_004	0,24	Indet.	0,10/0,04	<u>elevada</u>

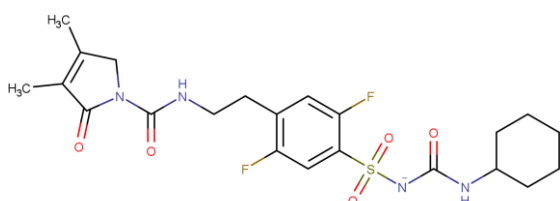


Tabela 11 – Predições de parâmetros de Absorção dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continuação)

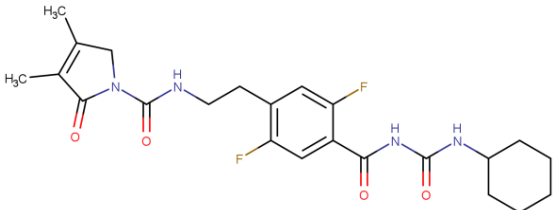
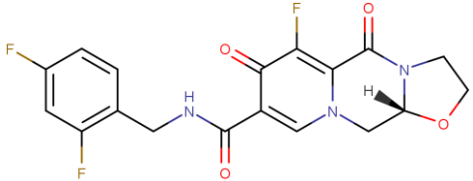
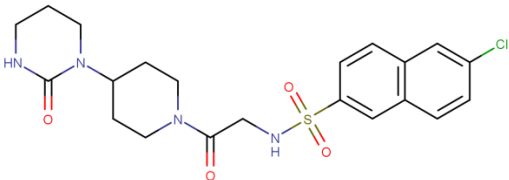
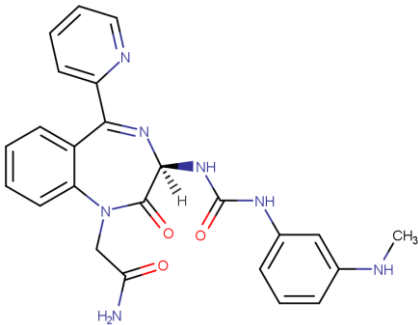
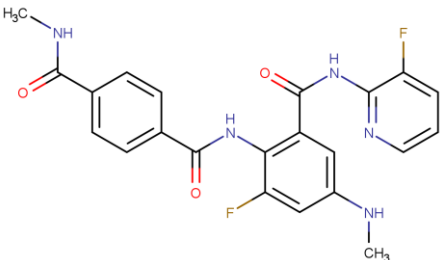
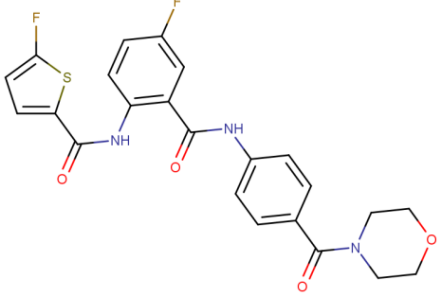
Ligante	P-gp (inib.)	P-gp (subst.)	F (< 20%/30%)	MDCK perm.
DB00222_BI_005	0,01	<u>1,00</u>	0,00/0,00	<u>elevada</u>
				
DB00549	<u>1,00</u>	<u>0,92</u>	0,00/Indet.	elevada
DB00549_BI_005	<u>1,00</u>	<u>0,98</u>	0,00/ <u>0,87</u>	elevada
DB04868	<u>1,00</u>	<u>0,96</u>	0,00/0,00	elevada
DB04868_BI_002	<u>0,99</u>	<u>0,98</u>	0,01/0,00	elevada
DB04868_BI_003	<u>0,92</u>	<u>0,95</u>	0,09/0,00	elevada
DB08882	0,10	<u>0,99</u>	<u>0,95</u> /0,01	elevada
DB08882_BI_001	Indet.	0,01	<u>0,97</u> / <u>0,86</u>	elevada
DB09078	0,01	<u>1,00</u>	0,00/ <u>0,86</u>	elevada
DB09078_BI_002	0,01	<u>0,99</u>	0,00/0,06	elevada
DB09079	<u>1,00</u>	0,08	0,17/0,12	elevada
DB09079_BI_002	<u>0,86</u>	<u>0,99</u>	<u>0,98</u> / <u>0,97</u>	elevada
DB11751	0,01	0,14	0,04/0,03	<u>mediana</u>
DB11751_BI_002	0,00	0,00	0,09/0,01	<u>elevada</u>
				
DB11984	0,02	<u>0,99</u>	0,01/ <u>0,97</u>	<u>mediana</u>
DB11984_BI_002	0,13	<u>0,99</u>	0,01/ <u>Indet.</u>	<u>elevada</u>
				
DB12355	<u>1,00</u>	<u>0,88</u>	0,00/0,00	elevada

Tabela 11 – Predições de parâmetros de Absorção dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(conclusão)				
Ligante	P-gp (inib.)	P-gp (subst.)	F (< 20%/30%)	MDCK perm.
DB12355_BI_004	<u>0,15</u>	<u>0,01</u>	0,00/Indet.	<u>mediana</u>
				
DB12364	0,05	<u>0,99</u>	0,00/0,00	<u>mediana</u>
DB12364_BI_006	0,09	<u>Indet.</u>	0,00/0,04	<u>mediana</u>
				
DB12805	0,02	0,00	0,01/ <u>0,73</u>	elevada
DB12805_BI_004	0,28	0,01	0,11/ <u>0,01</u>	elevada
				
DB16650	0,00	<u>1,00</u>	0,00/0,01	<u>mediana</u>
DB16650_BI_003	0,00	<u>0,96</u>	0,00/0,00	<u>mediana</u>

Fonte: do autor.

Legenda: P-gp – glicoproteína-P; inib. – abreviação para inibição; subst. – abreviação para substrato; F – biodisponibilidade; MDCK – modelo *in vitro* de cultura de linhagens celulares do epitélio renal de cães “Madin-Darby”; Indet. – Indeterminado, pois o valor obtido encontra-se na faixa probabilística de 0,26 a 0,67, e todos os valores decimais representam a probabilidade de que o evento seja factível, variando de 0 a 1.

A permeabilidade à MP por difusão passiva foi aumentada nos derivados DB00222_BI_004, DB00222_BI_005, DB11751_BI_002 e DB11984_BI_002 quando comparada à previsão para os seus respectivos ligantes precursores. Ademais, o potencial de inibir e de ser substrato de P-gp foi favoravelmente diminuído no derivado DB12355_BI_004, o que pode ser igualmente o caso do composto DB12364_BI_006 no quesito substrato. O precursor deste derivado (DB12364) representa a betrixabana, um anticoagulante profilático que é conhecidamente substrato de P-gp, conforme descrito na bula do medicamento que o contém.¹³⁶ Por fim, o derivado DB12805_BI_004, diferentemente do seu precursor, não possui uma elevada probabilidade de ter uma biodisponibilidade inferior a 30%, o que igualmente pode ser o caso do composto DB11984_BI_002.

Os parâmetros de distribuição (D) eleitos para serem analisados foram: percentual de ligação às proteínas plasmáticas (“*plasma protein binding*” – PPB); tendência de atravessar a BHE; volume de distribuição (VD); e fração livre do fármaco no plasma (F_u). As proteínas plasmáticas são representadas principalmente por albuminas, que carregam fármacos ácidos, por glicoproteínas, especialmente do tipo ácida α_1 , responsável por se ligar a fármacos básicos, e, em frações bem menores ou em casos de moléculas específicas, por globulinas.^{133,137,138} A extensão de PPB tem influência direta na biodisponibilidade oral de um composto químico, pois a concentração do fármaco que se encontra livre para chegar ao órgão-alvo é diretamente afetada pela quantidade percentual dele que se liga às proteínas plasmáticas. A albumina é a proteína plasmática mais abundante, e muitos fármacos ligam-se a ela com baixa afinidade, mediante interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas.¹³⁷ Valores de PPB < 90% são considerados ótimos, enquanto resultados $\geq 90\%$ são interpretados como não adequados, visto que implicarão em baixos índices terapêuticos, isto é, em doses efetivas/terapêuticas (representadas por valores de ED_{50}), muito próximas de doses tóxicas/letais (representadas por valores de LD_{50}). Para fármacos cujos alvos terapêuticos sejam periféricos, deseja-se uma pequena ou nenhuma permeabilidade pela BHE, a fim de evitar efeitos adversos em nível de sistema nervoso central (SNC). Os valores preditos pela plataforma ADMETlab 2.0 são de probabilidade, e, portanto, variam de 0 a 1.¹³¹ Apesar de a absorção de um fármaco ser um pré-requisito para que níveis plasmáticos sejam atingidos, esta substância química precisa ainda alcançar o órgão-alvo em concentrações terapêuticas para que o efeito desejado sobre o processo patológico seja exercido.¹³⁷ Neste âmbito, o VD é um conceito teórico que relaciona a dose administrada/quantidade de um fármaco presente no organismo à concentração dele no sangue ou no plasma.¹³⁸ Este volume, no entanto, não se refere obrigatoriamente a um volume determinável em compartimentos fisiológicos, mas ao volume de líquido necessário para conter

a quantidade total de um fármaco presente no organismo na mesma concentração que foi dosada no plasma ou no sangue no estado de equilíbrio.^{133,137,138} Sendo assim, o VD é um volume imaginário extrapolado que reflete a extensão da presença de um fármaco em tecidos extravasculares.^{137,138} Como consequência, o VD “é relativamente baixo para fármacos que são principalmente retidos no compartimento intravascular e relativamente alto para aqueles que sofrem ampla distribuição” em outros compartimentos não-vasculares. Neste último caso de distribuição acentuadamente alta, o valor de VD de um fármaco é frequentemente muito maior do que o volume total de água presente no corpo humano, refletindo, por conseguinte, as baixas concentrações dele no sangue/plasma. Por outro lado, fármacos altamente ligados a proteínas plasmáticas tendem a permanecer no compartimento intravascular e, portanto, expressam valores baixos de VD.¹³⁷ Os valores preditos pela plataforma ADMETlab 2.0 encontram-se na escala de L/Kg e são considerados ótimos na faixa de 0,04 a 20 L/Kg ou ruins quando < 0,04 L/Kg ou > 20 L/Kg. Por fim, o parâmetro Fu é estratificado em três categorias, que versam sobre o percentual predito de fármaco não ligado a proteínas plasmáticas; são elas: 1) elevada (Fu > 20%); 2) mediana (Fu entre 5 e 20%); 3) baixa (Fu < 5%).¹³¹ Neste sentido, é cabível mencionar que muito fármacos se encontram em concentrações terapêuticas no plasma principalmente ligados a proteínas plasmáticas, de modo que a fração livre deles, não raro, é menor do que 1%.¹³³ A tabela 12 elucida os resultados dos 3 parâmetros de distribuição supracitados. Os ligantes-controle que apresentaram valores preditos de PPB inferiores a 90% e de Fu acima de 10%, bem como os derivados por bioisosterismo que manifestaram valores mais promissores quando comparados aos de seus respectivos ligantes precursores, foram sublinhados e coloridos em negrito verde. Por outro lado, resultados que evidenciaram uma elevada probabilidade de a substância química em xeque atravessar a BHE foram sublinhados e coloridos em vermelho. As estruturas químicas 2D dos derivados por bioisosterismo envolvidos nos destaques positivos foram adicionadas à tabela 12.

Tabela 12 – Predições de parâmetros de Distribuição dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continua)

Ligante	PPB	BHE	VD	Fu
Ensirelvir	93,6%	0,15	1,59 L/Kg	10,0%
Baicalein	99,0%	0,01	0,44 L/Kg	4,6%
Pelitinib	97,3%	0,22	1,62 L/Kg	2,6%
AT-7519	51,0%	Indet.	2,15 L/Kg	47,7%

Tabela 12 – Predições de parâmetros de Distribuição dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continuação)

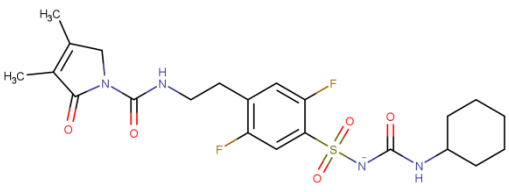
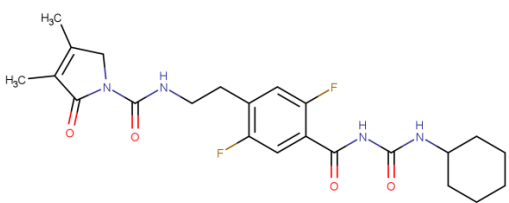
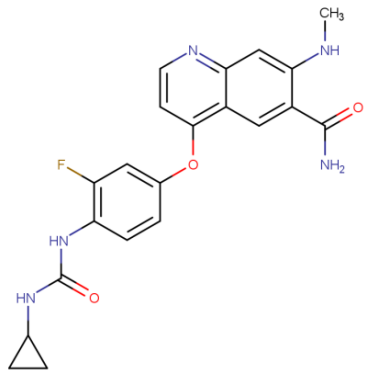
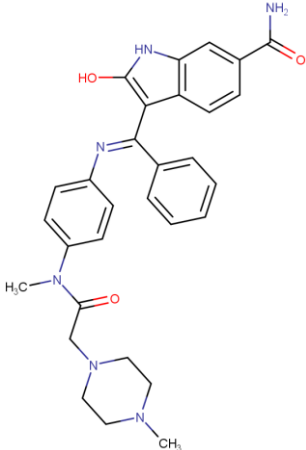
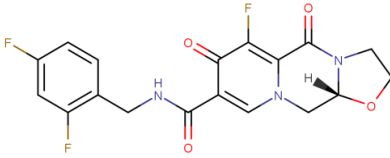
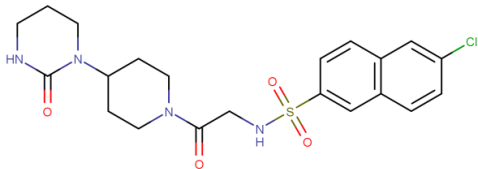
Ligante	PPB	BHE	VD	Fu
XR8-83	71,9%	Indet.	2,47 L/Kg	18,6%
Jun9-13-7	95,8%	0.81	3,28 L/Kg	3,5%
Nirmatrelvir	43,5%	0,08	0,66 L/Kg	56,3%
DB00222	97,1%	0,00	0,30 L/Kg	0,7%
DB00222_BI_004	93,9%	0,01	0,25 L/Kg	4,2%
				
DB00222_BI_005	95,7%	Indet.	0,60 L/Kg	2,4%
				
DB00549	99,4%	0,02	0,34 L/Kg	0,5%
DB00549_BI_005	99,6%	0,00	0,25 L/Kg	0,4%
DB04868	98,0%	0,02	1,73 L/Kg	3,6%
DB04868_BI_002	98,3%	0,01	1,71 L/Kg	2,3%
DB04868_BI_003	97,3%	0,03	1,23 L/Kg	3,7%
DB08882	64,0%	0,05	0,80 L/Kg	8,9%
DB08882_BI_001	70,0%	0,05	0,59 L/Kg	4,3%
DB09078	96,1%	Indet.	0,89 L/Kg	4,4%
DB09078_BI_002	95,8%	0,08	1,27 L/Kg	8,9%
				
DB09079	94,8%	0.88	1,97 L/Kg	3,3%

Tabela 12 – Predições de parâmetros de Distribuição dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(conclusão)

Ligante	PPB	BHE	VD	Fu
DB09079_BI_002	<u>81,9%</u>	<u>0,19</u>	2,18 L/Kg	<u>12,3%</u>
				
DB11751	91,2%	Indet.	0,95 L/Kg	4,0%
DB11751_BI_002	<u>77,3%</u>	<u>0,20</u>	1,50 L/Kg	<u>16,2%</u>
				
DB11984	89,3%	<u>0,93</u>	0,56 L/Kg	11,3%
DB11984_BI_002	<u>86,8%</u>	<u>0,89</u>	1,27 L/Kg	<u>12,2%</u>
				
DB12355	92,5%	Indet.	0,83 L/Kg	9,1%
DB12355_BI_004	96,2%	Indet.	1,40 L/Kg	2,8%
DB12364	<u>75,0%</u>	<u>0,97</u>	1,25 L/Kg	<u>21,1%</u>
DB12364_BI_006	96,2%	<u>0,12</u>	1,26 L/Kg	5,3%
DB12805	99,9%	0,00	0,33 L/Kg	0,7%
DB12805_BI_004	97,9%	0,08	0,83 L/Kg	3,9%
DB16650	95,7%	Indet.	1,05 L/Kg	4,6%
DB16650_BI_003	97,1%	0,05	1,28 L/Kg	4,7%

Fonte: do autor.

Legenda: PPB – percentual de ligação às proteínas plasmáticas; BHE – barreira hematoencefálica; VD – volume de distribuição; Fu – fração livre no plasma; Indet. – Indeterminado, pois o valor obtido encontra-se na faixa probabilística de 0,26 a 0,67, e todos os valores decimais representam a probabilidade de que o evento seja factível, variando de 0 a 1.

Pelo exposto, o parâmetro PPB foi diminuído, e, conseqüentemente, o Fu foi aumentado nos derivados DB00222_BI_004, DB00222_BI_005, DB09079_BI_002, DB11751_BI_002 e DB11984_BI_002. Como resultado positivo, caso estas substâncias químicas venham a se tornar fármacos, o índice terapêutico delas pode ter aumentado em relação ao de seus respectivos precursores, e, por conseqüência, o potencial tóxico, favoravelmente diminuído. Ademais, os derivados DB09079_BI_002, DB11751_BI_002 e DB12364_BI_006, quando comparados aos seus respectivos precursores, têm probabilidade consideravelmente menor de gerar efeitos adversos em nível de SNC. Os valores preditos de PPB para o nirmatrelvir e para os precursores DB00222, DB00549 e DB12364, cujos códigos representam, respectivamente, a glimepirida, um hipoglicemiante oral, o zafirlucaste, um antiasmático, e a betrixabana, um anticoagulante profilático, foram próximos dos descritos nas bulas dos medicamentos que os contêm. Para o nirmatrelvir, o valor que consta na bula deste fármaco é de 69%, versus 43,5% calculado pelo software ADMETlab 2.0; para a glimepirida, 99,5% versus 95,7%; para o zafirlucaste, acima de 99% versus 99,4%; e para a betrixabana, 60% versus 75,0%.^{136,139-141}

Os processos segundo os quais distintos fármacos sofrem alteração por reações bioquímicas no corpo de um ser vivo são descritos, em sua totalidade, como metabolismo (M).¹³⁷ Uma miríade de órgãos é capaz de metabolizar fármacos em certo grau mediante reações lideradas por enzimas.⁸² No entanto, a maior quantidade e diversidade de enzimas metabólicas estão contidas no fígado, de maneira que este órgão é o responsável por metabolizar a parcela mais expressiva dos fármacos.¹³⁷ Ademais, os rins, o trato gastrointestinal, os pulmões e a pele possuem, secundariamente, funções metabólicas significativas.^{82,137} A classificação de Williams tradicionalmente divide o metabolismo dos fármacos em fase I, ou simplesmente biotransformação, representada por reações de funcionalização, e em fase II ou conjugação, representada por reações de biossíntese. Estas reações da fase II são catalisadas por enzimas transferases que demandam a participação de cofatores para transferirem aos fármacos porções moleculares endógenas de alta polaridade mediante formação de uma ligação covalente por glicuronidação, sulfatação, conjugação com glicina, metilação, acetilação e/ou conjugação com glutatona. Todas estas transferases localizam-se no citosol, o líquido que preenche o interior do citoplasma, exceto a uridina-difosfato(UDP)-glicuroniltransferase (UGT) que se localiza no microsoma, isto é, na membrana do retículo endoplasmático, principalmente dos hepatócitos, i.e., das células do fígado.^{82,138} Em termos moleculares, essas reações metabólicas têm como principal finalidade transferir fármacos lipofílicos (com ↑ Log P e ↓ TPSA) em metabólitos hidrofílicos (com ↓ Log P e ↑ TPSA), favorecendo, por conseqüência, a eliminação deles pela mais importante via de excreção do organismo humano, a renal.^{82,133}

A biotransformação é a primeira etapa de metabolismo dos compostos químicos e envolve catabolismo mediante reações de hidrólise, de oxidação e de redução.^{82,133} Os produtos dela são, em sua grande maioria, mais reativos quimicamente para que, a seguir, outros grupos possam ser introduzidos na fase II.^{133,138} As reações de hidrólise são promovidas pelas esterases, amidases, tioesterases e fosfatases, agrupadamente denominadas hidrolases. Em sua grande maioria, elas se localizam no microssoma; porém, quando presentes no fígado, podem ser encontradas no citosol, em lisossomas e em mitocôndrias. As reações de oxidação, por sua vez, predominam na fase I, e, dentre as enzimas oxidativas, aquelas que compõem o citocromo P450 (CYP450) destacam-se pelo papel fundamental que exercem no metabolismo hepático de fármacos provenientes de diversas classes terapêuticas. CYP450 é a sigla atribuída a uma superfamília de hemoproteínas ou hemoproteínas, i.e., biomacromoléculas constituídas por uma parte proteica e por um grupo prostético, o heme, que consiste em um macrociclo tetrapirrólico, cujos quatro átomos de nitrogênio que o compõem coordenam, na porção central, um íon de Fe (II ou III) responsável por ligar o oxigênio molecular (O₂) aos locais ativos dessas enzimas.^{82,138} O quinto átomo que coordena este íon define o tipo de hemoproteína. No caso do CYP450, este átomo é o enxofre de um resíduo de aminoácido cisteína.⁸² O número 450 refere-se ao pico de absorção dessas hemoproteínas, que se dá em 450 nm quando elas se ligam ao monóxido de carbono.¹³⁷ As proteínas que caracterizam o complexo CYP450 estão presentes em bactérias, fungos, plantas, animais e seres humanos e associam-se a uma flavoproteína redutase, a NADPH-citocromo-P450 redutase, que transfere elétrons do NADPH para elas, acarretando sua redução e transformando-as em monoxigenases.⁸² Como resultado, estas enzimas medeiam oxidação por meio da inserção de um átomo de oxigênio a um substrato orgânico, seja uma molécula endógena, seja um xenobiótico, incluindo os fármacos.^{82,133,137} As transformações químicas consequentes do metabolismo influenciam diretamente na biodisponibilidade oral (F), um parâmetro de absorção, e na meia-vida de eliminação, um parâmetro de excreção que será descrito logo mais. Como consequência, a duração e a intensidade dos efeitos terapêuticos sofrem alteração, podendo, assim, culminar no aparecimento de efeitos tóxicos.^{82,138}

Já foram identificados 57 genes humanos codificadores de 18 famílias e 44 subfamílias de CYP450. Em 1987, recomendou-se “a abreviação CYP para designar proteína citocromo P450”, seguida de um número para indicar a família genética, ao qual se segue uma letra maiúscula para identificar a subfamília genética, seguida, finalmente, de um segundo numeral que designa a isoenzima ou o gene específico ao qual ela pertence.^{82,138} Proteínas CYP que apresentam identidade > 40% na sua sequência de aminoácidos pertencem à mesma família, e identidade > 55%, à mesma subfamília.⁸² Das 18 famílias existentes de CYP, apenas três delas

atuam no metabolismo de fármacos; são elas: CYP1, CYP2 e CYP3. Além disso, as isoenzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4 somadas são responsáveis por aproximadamente 75% de todo o metabolismo e 90% do metabolismo oxidativo da totalidade de fármacos presentes no mercado mundial, inclusive de pró-fármacos, isto é, de moléculas inativas que são transformadas em suas formas ativas (de fármacos) após metabolização via CYP.^{82,137} Dentre essas seis isoenzimas, CYP3A4, CYP2D6 e CYP1A2 são as mais ativas, com destaque maior para CYP3A4, devido ao seu envolvimento na metabolização de mais de 50% de todos os fármacos prescritos na clínica médica.¹³⁸ A caracterização das isoenzimas envolvidas no metabolismo de um fármaco é uma etapa singular para antecipação de eventuais interações medicamentosas, quando da aprovação da substância química em desenvolvimento para uso na terapêutica. As seis importantes isoenzimas supracitadas se encontram, majoritariamente, no microsoma hepático, e em menor escala no microsoma dos rins, das vias nasais, do cérebro, da pele e do intestino; exceção seja feita para CYP3A4, haja vista sua abundância no trato intestinal. Quimicamente, elas catalisam, em nível microsomal, reações de hidroxilação aromática, alílica, benzílica e alquílica, bem como de oxidação de heteroátomos, de epoxidação e de desalquilação, além de reações de redução, responsáveis por modificar estruturas químicas contendo duplas ligações mediante adição de hidrogênio.⁸²

Todas as enzimas envolvidas no metabolismo podem ser impactadas pelo fenômeno de inibição enzimática, o qual é caracterizado pela diminuição da atividade de enzimas metabólicas, resultando, assim, no aumento da concentração plasmática e da meia-vida de eliminação de um fármaco, fato que pode prejudicar o efeito terapêutico. Não raro, observa-se uma elevação da incidência de efeitos tóxicos ou adversos, favorecidos por fármacos que apresentam baixo índice terapêutico, assim como pela ausência de vias metabólicas alternativas àquela inibida para poderem ser ativadas. Inibidores de isoenzimas CYP, embora compitam pelos sítios ativos delas, não são, necessariamente, substratos destas enzimas.¹³³ Além disso, o modo de inibição pode ser reversível ou irreversível, mediante, neste caso, o estabelecimento de ligações covalentes.⁸² Uma consequência importante e concomitantemente perigosa da inibição de isoenzimas CYP é a diminuição do metabolismo de fármacos de tal maneira que suas concentrações ultrapassem a janela terapêutica, definida como o intervalo entre a dose eficaz mínima e a dose máxima permitida; como resultado, eles atingem níveis tóxicos.¹³⁷ Portanto, pressagiar a potencial interação, seja como substrato, seja como inibidor, de um fármaco com isoenzimas metabolizadoras do CYP450 é uma conjuntura *sine qua non* para que interações medicamentosas eventuais possam ser previstas e, assim, o uso do fármaco torne-se mais seguro.⁸² Similarmente, como já fora defendido por Brunton e colaboradores (2012), a

segurança e a eficácia de um fármaco dependem intrinsecamente do metabolismo dele. Neste sentido, abordagens com sistemas químico-computacionais são facilitadoras de uma subsequente etapa experimental.¹³⁸ Neste contexto, a plataforma ADMETlab 2.0 prediz os potenciais que substâncias químicas têm de ser substratos assim como de inibir cinco das seis principais isoenzimas envolvidas no metabolismo de fármacos; são elas: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4.¹³¹

Os parâmetros de excreção (E) escolhidos para serem avaliados foram: *clearance* (Cl) e meia-vida de eliminação ou simplesmente meia-vida. A eliminação de fármacos inalterados pela urina representa um dos mecanismos principais de subtração de cerca de 25 a 30% dos fármacos aprovados para uso em seres humanos.¹³⁸ Por esse motivo, a excreção é quantificada pelo parâmetro denominado depuração ou *clearance* (Cl) renal, que representa uma medida da eficiência do organismo em eliminar um fármaco da circulação sistêmica.^{133,138} Esta medida é determinada mediante cálculo do volume plasmático que contém a fração removida pelos rins de um composto químico ou fármaco na unidade de tempo estipulada. Para tanto, é necessário o conhecimento da velocidade de fluxo urinário, bem como das concentrações urinária e plasmática do fármaco em estudo. Os valores obtidos variam bastante, desde < 1 mL/min até o máximo teórico de 700 mL/min.¹³³ A relação entre VD e *clearance* permite determinar a meia-vida, isto é, a frequência necessária para se administrar um fármaco.⁸² Teoricamente, a meia-vida de eliminação de um fármaco é o tempo necessário para reduzir a concentração dele no plasma em 50% ($t_{1/2}$).^{137,138} O conhecimento deste tempo possibilita ao médico determinar a frequência de doses necessária para a manutenção da concentração plasmática de um fármaco dentro da janela terapêutica. Insuficiências renal, hepática e/ou cardíaca podem, em conjunto ou isoladamente, reduzir a capacidade de um fármaco ser inativado ou eliminado e, por conseguinte, aumentar a sua meia-vida. Ademais, os efeitos de fármacos com meia-vida longa são capazes de durar vários dias, como é o caso da cloroquina, cujo $t_{1/2}$ é de 1 semana.¹³⁷ Os valores de *clearance* preditos pelo ADMETlab 2.0 encontram-se na escala de mL/min/Kg e são considerados elevados quando > 15; moderados, na faixa de 5 a 15; e baixos quando < 5. Os valores de meia-vida de eliminação, por sua vez, refletem a probabilidade de 0 a 1 de o valor de $t_{1/2}$ de uma substância química ser > 3 h.¹³¹

A tabela 13 elenca as isoenzimas de CYP450 cujos ligantes apresentam valores de probabilidade entre 0,7 e 1,0 de ser substratos e/ou inibidores delas, de maneira que resultados na faixa de 0,26 a 0,67 foram ignorados, e quando todos os resultados se encontraram nesta faixa, a sigla “Indet.” foi utilizada. Além disso, os resultados encontrados para os 2 parâmetros de excreção supracitados foram incluídos nessa tabela. Os ligantes-controle e derivados por

bioisosterismo que apresentaram probabilidade elevada de ser substrato e/ou inibidor de nenhuma ou de apenas uma isoenzima de CYP450 foram sublinhados e coloridos em negrito verde. Similarmente, os compostos químicos que exibiram valores moderados de *clearance* (5 a 15 mL/min/Kg) e altos de probabilidade de $t_{1/2} > 3$ h foram igualmente destacados. As estruturas químicas 2D dos derivados por bioisosterismo envolvidos nestes destaques positivos foram adicionadas à tabela 13.

Tabela 13 – Predições de parâmetros de Metabolismo e de Excreção dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continua)

Ligante	CYP (inib.)	CYP (subst.)	<i>Clearance</i> (mL/min/Kg)	$T_{1/2}$
Ensitrelvir	2C19; 2C9; 3A4	<u>1A2</u>	<u>6,59</u>	<u>0,71</u>
Baicalein	<u>1A2</u>	Indet.	4,08	<u>0,88</u>
Pelitinib	1A2; 2D6; 3A4	1A2; 2C9; 2D6; 3A4	4,69	0,21
AT-7519	<u>1A2</u>	<u>2C9</u>	3,61	0,08
XR8-83	<u>2C9</u>	Indet.	4,63	0,03
Jun9-13-7	1A2; 2C19; 2D6	1A2; 2C19; 2D6; 3A4	<u>10,21</u>	Indet.
Nirmatrelvir	<u>3A4</u>	<u>3A4</u>	3,48	Indet.
DB00222	2C9	2C9; 3A4	0,19	0,08
DB00222_BI_004	2C9; 3A4	2C19; 2C9	0,72	0,10
DB00222_BI_005	<u>2C9</u>	<u>2C9</u>	2,44	0,09

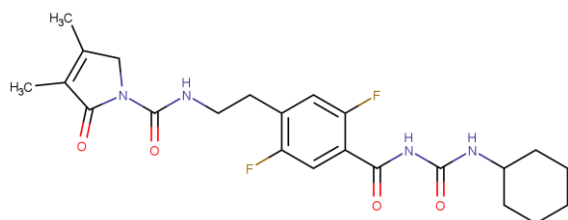


Tabela 13 – Predições de parâmetros de Metabolismo e de Excreção dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continuação)

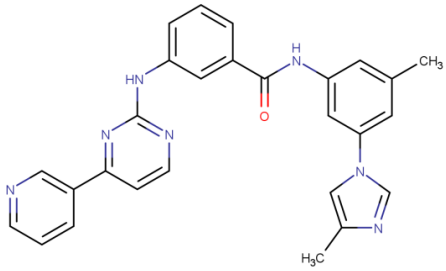
Ligante	CYP (inib.)	CYP (subst.)	Clearance (mL/min/Kg)	T _{1/2}
DB00549	2C9; 3A4	2C9; 3A4	1,38	0,14
DB00549_BI_005	2C9; 3A4	2C9; 3A4	0,45	0,11
DB04868	1A2; 2C19; 2C9; 2D6; 3A4	1A2; 3A4	4,50	Indet.
DB04868_BI_002	1A2; 2C19; 2D6; 3A4	Indet.	4,88	Indet.
 DB04868_BI_003	1A2; 2C19; 2C9; 2D6; 3A4	Indet.	4,72	0,79
DB08882	2C19; 2C9; 2D6; 3A4	1A2; 3A4	3,95	Indet.
DB08882_BI_001	2C19; 2C9; 3A4	1A2; 3A4	5,27	Indet.
DB09078	Indet.	1A2; 2C9	3,47	0,15

Tabela 13 – Predições de parâmetros de Metabolismo e de Excreção dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continuação)

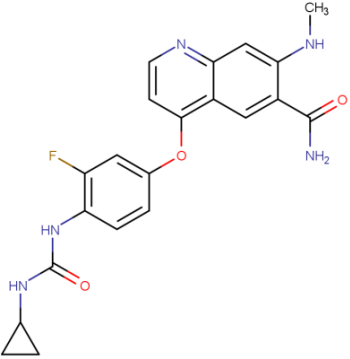
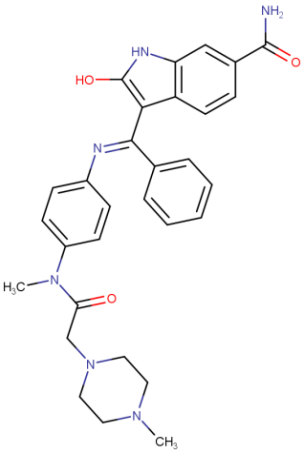
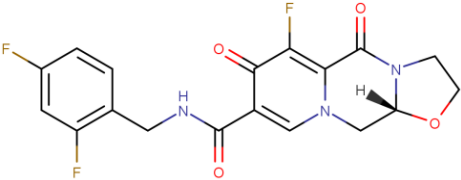
Ligante	CYP (inib.)	CYP (subst.)	Clearance (mL/min/Kg)	T _{1/2}
DB09078_BI_002	<u>1A2</u>	Indet.	3,88	0,14
				
DB09079	Indet.	1A2; 2C19; 3A4	4,04	0,03
DB09079_BI_002	Indet.	1A2; 2D6; 3A4	<u>10,44</u>	0,02
				
DB11751	Indet.	2C9	2,35	0,10
DB11751_BI_002	Indet.	<u>2C9</u>	2,12	0,09
				

Tabela 13 – Predições de parâmetros de Metabolismo e de Excreção dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continuação)

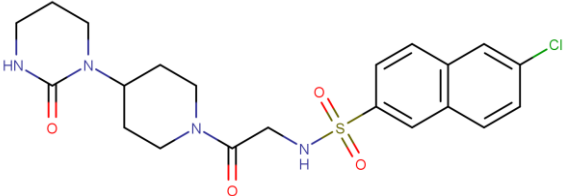
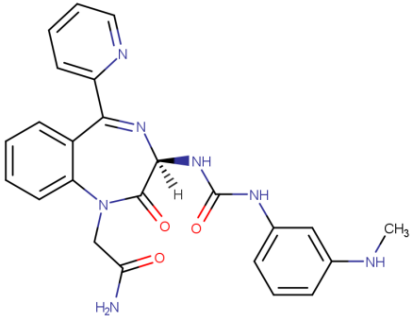
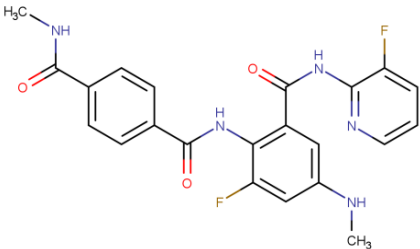
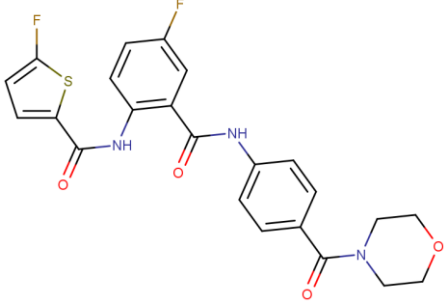
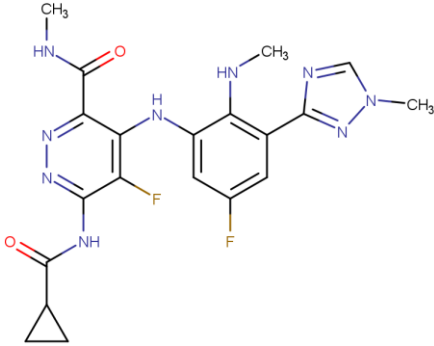
Ligante	CYP (inib.)	CYP (subst.)	Clearance (mL/min/Kg)	T _{1/2}	
DB11984	Indet.	2C19	1,89	0,16	
DB11984_BI_002	Indet.	Indet.	3,88	0,07	
	DB12355	2C19; 2C9; 3A4	3A4	3,21	0,30
DB12355_BI_004	Indet.	Indet.	6,05	0,26	
	DB12364	2D6	1A2; 2D6	1,56	Indet.
DB12364_BI_006	2C9; 3A4	2C9	5,15	Indet.	
	DB12805	2C19; 2C9; 3A4	2C9; 3A4	1,18	0,03

Tabela 13 – Predições de parâmetros de Metabolismo e de Excreção dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(conclusão)

Ligante	CYP (inib.)	CYP (subst.)	Clearance (mL/min/Kg)	T _{1/2}
DB12805_BI_004	Indet.	<u>2C9</u>	1,65	0,06
				
DB16650	1A2; 2C19; 2C9; 3A4	1A2; 2C9; 3A4	1,29	Indet.
DB16650_BI_003	<u>2C9</u>	<u>1A2</u>	<u>7,17</u>	Indet.
				

Fonte: do autor.

Legenda: CYP – isoenzimas do citocromo P450; T_{1/2} – tempo da meia-vida de eliminação; inib. – abreviação para inibição; subst. – abreviação para substrato; Indet. – Indeterminado, pois o valor obtido encontra-se na faixa probabilística de 0,26 a 0,67, e todos os valores decimais representam a probabilidade de que o evento seja factível, variando de 0 a 1.

Perante o exposto, o potencial de interações medicamentosas decresceu para os derivados DB00222_BI_005 e DB16650_BI_003. De igual maneira, a extensão da metabolização por isoenzimas CYP dos derivados DB00222_BI_005, DB12364_BI_006, DB12805_BI_004 e DB16650_BI_003 foi oportunamente diminuída. As predições das isoenzimas para as quais os fármacos nirmatrelvir, glimepirida (DB00222) e zafirlucaste (DB00549) servem como substratos equivaleram aos estudos de metabolismo descritos em suas

respectivas bulas.¹³⁹⁻¹⁴¹ Além disso, a prospecção do parâmetro *clearance* melhorou em todos os derivados por bioisosterismo quando comparados aos seus respectivos precursores, com exceção das substâncias DB00549_BI_005 e DB11751_BI_002. As melhorias mais significativas de *clearance* ocorreram com os derivados DB09079_BI_002, DB12355_BI_004, DB12364_BI_006 e DB16650_BI_003. No que tange ao $t_{1/2}$, o único derivado com probabilidade alta de apresentar uma meia-vida > 3 h é o DB04868_BI_003, fato que pode ser benéfico no sentido da necessidade de uma menor frequência de doses que facilitaria a adesão de um paciente à farmacoterapia, pensando-se hipoteticamente no desenvolvimento de um possível novo medicamento que contenha esse candidato a fármaco.

Os parâmetros de toxicidade (T) eleitos para serem analisados foram: cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, mutagenicidade, carcinogênese e toxicologia no século 21 (Tox21). Para tanto, foi determinado o potencial de os candidatos a fármacos inibirem uma proteína transmembrana do tipo canal iônico de potássio do coração que é codificada pelo gene humano conhecido pela sigla hERG (“*human Ether-a-go-go-Related Gene*”), visto que tal inibição está intimamente relacionada a consequências cardiotoxícas, tais como palpitação, taquicardia, desmaio e arritmia cardíaca possivelmente fatal.^{131,133,137} Ademais, foi calculada a probabilidade de as substâncias químicas em desenvolvimento para fins terapêuticos ocasionarem lesão hepática induzida por medicamentos (“*Drug-Induced Liver Injury*” ou simplesmente DILI), assim como de serem mutagênicas segundo o teste de Ames, um ensaio empírico de triagem amplamente utilizado para determinar o potencial que compostos químicos têm de causar mutações no DNA de espécies de bactérias do gênero *Salmonella*.^{131,142} A carcinogenicidade é um processo conhecidamente complexo que envolve múltiplas alterações no genoma ao longo de anos ou décadas e deve-se, sobremaneira, à exposição a carcinógenos químicos. Por essa razão, é de vital importância, durante o desenvolvimento de fármacos, a realização de testes que avaliem esse potencial carcinogênico.^{137,138} Por fim, a Tox21 é um programa de colaboração entre agências federais do EUA que desenvolveu mais de 75 metodologias *in vitro* de triagem de alto rendimento (“*quantitative High-Throughput Screening*” ou simplesmente qHTS).^{143,144,145} Estes métodos são sistemas robóticos totalmente automatizados que avaliaram, em linhagens de células humanas, o potencial tóxico de uma biblioteca química de cerca de 10 mil substâncias às quais seres humanos são expostos rotineiramente pela alimentação, pelo meio ambiente, e/ou pelo uso de fármacos estruturalmente semelhantes ou diversos aprovados para uso clínico; neste caso, foram incluídos mais de 90% dos fármacos aprovados pelo FDA ou em fases finais de estudos clínicos.^{143,144} Para antever essa latente toxicidade, uma ampla gama de vias de sinalização

celular e de potenciais alvos biológicos toxicologicamente relevantes foram analisados, a fim de que efeitos adversos devido a citotoxicidade, estresse celular, disfunção mitocondrial e ligação a receptores nucleares pudessem ser previstos.¹⁴⁵ Todos os dados e resultados das atividades exibidas pelos 10 mil compostos químicos que foram gerados pelas metodologias da Tox21 estão disponíveis publicamente através do seguinte endereço eletrônico: <https://tripod.nih.gov/tox/>.^{143,144,145} Com efeito, pesquisadores que trabalham com modelagem computacional podem utilizar esses resultados de alta qualidade para construir modelos que predizem a toxicidade de substâncias químicas antes que elas sejam testadas em laboratórios.¹⁴³

A partir desta oportunidade, os criadores da plataforma ADMETlab 2.0 estabeleceram a triagem *in silico* do potencial de interação de substâncias químicas com diferentes alvos biológicos que versam sobre 5 receptores nucleares (“*nuclear receptors*” – NR) e sobre 4 vias de sinalização envolvidas em respostas a estresses celulares (“*stress response*” – SR); neste caso, foi definido ainda o potencial de alteração de 1 parâmetro eletroquímico.¹⁰⁸ Os 5 alvos do tipo NR são o receptor de andrógeno (“*androgen receptor*” – AR), o qual tem influência no surgimento de doenças relacionadas a hormônios androgênicos, como, por exemplo, o câncer de próstata; o receptor de aril-hidrocarboneto (“*aryl hydrocarbon receptor*” – AhR), um tipo de fator de transcrição que é essencial para mediar respostas celulares adaptativas a poluentes ambientais, e.g. hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na fumaça do cigarro, por meio da indução de enzimas de fases I e/ou II e da interação com outras vias de sinalização de receptores nucleares; o receptor aromatase, responsável por catalisar a conversão de androgênios em estrogênios, e desempenhar um papel fundamental na homeostase, isto é, na manutenção do equilíbrio entre estas duas classes de hormônios; o receptor de estrogênio (“*estrogen receptor*” – ER), encarregado de ativar este hormônio, estando envolvido ainda em muitos cânceres de mama; e os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (“*peroxisome proliferator-activated receptors*” – PPARs), os quais abrangem três subtipos, o PPAR α , o PPAR γ e o PPAR β ou PPAR δ . Eles são considerados fatores de transcrição, pois, quando ativados, regulam a expressão de proteínas mediante ligação prévia a regiões promotoras de vários genes. O receptor PPAR γ , por exemplo, após heterodimerização com um segundo receptor, o retinoide X (RXR), ativa a transcrição de genes envolvidos na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídeos.^{131,137} No que se refere ao NR-AR e ao NR-ER, os compostos químicos são avaliados *in silico* duplamente quanto ao potencial que eles têm de ser agonistas destes receptores, isto é, de gerar o efeito fisiológico pretendido parcial ou plenamente, bem como de se ligar ao domínio de ligação do ligante (“*ligand binding domain*” – LBD), podendo, neste caso, ser agonistas ou antagonistas.^{131,138} As 4 vias do tipo SR são a do

elemento de resposta antioxidante (“*antioxidant response element*” – ARE), a qual desempenha um papel crucial na diminuição do estresse oxidativo; e da proteína 5 contendo o domínio AAA da família ATPase (“*ATPase family AAA domain-containing protein 5*” – ATAD5), que é de vital importância para a manutenção da integridade genômica, uma vez que está envolvida em reparos a danos no DNA que ocorrem durante ciclos de replicação por exposições prévias a agentes genotóxicos; os níveis da ATAD5 aumentam em resposta a várias formas de dano no DNA, fato que a classifica como uma proteína supressora de tumores; a via do elemento de resposta do fator de choque térmico (“*heat shock factor response element*” – HSE), que, após se ligar a fatores de transcrição específicos (“*heat shock transcription factors*” – HSFs) medeia uma regulação transcricional via HSR/UPR (“*heat shock response/unfolded protein response*”) que culmina na tradução de proteínas de choque térmico (“*heat shock proteins*” – HSPs), responsáveis por facilitar a dobradura de proteínas e evitar, assim, a formação de proteínas não funcionais; e a via da proteína supressora tumoral p53, a qual é ativada após estresse celular, incluindo danos no DNA; a principal atribuição dela consiste em regular o destino da célula, seja induzindo reparo do DNA, seja parando o ciclo celular por senescência, isto é, promovendo o envelhecimento das células após parada irreversível da multiplicação celular, seja por apoptose, isto é, por morte celular programada.^{131,137,146,147} Finalmente, o parâmetro eletroquímico avaliado que está envolvido em respostas a estresses celulares é o potencial de membrana mitocondrial (“*mitochondrial membrane potential*” – MMP), gerado pela cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria que cria um gradiente eletroquímico a partir de uma série de reações redox, e este gradiente impulsiona a síntese de ATP, uma molécula vital para vários processos celulares. Diminuições de MMP evidenciam um comprometimento da função mitocondrial.^{131,137,138} O único receptor para o qual a plataforma ADMETlab 2.0 determina especificamente o potencial de inibição é o NR-Aromatase.¹³¹ Farmacologicamente, inibidores de aromatase são usados no tratamento de tumores dependentes de estrogênio.¹³⁷ Os resultados preditos pela plataforma ADMETlab 2.0 são de probabilidade, e, portanto, variam de 0 a 1, sendo que foram listadas na tabela 14 apenas as vias com probabilidade de interação entre 0,7 e 1,0.¹³¹ Os resultados de substâncias químicas que apresentaram uma alta probabilidade de ser tóxicas para o coração, para o fígado e/ou para o DNA foram sublinhados e coloridos em vermelho. As melhorias de resultados obtidas com os derivados por bioisosterismo foram sublinhados e coloridos em negrito verde, e as estruturas 2D destes compostos foram adicionadas à tabela 14.

Tabela 14 – Predições de parâmetros de Toxicidade dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continua)

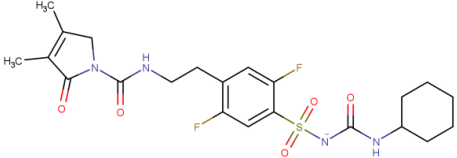
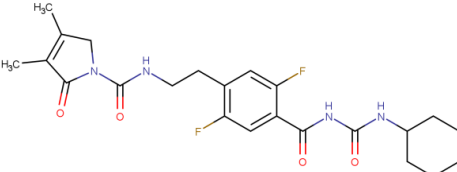
Ligante	hERG (inibição)	DILI	Ames	Carcin.	Tox21
Ensitrelvir	0,01	<u>0.98</u>	Indet.	<u>0.89</u>	NR-Aromatase; SR-ARE
Baicalein	0,04	<u>0.96</u>	Indet.	Indet.	NR-AhR; NR-Aromatase; NR-ER; NR-ER-LBD; NR-PPAR γ ; SR-ARE; SR-ATAD5; SR-HSE; SR-MMP; SR-p53
Pelitinib	<u>0.93</u>	<u>0.96</u>	<u>0.79</u>	0,16	NR-AR-LBD; NR-AhR; NR-Aromatase; SR-ARE; SR-HSE; SR-MMP; SR-p53
AT-7519	Indet.	<u>0.97</u>	0,02	0,12	NR-AhR
XR8-83	<u>0.95</u>	Indet.	Indet.	0,03	SR-MMP
Jun9-13-7	0,14	Indet.	0,02	0,07	SR-MMP
Nirmatrelvir	0,00	Indet.	0,01	0,24	–
DB00222	0,03	<u>0.99</u>	0,00	0,02	–
DB00222_BI_004	0,00	<u>0.98</u>	0,02	0,01	<u>SR-ARE</u>
					
DB00222_BI_005	0,02	<u>0.74</u>	0,02	0,01	–
					

Tabela 14 – Predições de parâmetros de Toxicidade dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continuação)

Ligante	hERG (inibição)	DILI	Ames	Carcin.	Tox21
DB00549	0,12	<u>0,99</u>	0,01	0,19	NR-AR; NR-PPAR γ ; SR-MMP
DB00549_BI_005	0,25	<u>0,99</u>	0,01	0,03	NR-AhR; SR-MMP
DB04868	<u>0,98</u>	<u>0,99</u>	Indet.	0,03	NR-AhR; NR-Aromatase; SR-ARE; SR-ATAD5; SR-MMP; SR-p53
DB04868_BI_002	<u>0,96</u>	<u>0,99</u>	0,26	0,08	NR-AhR; NR-Aromatase; NR-ER; NR-PPAR γ ; SR-ARE; SR-ATAD5; SR-HSE; SR-MMP; SR-p53
DB04868_BI_003	<u>0,98</u>	<u>0,99</u>	Indet.	0,05	NR-AhR; NR-Aromatase; NR-ER; NR-PPAR γ ; SR-ARE; SR-ATAD5; SR-HSE; SR-MMP; SR-p53
DB08882	<u>0,95</u>	<u>0,87</u>	Indet.	<u>0,88</u>	NR-AhR; SR-ARE
DB08882_BI_001	<u>0,81</u>	<u>0,84</u>	0,25	<u>0,91</u>	NR-AhR; SR-ARE

Tabela 14 – Predições de parâmetros de Toxicidade dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continuação)

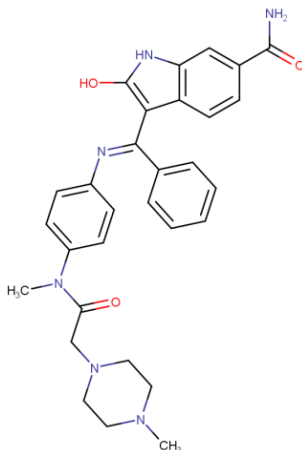
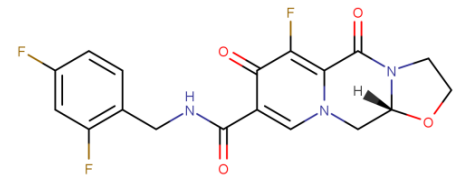
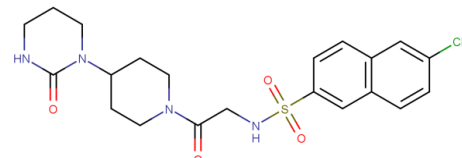
Ligante	hERG (inibição)	DILI	Ames	Carcin.	Tox21
DB09078	<u>0.70</u>	<u>0.96</u>	Indet.	Indet.	NR-AhR; SR-ARE; SR-MMP
DB09078_BI_002	<u>0.75</u>	<u>0.96</u>	Indet.	Indet.	NR-AhR; SR-ARE; SR-MMP
DB09079	<u>0.94</u>	<u>0.99</u>	0,02	0,08	NR-AhR
DB09079_BI_002	<u>0.94</u>	<u>0.98</u>	0,07	0,10	<u>NR-AhR</u>
	0,05	<u>0.97</u>	0,27	Indet.	SR-ARE
DB11751_BI_002	0,07	<u>0.87</u>	Indet.	Indet.	<u>SR-ARE</u>
	0,10	<u>0.95</u>	0,01	0,04	NR-AR; SR-ARE
DB11984_BI_002	0,28	<u>0.94</u>	0,01	0,05	<u>SR-ARE</u>
					

Tabela 14 – Predições de parâmetros de Toxicidade dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(continuação)

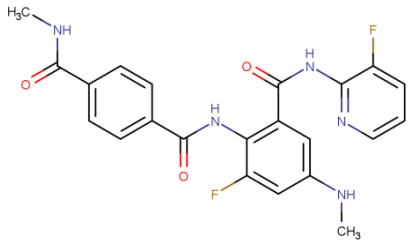
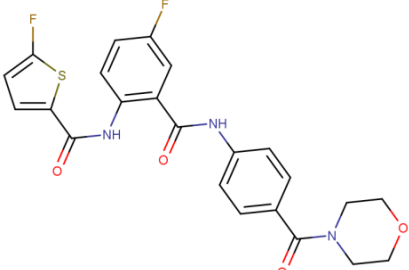
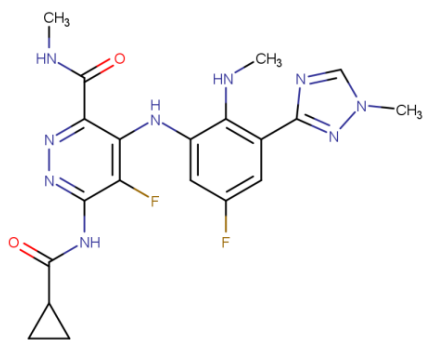
Ligante	hERG (inibição)	DILI	Ames	Carcin.	Tox21
DB12355	<u>0.75</u>	<u>0.98</u>	0,04	0,02	NR-AhR; NR-ER; NR-PPAR γ ; SR-ARE; SR-MMP
DB12355_BI_004	Indet.	<u>0.97</u>	0,24	0,06	NR-AhR; NR-PPAR γ ; SR-MMP; SR-p53
DB12364	<u>0.92</u>	<u>0.98</u>	Indet.	0,13	NR-AhR; NR-Aromatase; NR-ER; NR-ER-LBD; NR-PPAR γ ; SR-ARE; SR-ATAD5; SR-MMP; SR-p53
DB12364_BI_006	<u>0.27</u>	<u>0.97</u>	0,24	0,05	NR-AhR; SR-ARE; SR-ATAD5; SR-MMP; SR-p53
					
DB12805	Indet.	<u>1.00</u>	0,01	<u>0.78</u>	SR-ARE; SR-MMP
DB12805_BI_004	Indet.	<u>0.96</u>	0,09	Indet.	NR-AhR; NR-PPAR γ ; SR-ARE; SR-MMP; SR-p53
					

Tabela 14 – Predições de parâmetros de Toxicidade dos ligantes-controle, dos derivados e de seus precursores pela plataforma ADMETlab 2.0

(conclusão)					
Ligante	hERG (inibição)	DILI	Ames	Carcin.	Tox21
DB16650	0,04	<u>0.97</u>	0,22	<u>0.90</u>	NR-AhR; NR-Aromatase; NR-PPAR γ ; SR-ARE; SR-ATAD5; SR-HSE; SR-MMP; SR-p53
DB16650_BI_003	0,05	<u>0.98</u>	0,06	<u>0.07</u>	NR-AhR; NR-PPAR γ ; SR-MMP; SR-p53



Fonte: do autor.

Legenda: DILI – “*Drug-Induced Liver Injury*” (dano ao fígado causado por um medicamento); Carcin. – abreviação para carcinogenicidade; Indet. – Indeterminado, pois o valor obtido encontra-se na faixa probabilística de 0,26 a 0,67, e todos os valores decimais representam a probabilidade de que o evento seja factível, variando de 0 a 1.

Em face do exposto, o potencial de cardiotoxicidade do derivado DB12364_BI_006 diminuiu drasticamente quando comparado ao do seu precursor. De maneira ainda mais favorável, os derivados DB00222_BI_004, DB00222_BI_005, DB00549_BI_005, DB11751_BI_002, DB11984_BI_002 e DB16650_BI_003 apresentam baixa probabilidade de ser cardiotóxicos. Além disso, a ausência de cardiotoxicidade no fármaco nirmatrelvir e o potencial efeito cardiotóxico do fármaco nilotinibe (DB04868), um quimioterápico inibidor de tirosina quinase, foram confirmadas nas respectivas bulas dos medicamentos que os contêm.^{139,148} No que se refere ao potencial de causar dano ao fígado, todos os derivados e seus precursores demonstraram elevada probabilidade de ocasionar este efeito adverso. No entanto, para uso em patologias agudas, como é o caso da infecção viral pelo novo coronavírus, este

dano potencial ao fígado é improvável, uma vez que mecanismos biológicos de reversão de efeitos tóxicos ocorrem para a manutenção da homeostase nos organismos de indivíduos que não sofrem de doenças hepáticas.¹³⁸ Ademais, as altas probabilidades de hepatotoxicidade preditas para os fármacos zafirlucaste (DB00549) e nilotinibe (DB04868) foram ratificadas nas respectivas bulas dos medicamentos que os contêm, fato que, claramente, não impediu as suas comercializações.^{141,148} Similarmente, o baixíssimo potencial mutagênico determinado *in silico* para os fármacos nirmatrelvir, glimepirida (DB00222) e zafirlucaste (DB00549) foi confirmado pelos resultados dos testes de Ames descritos nas respectivas bulas dos medicamentos que contêm estes fármacos. No caso da glimepirida e do zafirlucaste, a baixa probabilidade de eles serem carcinogênicos foi igualmente confirmada.¹³⁹⁻¹⁴¹ Por outro lado, a péssima prospecção no âmbito da carcinogenicidade para o derivado DB08882_BI_001 acende um alerta importante quanto à sua segurança. Curiosamente, a probabilidade de o fármaco ensitrelvir ser carcinogênico foi elevada. Por fim, na esfera da Tox21, os derivados DB00222_BI_004, DB09079_BI_002 e DB11984_BI_002 demonstraram alto potencial de interagir com apenas um dos alvos estudados ou de interferir em apenas uma das vias de sinalização de estresse celular, enquanto o derivado DB00222_BI_005 não demonstrou potencial com nenhum dos alvos e nenhuma das vias avaliadas.

Em suma, tendo como base unicamente o potencial de inibição enzimática a partir de valores preditos de K_i , os derivados por bioisosterismo mais promissores seriam DB12364_BI_006 e DB12805_BI_004 contra o sítio ativo da enzima M^{pro} ($K_i = 108,6$ nM), e DB04868_BI_003 e DB00549_BI_005 contra o sítio ativo da enzima PL^{pro} ($K_i = 33,3$ nM e $39,4$ nM, respectivamente). Levando-se em conta associadamente os resultados de interações intermoleculares estabelecidas, a inibição predita da PL^{pro} por estes dois derivados é reforçada, haja vista o número de ligações de H clássicas estabelecidas, além do potencial, no caso do composto DB04868_BI_003, da realização de interações com a Cys111, um dos resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica da PL^{pro} . Segundo esse mesmo ponto de vista, para a enzima M^{pro} , no entanto, os melhores derivados seriam DB12355_BI_004 e DB00549_BI_005, com valores preditos de K_i igual a $298,9$ nM. Isto se dá em virtude do número de ligações de H clássicas realizadas pelos derivados DB12355_BI_004 e DB00549_BI_005 ser igual a 8 e a 6, respectivamente, versus 4 e 3 dos compostos DB12364_BI_006 e DB12805_BI_004. Embora todos esses 4 derivados tenham interagido com um dos resíduos de aminoácidos que compõem a díade catalítica da M^{pro} (His41 e/ou Cys145), apenas o composto DB11984_BI_002 estabeleceu ligações de H clássicas com ambos. Além disso, tanto as propriedades físico-químicas quanto os parâmetros

farmacocinéticos preditos para este derivado foram auspiciosos, com exceção da considerável possibilidade de que ele atravesse a BHE e, conseqüentemente, ocasione efeitos adversos em nível de SNC. Um ponto desfavorável do composto DB12355_BI_004 é a presença de um centro estereogênico, visto que essa característica demanda esforços para o isolamento de isômeros quirais, tendo em vista o conhecido impacto da quiralidade sobre diferentes potenciais de inibição enzimática entre isômeros. Neste contexto, estudos conduzidos por Shen *et al.* (2022) envolvendo uma série congênere que deu origem ao ligante-controle XR8-83 evidenciou, mediante ensaios *in vitro*, diferenças de inibição entre isômeros quirais da enzima PL^{pro}. Um segundo ponto de infortúnio do derivado DB12355_BI_004 é a previsibilidade de que sua permeabilidade por difusão passiva nos enterócitos seja mediana. Uma terceira causa de desventura, que é inclusive compartilhada pelos compostos DB04868_BI_003, DB12364_BI_006 e DB12805_BI_004, refere-se à elevada probabilidade de ele ocasionar efeitos adversos decorrentes da interação com muitos alvos e/ou vias de sinalização de estresse celular (Tox21). O derivado DB04868_BI_003 possui ainda alertas de alto potencial cardiotoxíco, bem como de interações medicamentosas, tendo em vista o seu possível envolvimento na inibição de cinco isoenzimas de CYP, assim como na inibição de P-gp. Neste caso, o composto DB00549_BI_005 compartilha do mesmo desfortúnio. Outro ponto negativo destes dois derivados, assim como do DB11984_BI_002, é a elevada probabilidade de que eles sejam substratos de P-gp, fato que pode prejudicar a biodisponibilidade deles. No caso do composto DB00549_BI_005, esse fato refletiu em uma possibilidade alta de $F < 30\%$. No tocante aos derivados DB00549_BI_005, DB04868_BI_003 e DB12364_BI_006, entretanto, todas as desvantagens trazidas à tona para eles foram igualmente expressas pelos seus respectivos ligantes precursores, os quais são os fármacos zafirlucaste, nilotinibe e betrixabana, aprovados pelo FDA para uso clínico. Além disso, a potencial indução de hepatotoxicidade expressa por todos os derivados, sem exceção, é muito provavelmente reversível, como acontece na maioria dos casos de hepatopatias causadas pelo uso de medicamentos que tratam infecções agudas, conforme elucidado por Golan *et al.* (2014). Para concluir, foi propiciamente constatado a partir dos resultados de ancoragem molecular que os derivados DB00549_BI_005 e DB04868_BI_003 têm um mecanismo de ação multialvo contra os sítios ativos de ambas as cisteíno proteases do SARS-CoV-2 e, cada qual, respectivamente, contra os sítios alostéricos 1 e 2 da enzima M^{pro}.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O status de “emergência de saúde pública de importância internacional” envolvendo a COVID-19 foi revogado pela OMS no início do mês de maio de 2023, pouco mais de três anos após o comunicado oficial emitido por este mesmo órgão informando que a doença em xeque atingira proporções pandêmicas.^{149,150} Entretanto, essa revogação não significa que a pandemia teve fim, pois a COVID-19 continua ceifando, ao redor do mundo, a vida de uma pessoa a cada três minutos.¹⁴⁹

Após todo esse período, o conhecimento científico acumulado sobre o SARS-CoV-2 expandiu horizontes, tornando evidente a imperatividade de se continuar buscando por novos candidatos a fármacos antivirais que atuem como inibidores seletivos de enzimas essenciais desse patógeno. Neste contexto, moléculas inovadoras são necessárias tanto para o combate a futuros surtos quanto para impedir que toda a farmacoterapia disponível sucumba à resistência adquirida por novas variantes do SARS-CoV-2. Esta resistência já pode ter sido inclusive expressa por subvariantes da Ômicron, conforme constatado por Iketani *et al.* (2023) em estudos *in vitro* com os fármacos nirmatrelvir e ensitrelvir.¹⁵¹

No âmbito dessa problemática, os resultados obtidos mediante o desenvolvimento da pesquisa científica em questão revelaram que estudos computacionais de ancoragem molecular envolvendo substituições bioisostéricas de fármacos ou de candidatos a fármacos são um excelente passo inicial rumo à criação de um novo arsenal químico contra a COVID-19. Com efeito, a estratégia de bioisosterismo foi capaz de melhorar a afinidade de substâncias químicas pelas cisteíno proteases do SARS-CoV-2 ao mesmo tempo em que simplificou algumas destas moléculas e otimizou suas propriedades físico-químicas, assim como seus parâmetros farmacocinéticos.

Anseia-se que a pesquisa científica envolvendo os derivados DB00549_BI_005, DB04868_BI_003, DB11984_BI_002, DB12364_BI_006 e DB12805_BI_004 prossiga com uma equipe multidisciplinar em direção a estudos de dinâmica molecular seguidos de ensaios empíricos com o propósito de ratificar os resultados defendidos *in silico*. Para tanto, recomenda-se a descoberta das rotas sintéticas dessas substâncias químicas, a fim de que estudos *in vitro* e *in vivo* sejam conduzidos para a determinação tanto da eficácia quanto da segurança dessas entidades moleculares inovadoras concebidas por bioisosterismo.

REFERÊNCIAS

1. LLOYD, S. **Programming the universe**: a quantum computer scientist takes on the cosmos. 1st ed. New York City: Knopf, 2006. 240 p.
2. MOHAMED, K. *et al.* Computational drug discovery and repurposing for the treatment of COVID-19: a systematic review. **Bioorganic Chemistry**, v. 106, 2021.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO coronavirus (COVID-19) dashboard**. [Geneva, Switzerland], 29 Dec. 2022. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 29 dez. 2022.
4. ROBSON, D. **Why some people don't want a COVID-19 vaccine**. [London, United Kingdom]: BBC Future, 22 July 2021. Disponível em: <https://www.bbc.com/future/article/20210720-the-complexities-of-vaccine-hesitancy>. Acesso em: 18 ago. 2021.
5. HILDRETH, J. E. K.; ALCENDOR, D. J. Targeting COVID-19 vaccine hesitancy in minority populations in the US: implications for herd immunity. **Vaccines**, v. 9, n. 489, 2021.
6. TREGONING, J. S. *et al.* Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 10, p. 626-636, 2021.
7. STANKIEWICZ, K. **Pfizer's CEO says COVID vaccine effectiveness drops to 84% after six months**. [Englewood Cliffs, New Jersey]: CNBC Health and Science, 28 July 2021. Disponível em: <https://www.cnbc.com/amp/2021/07/28/pfizers-ceo-says-covid-vaccine-effectiveness-drops-to-84percent-after-six-months.html>. Acesso em: 18 ago. 2021.
8. PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: a rational approach in drug design. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 8, p. 3147-3176, 1996.
9. LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.
10. BARREIRO, E. J. *et al.* Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 1, 1997.
11. GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37-46, 2008.
12. CHEN, G.; SEUKEP, A. J.; GUO, M. Recent advances in molecular *docking* for the research and discovery of potential marine drugs. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, 2020.

13. CABALLERO, J. The latest automated *docking* technologies for novel drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 16, n. 6, p. 625-645, 2020.
14. KHAN, M. *et al.* COVID-19: A global challenge with old history, epidemiology and progress so far. **Molecules**, v. 26, n. 39, 2021.
15. KOONIN, E. V.; KRUPOVIC, M.; AGOL, V. The Baltimore classification of viruses 50 years later: how does it stand in the light of virus evolution?. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 85, n. 3, 2021.
16. IZDA, V.; JEFFRIES, M. A.; SAWALHA, A. H. COVID-19: A review of therapeutic strategies and vaccine candidates. **Clinical Immunology**, v. 222, 2021.
17. CASCELLA, M. *et al.* **Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19)**. Treasure Island, Florida: StatPearls, 30 July 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>. Acesso em: 28 ago. 2021.
18. MISHRA, D. *et al.* Structurally modified compounds of hydroxychloroquine, remdesivir and tetrahydrocannabinol against main protease of SARS-CoV-2, a possible hope for COVID-19: *docking* and molecular dynamics simulation studies. **Journal of Molecular Liquids**, v. 335, 2021.
19. ARYA, R. *et al.* Structural insights into SARS-CoV-2 Proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 2, 2021.
20. HARVEY, W. *et al.* SARS- CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 409-424, 2021.
21. WU, Y. *et al.* In silico identification of drug candidates against COVID-19. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 21, 2020.
22. OSIPIUK, J. *et al.* Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors. **Nature communications**, v. 12, n. 743, 2021.
23. UNIPROT. **UniProtKB, SARS-CoV-2, P0DTD1, function, catalytic activity**. [Hinxton, United Kingdom: European Bioinformatics Institute; Geneva: Swiss Institute of Bioinformatics; Washington, DC: Protein Information Resource], [2020]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0DTD1/entry#function>. Acesso em: 17 jul. 2023.
24. WANG, H. *et al.* SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin-and caveolae-independent endocytic pathway. **Cell Research**, v. 18, n. 2, p. 290-301, 2008.
25. UNIPROT. **UniProtKB, Homo sapiens, Q9BYF1, function, catalytic activity**. [Hinxton, United Kingdom: European Bioinformatics Institute; Geneva: Swiss Institute of Bioinformatics; Washington, DC: Protein Information Resource], [2002 ?]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9BYF1/entry#function>. Acesso em: 17 jul. 2023.

26. XU, C. *et al.* Conformational dynamics of SARS-CoV-2 trimeric spike glycoprotein in complex with receptor ACE2 revealed by cryo-EM. **Science Advances**, v. 7, n. 1, 2021.
27. UNIPROT. **UniProtKB, Homo sapiens, O15393, function, catalytic activity.** [Hinxton, United Kingdom: European Bioinformatics Institute; Geneva: Swiss Institute of Bioinformatics; Washington, DC: Protein Information Resource], [2002 ?]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O15393/entry#function>. Acesso em: 17 jul. 2023.
28. HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280, 2020.
29. TROUGAKOS, I. *et al.* Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. **Journal of Biomedical Science**, v. 28, n. 9, 2021.
30. LUAN, B. *et al.* Targeting proteases for treating COVID-19. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 11, p. 4316-4326, 2020.
31. OU, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.
32. UNIPROT. **UniProtKB, Homo sapiens, P07858, function, catalytic activity.** [Hinxton, United Kingdom: European Bioinformatics Institute; Geneva: Swiss Institute of Bioinformatics; Washington, DC: Protein Information Resource], [2002 ?]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P07858/entry#function>. Acesso em: 17 jul. 2023.
33. UNIPROT. **UniProtKB, Homo sapiens, O60911, function, catalytic activity.** [Hinxton, United Kingdom: European Bioinformatics Institute; Geneva: Swiss Institute of Bioinformatics; Washington, DC: Protein Information Resource], [2002 ?]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O60911/entry#function>. Acesso em: 17 jul. 2023.
34. HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; PÖHLMANN, S. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. **Molecular Cell**, v. 78, n. 4, p. 779-784, 2020.
35. WALLS, A. C. *et al.* Structure, function, and antigenicity of the SARSCoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281-292, 2020.
36. WRAPP, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260-1263, 2020.
37. DONOGHUE, M. *et al.* A Novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. e1-e9, 2000.

38. IMAI, Y.; KUBA, K.; PENNINGER, J. M. The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 5, p. 543-548, 2008.
39. DING, S.; LIANG, J. Is SARS-CoV-2 also an enteric pathogen with potential fecal–oral transmission? A COVID-19 virological and clinical review. **Gastroenterology**, v. 159, p. 53-61, 2020.
40. TUKIAINEN, T. *et al.* Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. **Nature**, v. 550, p. 244-248, 2017.
41. LEUNG, J. M. *et al.* ACE-2 expression in the small airway epithelia of smokers and COPD patients: implications for COVID-19. **European Respiratory Journal**, v. 55, 2020.
42. DIAZ, J. H.; MPH&TM, P. H. Hypothesis: angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers may increase the risk of severe COVID-19. **Journal of Travel Medicine**, v. 27, n. 3, 2020.
43. HUSSAIN, M. *et al.* Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 9, p. 1580-1586, 2020.
44. ROSAS-LEMUS, M. *et al.* High-resolution structures of the SARS-CoV-2 2'-omethyltransferase reveal strategies for structure-based inhibitor design. **Science Signaling**, v. 13, 2020.
45. KIM, Y. *et al.* Tipiracil binds to uridine site and inhibits nsp15 endoribonuclease NendoU from SARS-CoV-2. **Communications Biology**, v. 4, n. 193, 2021.
46. 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 of the United States of America (PNAS)**, v. 119, n. 16, 2022.
47. YAN, S.; WU, G. Potential 3-chymotrypsin-like cysteine protease cleavage sites in the coronavirus polyproteins pp1a and pp1ab and their possible relevance to COVID-19 vaccine and drug development. **The FASEB Journal**, v. 35, n. 5, 2021.
48. SAMRAT, S. K. *et al.* Allosteric inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2. **Antiviral Research**, v. 205, n. 105381, 2022.
49. EASTMAN, R. T. *et al.* Remdesivir: a review of its discovery and development leading to emergency use authorization for treatment of COVID-19. **ACS Central Science**, v. 6, n. 5, p. 672-683, 2020.
50. LIU, Y. C.; KUO, R. L.; SHIH, S. R. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. **Biomedical Journal**, v. 43, p. 328-333, 2020.

51. MIRZA, M. U.; FROEYEN, M. Structural elucidation of SARS-CoV-2 vital proteins: computational methods reveal potential drug candidates against main protease, nsp12 polymerase and nsp13 helicase. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, p. 320-328, 2020.
52. 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, 2020.
53. GUNTHER, S. *et al.* X-ray screening identifies active site and allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. **Science**, v. 372, n. 6542, p. 642-646, 2021.
54. ZHANG, C-H. *et al.* Optimization of triarylpyridinone inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2 to low-nanomolar antiviral potency. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 8, p. 1325-1332, 2021.
55. OERLEMANS, R. *et al.* Repurposing the HCV NS3–4A protease drug boceprevir as COVID-19 therapeutics. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 370-379, 2021.
56. STASIULEWICZ, A. *et al.* SARS-CoV-2 papain-like protease potential inhibitors – in silico quantitative assessment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3957, 2021.
57. EWERT, W. *et al.* Hydrazones and thiosemicarbazones targeting protein-protein-interactions of SARS-CoV-2 papain-like protease. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, n. 832431, 2022.
58. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (USA). **Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines**. [Bethesda, Maryland], 29 Apr. 2022. Disponível em: <https://files.covid19treatmentguidelines.nih.gov/guidelines/covid19treatmentguidelines.pdf>. Acesso em: 05 maio 2022.
59. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **SARS-CoV-2 variants of concern as of 28 april 2022**. [Solna, Sweden], 28 Apr. 2022. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>. Acesso em: 05 maio 2022.
60. RAMBAUT, A. *et al.* A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature Microbiology**, v. 5, p. 1403-1407, 2020.
61. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Previously circulating VOIs**. [Geneva, Switzerland], [2021 ou 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/previously-circulating-vois>. Acesso em: 29 dez. 2022.
62. DEPLANQUE, D.; LAUNAY, O. Efficacy of COVID-19 vaccines: from clinical trials to real life. **Therapie**, v. 76, p. 277-283, 2021.
63. VINCENT, M. J. *et al.* Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. **Virology Journal**, v. 2, n. 69, 2005.

64. LIU, J. *et al.* Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. **Cell Discovery**, v. 6, n. 16, 2020.
65. BERTONI, E. Quais medicamentos contra a COVID foram aprovados pela Anvisa. **Nexo Jornal**, São Paulo, 11 set. 2021. Disponível em: <https://www.nexojornal.com.br/expresso/2021/09/11/Quais-medicamentos-contr-a-covid-foram-aprovados-pela-Anvisa?posicao-home-esquerda=2>. Acesso em: 06 nov. 2021.
66. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Coronavirus (COVID-19) update: FDA authorizes first oral antiviral for treatment of COVID-19**. [Silver Spring, Maryland], 22 Dec. 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19>. Acesso em: 05 maio 2022.
67. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Anvisa aprova uso emergencial do medicamento Paxlovid para COVID-19**. Brasília, 30 mar. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-uso-emergencial-do-medicamento-paxlovid-para-covid-19>. Acesso em: 05 maio 2022.
68. MEDICINES AND HEALTHCARE PRODUCTS REGULATORY AGENCY. **First oral antiviral for COVID-19, Lagevrio (molnupiravir), approved by MHRA**. [London, United Kingdom], 04 Nov. 2021. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/news/first-oral-antiviral-for-covid-19-lagevrio-molnupiravir-approved-by-mhra>. Acesso em: 04 nov. 2021.
69. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Coronavirus (COVID-19) update: FDA authorizes additional oral antiviral for treatment of COVID-19 in certain adults**. 23 dez. 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-additional-oral-antiviral-treatment-covid-19-certain>. Acesso em: 05 maio 2022.
70. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Anvisa aprova uso emergencial do medicamento molnupiravir para Covid-19**. Brasília, 04 maio 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-uso-emergencial-do-medicamento-paxlovid-para-covid-19>. Acesso em: 05 maio 2022.
71. EUROPEAN CONGRESS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, 32., 2022, Lisboa, Portugal. **Anais** [Phase 2b part of S-217622, a novel 3C-like protease inhibitor as once daily oral treatment for SARS-CoV-2 infection in Japan and South Korea] Lisboa/Portugal, 2022. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/197a7tnSeCyhk43WN47OoVmrLxSrHA2fB/view>. Acesso em: 05 maio 2022.

72. SHIONOGI. **New data for shionogi's COVID-19 once daily oral antiviral S-217622 show rapid virus clearance.** Osaka, Japan, 23 Apr. 2021. Disponível em: <https://www.shionogi.com/us/en/news/2022/04/new-data-for-shionogis-covid-19-once-daily-oral-antiviral-s-217622-show-rapid-virus-clearance.html>. Acesso em: 05 maio 2022.
73. SHIONOGI. **Xocova® (ensitrelvir fumaric acid) tablets 125mg approved in Japan for the treatment of SARS-CoV-2 infection, under the emergency regulatory approval system.** Osaka, Japan, 22 Nov. 2021. Disponível em: <https://www.shionogi.com/global/en/news/2022/11/e20221122.html>. Acesso em: 10 fev. 2023.
74. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Glossary of terms used in medicinal chemistry.** Zürich, Switzerland, 1998. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html>. Acesso em: 01 set. 2021.
75. SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 505-512, 2002.
76. SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.
77. SILVEIRA, N. J. F. *et al.* Web services for molecular *docking* simulations. In: DE AZEVEDO JR., W. F. (Ed.). **Docking screens for drug discovery – methods in molecular biology.** New York City: Springer Nature, 2019. v. 2053, p. 221-229.
78. ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREADY, J. E. Combining *docking* and molecular dynamic simulations in drug design. **Medical Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.
79. COHEN, N. C. *et al.* Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 883-894, 1990.
80. BITENCOURT, G. F.; DE AZEVEDO JR, W. F. How *docking* programs work. In: DE AZEVEDO JR., W. F. (Ed.). **Docking screens for drug discovery – methods in molecular biology.** New York City: Springer Nature, 2019. v. 2053, p. 35-50.
81. ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Physical chemistry: thermodynamics, structure, and change.** 10th ed. Oxford, Great Britain: Oxford University Press, 2014. 1008 p.
82. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
83. RAMÍREZ, D.; CABALLERO, J. Is it reliable to take the molecular *docking* top scoring position as the best solution without considering available structural data?. **Molecules**, v. 23, n. 1038, 2018.

84. EBERHARDT, J. *et al.* Autodock vina 1.2.0: new *docking* methods, expanded force field, and python bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 8., p. 3891-3898, 2021.
85. NGUYEN, N. T. *et al.* Autodock vina adopts more accurate binding poses but autodock4 forms better binding affinity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 1, p. 204-211, 2020.
86. BEST, R. B. Atomistic force fields for proteins. *In*: BONOMI, M.; CAMILLONI, C. (Ed.). **Biomolecular simulations: methods and protocols – methods in molecular biology**. New York City: Springer Nature, 2019. v. 2022, p. 3-19.
87. TROTT, O.; OLSON, A. J. Autodock vina: improving the speed and accuracy of *docking* with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Wiley Periodicals**, v. 31, p. 455-461, 2010.
88. MEANWELL, N. A. The design and application of bioisosteres in drug design. *In*: ABRAHAM, D. J.; MYERS, M. (Ed.). **Burger's medicinal chemistry, drug discovery and development: methods in drug discovery and discovering lead molecules**. 8th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2021.
89. KIER, L. B.; HALL, L. H. Bioisosterism: quantitation of structure and property effects. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, n. 1, p. 138-151, 2004.
90. DA SILVEIRA, N. J. F. *et al.* Bioinformatics approach on bioisosterism softwares to be used in drug discovery and development. **Current Bioinformatics**, v. 16, p. 1-11, 2021.
91. UNIPROT. **UniProtKB, SARS-CoV-2, P0DTC1, structure**. [Hinxton, United Kingdom: European Bioinformatics Institute; Geneva: Swiss Institute of Bioinformatics; Washington, DC: Protein Information Resource], [2020]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0DTC1/entry#structure>. Acesso em: 03 jan. 2022.
92. UNOH, Y. *et al.* Discovery of S-217622, a noncovalent oral SARS-CoV-2 3CL protease inhibitor clinical candidate for treating COVID-19. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 9, p. 6499-6512, 2022.
93. RESEARCH COLLABORATORY FOR STRUCTURAL BIOINFORMATICS PROTEIN DATA BANK. **3D structures, 7VU6, download files, PDB format**. [Piscataway, New Jersey], 06 Apr. 2022. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/7VU6>. Acesso em: 13 abr. 2022.
94. RESEARCH COLLABORATORY FOR STRUCTURAL BIOINFORMATICS PROTEIN DATA BANK. **3D structures, 7JN2, download files, PDB format**. [Piscataway, New Jersey], 12 Aug. 2020. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/7JN2>. Acesso em: 03 jan. 2022.
95. MARTÍNEZ-ROSELL, G.; GIORGINO, T.; DE FABRITIIS, G. Playmolecule proteinprepare: a web application for protein preparation for molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, n. 57, p. 1511-1516, 2017.

96. PLAYMOLECULE. **ProteinPrepare**: a protein preparation app for MD simulations. [Barcelona, Espanha], [2017]. Disponível em: <https://playmolecule.com/proteinPrepare/>. Acesso em: 18 mar. 2023.
97. KIM, M. O.; NICHOLS, S. E.; WANG, Y.; MCCAMMON, J. A. Effects of histidine protonation and rotameric states on virtual screening of *M. tuberculosis* RmlC. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 23, n. 3, p. 235-246, 2013.
98. DRUGBANK. **Categories**. Edmonton, Alberta, [201-]. Disponível em: <https://go.drugbank.com/categories>. Acessos em: 21 fev. 2022 a 15 ago. 2022.
99. PUBCHEM. **Explore chemistry**. [Bethesda, Maryland], [200-]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acessos em: 21 fev. 2022 a 15 ago. 2022.
100. ELIAS, T. C.; DE OLIVEIRA, H. C. B.; SILVEIRA, N. J. F. MB-isoster: a software for bioisosterism simulation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 39, n. 29, p. 2481-2487, 2018.
101. TYNDALL, J. D. A. S-217622, a 3CL Protease inhibitor and clinical candidate for SARS-CoV-2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 9, p. 6496-6498, 2022.
102. GAO, K. *et al.* Perspectives on SARS-CoV-2 main protease inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 16922-16955, 2021.
103. CALLEJA, D. J.; LESSENE, G.; KOMANDER, D. Inhibitors of SARS-CoV-2 PLpro. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, p. 1-20, 2022.
104. SHEN, Z. *et al.* Design of SARS-CoV-2 PLpro inhibitors for COVID-19 antiviral therapy leveraging binding cooperativity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, p. 2940-2955, 2022.
105. MA, C. *et al.* Discovery of SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors through a combination of high-throughput screening and a flipGFP-based reporter assay. **ACS Central Science**, v. 7, p. 1245-1260, 2021.
106. ORTIZ, C. L. D. *et al.* Potential inhibitors of galactofuranosyltransferase 2 (GlfT2): molecular *docking*, 3D-QSAR, and in silico ADMETox studies. **Scientific Reports**, v. 9, n. 17096, 2019.
107. DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
108. XIONG, G. *et al.* ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Research**, v. 49, p. 5-14, 2021.
109. LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3-26, 2001.

110. LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, 2004.
111. VEBER, D. F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.
112. BAKER, E. N.; HUBBARD, R. E. Hydrogen bonding in globular proteins. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, n. 44, n. 2, p. 97-179, 1984.
113. BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A Medicinal chemist's guide to molecular interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5061-5084, 2010.
114. PIERCE, A. C.; SANDRETTO, K. L.; BEMIS, G. W. Kinase inhibitors and the case for CH...O hydrogen bonds in protein-ligand binding. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 49, n. 4, p. 567-576, 2002.
115. WOLBER, G.; LANGER, T. Ligandscout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. **Journal of Chemical Information Modeling**, v. 45, n. 1, p. 160-169, 2005.
116. GALLIVAN, J. P.; DOUGHERTY, D. A. Cation- π interactions in structural biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 96, n. 17, p. 9459-9464, 1999.
117. BIOT, C. *et al.* Probing the energetic and structural role of amino acid/nucleobase cation- π interactions in protein-ligand complexes. **Journal of Biological Chemistry**, n. 277, v. 43, p. 40816-40822, 2002.
118. FRONTERA, A. *et al.* Putting anion- π interactions into perspective. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 41, p. 9564-9583, 2011.
119. MCGAUGHEY, G. B.; GAGNÉ, M.; RAPPÉ, A. K. π -stacking interactions: alive and well in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15458-15463, 1998.
120. MITCHELL, J. B. *et al.* Amino/aromatic interactions in proteins: is the evidence stacked against hydrogen bonding?. **Journal of Molecular Biology**, v. 239, n. 2, p. 315-331, 1994.
121. OZAWA, T. *et al.* The importance of CH/ π hydrogen bonds in rational drug design: an ab initio fragment molecular orbital study to leukocyte-specific protein tyrosine (LCK) kinase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 24, p. 10311-10318, 2008.
122. MÜLLER, K.; FAEH, C.; DIEDERICH, F. Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition. **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1881-1886, 2007.
123. AUFFINGER, P. *et al.* Halogen bonds in biological molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 101, n. 48, p. 16789-16794, 2004.

124. RINGER, A.; SENENKO, A.; SHERRIL, C. D. Models of S/pi interactions in protein structures: comparison of the H₂S-benzene complex with PDB data. **Protein Science**, v. 16, n. 10, p. 2216-2223, 2007.
125. JEFFREY, G. A. **An introduction to hydrogen bonding**. 1st ed. Oxford, England: Oxford University Press, 1997.
126. FREY, P. A. Low barrier hydrogen bonds. *In*: LENNARZ, W. J.; LANE, M. D. (Ed.). **Encyclopedia of biological chemistry**, v. 2, p. 594-598, 2014.
127. JIN, Z. *et al.* Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, p. 289-293, 2020.
128. CUI, W.; YANG, K.; YANG, H. Recent progress in the drug development targeting SARS-CoV-2 main protease as treatment for COVID-19. **Frontiers in Molecular Bioscience**, v. 7, n. 616341, 2020.
129. WANG, Z. *et al.* Identification of proteasome and caspase inhibitors targeting SARS-CoV-2 Mpro. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 214, 2021.
130. WANG, H. *et al.* The structure-based design of peptidomimetic inhibitors against SARS-CoV-2 3C like protease as Potent anti-viral drug candidate. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 238, n. 114458, 2022.
131. ADMETLAB2.0. **Explanation** – Xiangya school of pharmaceutical sciences. Hangzhou, Zhejiang, 2020. Disponível em: <https://admetmesh.scbdd.com/explanation/index>. Acesso em: 18 nov. 2022.
132. AMBUDKAR, S. *et al.* P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7468-85, 2003.
133. RANG, H. P. *et al.* **RANG & DALE Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
134. IRVINE, J. D. *et al.* MDCK (madin-darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, 1999.
135. VOLPE, D. A. Variability in caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 2, 2008.
136. BEVYXXA: betrixaban. South San Francisco, California: Portola Pharmaceuticals, 2017. 1 bula de remédio (21 p.). Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208383s0001b1.pdf. Acesso em: 12 maio 2023.
137. GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios de farmacologia** – a base fisiopatológica da farmacologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
138. BRUNTON, L. L. *et al.* **As Bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

139. PAXLOVID: nirmatrelvir, ritonavir. São Paulo: Pfizer, 29 abr. 2022. 1 bula de remédio (30 p.). Disponível em: <https://www.pfizer.com.br/bulas/paxlovid>. Acesso em: 12 maio 2023.
140. AMARYL: glimepiride. Bridgewater, New Jersey: Sanofi-Aventis, 2009. 1 bula de remédio (14 p.). Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020496s021lbl.pdf. Acesso em: 12 maio 2023.
141. ACCOLATE: zafirluskast. Wilmington, Delaware: AstraZeneca, 2013. 1 bula de remédio (17 p.). Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/020547s033lbl.pdf. Acesso em: 12 maio 2023.
142. ZEIGER, E. The test that changed the world: the Ames test and the regulation of chemicals. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 841, p. 43,48, 2019.
143. NATIONAL CENTER FOR ADVANCING TRANSLATIONAL SCIENCES. **10,000 Compounds and counting**: scientists create extensive chemical library to study toxic substances, share data. [Bethesda, Maryland], 21 Sept. 2022. Disponível em: <https://ncats.nih.gov/pubs/features/10000-compounds-and-counting-scientists-create-extensive-chemical-library-to-study-toxic-substances-share-data>. Acesso em: 11 maio 2023.
144. SAKAMURU, S.; HUANG, R.; XIA, M. Use of tox21 screening data to evaluate the COVID-19 drug candidates for their potential toxic effects and related pathways. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.
145. HUBBARD, T. D. *et al.* Using tox21 high-throughput screening assays for the evaluation of botanical and dietary supplements. **Applied In Vitro Toxicology**, v. 5, n. 1, p. 10-25, 2019.
146. PARK, S. H. *et al.* ATAD5 promotes replication restart by regulating RAD51 and PCNA in response to replication stress. **Nature Communications**, v. 10, n. 5718, 2019.
147. PEINADO-RUIZ, I. C. *et al.* Relationship between heat shock proteins and cellular resistance to drugs and ageing. **Experimental Gerontology**, v. 167, n. 111896, 2022.
148. TASIGNA: nilotinib. East Hanover, New Jersey: Novartis Pharmaceuticals, Dec. 2007. 1 bula de remédio (35 p.). Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/022068s026lbl.pdf. Acesso em: 12 maio 2023.
149. NOGUEIRA, P. **Fim da emergência de saúde pública para a COVID-19 decretado pela OMS não implica término da pandemia, alerta pesquisadora da Unesp**. São Paulo: Jornal da Unesp [online], 09 maio 2023.
150. KUPFERSCHMIDT, K.; WADMAN, M. End of COVID-19 emergencies sparks debate. **Science**, v. 380, n. 6645, 2023.

151. IKETANI, S. *et al.* Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. **Nature**, v. 613, p. 558-564, 2023.

APÊNDICE – Artigo publicado no *Journal of Computational Chemistry*

Os resultados mais promissores obtidos a partir do desenvolvimento deste trabalho científico foram publicados no *Journal of Computational Chemistry*, e o artigo fruto deste marco encontra-se a seguir.

RESEARCH ARTICLE

Applying the bioisosterism strategy to obtain lead compounds against SARS-CoV-2 cysteine proteases: An in-silico approach

João Ricardo Bueno de Moraes Borba¹  | Leonardo Pereira de Araújo² |
Marcia Paranho Veloso³ | Nelson José Freitas da Silveira⁴

¹João Ricardo Bueno de Moraes Borba, Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation – MolMod-CS, Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas – UNIFAL-MG, Alfenas, Brazil

²Leonardo Pereira de Araújo, Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation – MolMod-CS, Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas – UNIFAL-MG, Alfenas, Brazil

³Marcia Paranho Veloso, Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation – MolMod-CS, Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas – UNIFAL-MG, Alfenas, Brazil

⁴Nelson José Freitas da Silveira, Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation – MolMod-CS, Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas – UNIFAL-MG, Alfenas, Brazil

Correspondence

João Ricardo Bueno de Moraes Borba, João Ricardo Bueno de Moraes Borba, Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation – MolMod-CS, Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas – UNIFAL-MG, Street Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, Brazil, 37130-000.
Email: joao.borba@sou.unifal-mg.edu.br

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Abstract

SARS-CoV-2 cysteine proteases are essential nonstructural proteins due to their role in the formation of the virus multiple enzyme replication-transcription complex. As a result, those functional proteins are extremely relevant targets in the development of a new drug candidate to fight COVID-19. Based on this fact and guided by the bioisosterism strategy, the present work has selected 126 out of 1050 ligands from DrugBank website. Subsequently, 831 chemical analogs containing bioisosteres, some of which became structurally simplified, were created using the MB-Isoster software, and molecular docking simulations were performed using AutoDock Vina. Finally, a study of physicochemical properties, along with pharmacokinetic profiles, was carried out through SwissADME and ADMETlab 2.0 platforms. The promising results obtained with the molecules encoded as DB00549_BI_005, DB04868_BI_003, DB11984_BI_002, DB12364_BI_006 and DB12805_BI_004 must be confirmed by molecular dynamics studies, followed by in vitro and in vivo empirical tests that ratify the advocated in-silico results.

KEYWORDS

bioisosterism, cysteine proteases, molecular docking, SARS-CoV-2

1 | INTRODUCTION

According to an official statement from the World Health Organization (WHO), for the first time in history, a virus from the Coronaviridae family, called SARS-CoV-2, reached pandemic proportions on March 11, 2020.^{1,2} The disease caused by this etiologic agent was titled Coronavirus Disease 2019 or simply COVID-19. Based on WHO COVID-19 dashboard at the time that this text was written, the total

number of people's deaths attributable to COVID-19 had already exceeded 6.9 million across the five continents of Earth.³ SARS-CoV-2 is a virus that encodes two large polypeptide chains, namely pp1a and pp1ab, with the contribution of its host's cellular machinery.² These polyproteins are subsequently processed into 1 peptide and 15 nonstructural proteins, namely Nsp1 to Nsp16.⁴⁻⁷ Two of them, after having undergone autocleavage, process the other Nsps.^{7,8} These two enzymes, collectively called cysteine proteases

(EC 3.4.22), are Nsp5 (EC 3.4.22.69), better known as main protease, or 3CL^{Pro}, or simply M^{Pro}, and the papain-like protease, or simply PL^{Pro}, which represents one of the Nsp3 domains (EC 3.4.22.46).⁹ Both enzymes cause proteolysis so that the other Nsps become functional, thereby allowing specific Nsps to come together to form the SARS-CoV-2 multiple enzyme replication-transcription complex (RTC), which is essential for originating a new viral particle. As a result, the infection provoked by this virus settles in the host's organism.^{4–10} The absence of proteins highly homologous to M^{Pro} and PL^{Pro} in humans makes these enzymes extremely attractive targets for the development of drug candidates that are efficacious to fight COVID-19.^{4,7}

Currently, the only drug that inhibits one of the SARS-CoV-2 cysteine proteases and has been approved by regulatory agencies around the world for emergency use in the treatment of COVID-19 is nirmatrelvir. Its mechanism of action consists in inhibiting covalently the M^{Pro} enzyme.^{11,12} However, less than a year after its approval, Iketani and collaborators argued that new variants of SARS-CoV-2 might easily acquire or have already acquired resistance to nirmatrelvir via several pathways evinced through in vitro studies.¹³ In this sense, the same drug resistance hypothesis defended by these researchers was extended to ensitrelvir, a second M^{Pro} inhibitor, but a noncovalent one, which has been approved for emergency use in Japan.^{14,15} However, no drug exists on the market inhibiting PL^{Pro} or acting as a multitarget, inhibiting both M^{Pro} and PL^{Pro}.

There are several reasons to use the bioisosterism strategy in the development of new drug candidates, among which the need to gain selectivity for a given receptor or enzyme is noteworthy.^{16–18} Acting as a collaborative methodology in this process, the molecular docking protocol stands out as one of the most useful techniques in the modern world for research studies involving the initial development of new drugs. In this context, there is a wide range of software available on the market. Out of more than 50 existing package programs, AutoDock Vina or simply Vina, a semi-flexible docking software of simple parameter configuration and easy to use, has been one of the most utilized tools in the last decade for in-silico simulations of the intermolecular interaction between small flexible ligands and rigid biomacromolecules with flexible side chains.^{19–22} Therefore, approaches involving computational systems on a chemical scope facilitate a subsequent experimental stage.²³ Based on the information given above, the current scientific research proposes the use of the bioisosterism strategy through the MB-Isoster software, associated with molecular docking studies, through AutoDock Vina, for the in-silico development of innovative molecules that promisingly inhibit cysteine proteases of SARS-CoV-2 or that function as multitargets for the treatment of COVID-19, thereby having the potential of being furtherly developed as a medication administered orally.^{22,24} Subsequently, for the most promising drug candidates, physicochemical properties, as well as drug-like aspects and pharmacokinetic parameters from Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity (ADMET) were determined.

2 | METHODS

Initially, the search of both M^{Pro} and PL^{Pro} 3D structures was conducted on the Uniprot database. The code P0DTC1 was chosen, as it has undergone review, and its annotations have the maximum score of 5.²⁵ The selected PDB codes of M^{Pro} and PL^{Pro} 3D structures are, respectively, 7VU6 and 7JN2, and their resolution values are 1.80 and 1.93 Å.¹⁴ Both M^{Pro} and PL^{Pro} were downloaded in *.pdb format from the RCSB PDB website.^{26,27} Initially, the chemical groups of these proteins' amino acids were protonated at pH 7.4, and water molecules were removed using the ProteinPrepare software from the PlayMolecule platform.^{28,29} This step is particularly important for determining both the protonation state and the hydrogen location on the histidine (His) amino acid, which can assume three different states. Its first two states are neutral and tautomeric to one another, and the difference between them lies in the proton location. In this regard, when the His imidazole ring hydrogen is bound to the epsilon nitrogen, it is identified by the abbreviation “Hie” or “HIE”; on the other hand, when the same hydrogen is bound to the delta nitrogen of the imidazole ring, the His is identified by the abbreviation “Hid” or “HID.” The third and final protonation state of this amino acid is the abbreviation “Hip” or “HIP,” which stands for His having hydrogens attached to both epsilon and delta nitrogens, and therefore acquiring a positive charge.³⁰ Subsequently, using the AutoDock Tools (ADT) v1.5.7 software,²² other unwanted molecular entities were removed from both proteins. Finally, Kollman charges and polar hydrogen atoms were added to M^{Pro} and PL^{Pro} structures, and both could be saved in *.pdbqt format.

All precursor ligands modified through bioisosterism were selected on the DrugBank website after applying the following filters in the “Categories” section: “Amides”; “Integrase Inhibitors”; “Protease Inhibitors”; “Antiviral agents”; and “Tyrosine Kinase Inhibitors.”³¹ These filters were chosen based on the structural potential that molecular entities belonging to them would have to become peptidomimetic compounds. After a visual evaluation of 1050 molecules obtained through the filters mentioned above, 126 out of these molecules, which represent either drugs already approved in the pharmaceutical market or drug candidates in investigational phase of clinical studies, were selected as precursor ligands. The 3D structures of these chemical substances were obtained from the PubChem website library in *.sdf format.³² They were then modified using the MB-Isoster software, which allowed the creation of 831 analogs through bioisosterism.²⁴ In addition, based on IC₅₀ results previously obtained from in vitro experiments performed by other researchers, two control ligands belonging to the subclass of noncovalent inhibitors were chosen for each protein. For M^{Pro}, the chosen molecules were ensitrelvir and baicalein, whose IC₅₀ values are 13 and 940 nM, respectively.^{33,34} For PL^{Pro}, the chosen ligands were X8-83 and Jun9-13-7, whose IC₅₀ values are 210 and 7300 nM, respectively.^{35–37} Most of all 3D structures were found on the PubChem website, while the ones that were not available in its library were drawn and optimized using the MarvinSketch v21.20 software. Both precursors and analogs containing chiral centers did not have their different enantiomers analyzed,

so only one of these optical isomers was evaluated. Subsequently, ionization states at pH 7.4 were generated by the OpenBabel v3.1.1 tool, which was also used to convert all ligands to *.pdbqt format, including the precursors downloaded from PubChem and the structural analogs designed through MB-Isoster. However, molecules containing tertiary amine, sulfonamide, cyclic secondary amine, and aromatic hydroxyl groups had their ionization states at pH 7.4 generated by the MarvinSketch v21.20 software due to structural issues encountered during the OpenBabel conversion. Additionally, for ligands with predominant chemical species/ionization states at levels lower than 80%, the two or three most abundant species at pH 7.4 were assessed. In the results and discussion section, the score values of these different species appear in a descending order of abundance and are separated by a slash (/). Equal score values are represented by the symbol (*).

Molecular docking studies were conducted using the AutoDock Vina v1.1.2 software.²² The version 1.1.2 of AutoDock Vina was chosen instead of the newest one (1.2) as there is a script on the laboratory servers compatible with the version 1.1.2 that allows to perform docking studies on a batch mode, and, therefore, various results can be generated all at once. The version 1.2, on the other hand, is incompatible with the .log output file, so the binding energy results from all docking results would not be known if this version replaced the version 1.1.2. Moreover, regarding binding energy results, there were no significant differences between these versions when they were tested in unitary docking studies with the same enzyme and the same ligand. To ensure that all ligands would interact with each enzyme's active site, molecular docking calculations were configured on the ADT v1.5.7 software by delimiting the search spaces, also known as grid boxes, using the following settings for 7VU6 and 7JN2, respectively: $x = 6.025$ (25 Å), $y = 12.623$ (25 Å), $z = -6.436$ (25 Å); $x = 45.346$ (25 Å), $y = 27.456$ (25 Å), $z = 1.935$ (25 Å). For the M^{Pro} enzyme, one out of two allosteric sites previously described by Günther and collaborators was also studied. The molecular docking grid box settings for this allosteric site were as follows: $x = 10.647$ (25 Å), $y = -7.993$ (25 Å), $z = 23.613$ (25 Å).³⁸

All results were analyzed from a binding energy perspective (provided in $-\text{kcal mol}^{-1}$) and organized in an ascending order of energy (from the most negative to the most positive value), with the aim of determining the best interaction profiles. Additionally, K_i values were predicted by the following formula created on Microsoft Excel: $K_i = e^{(\Delta G/RT)}$, also used by Ortiz and collaborators in 2019.³⁹ This formula represents an important thermodynamic relationship that allows determining the equilibrium constant (K) of a system from ΔG values. In this context, AutoDock Vina binding energy/score results are closely related to ΔG values.

After selecting the most favorable results, the highest-ranked conformations of each ligand were complexed with each protein, and the complex was saved in the *.pdb format using the PyMOL v2.5.2 software. In this sense, to determine intermolecular interactions, such as hydrogen bonding, 2D and 3D representations of the ligand-protein complex were generated using the Discovery Studio (DS) Client v21.1.0.20298 software. Furthermore, 3D protein-ligand complementarity was assessed using the Pymol v2.5.2 software.

To validate the in-silico simulations, redocking was performed, and RMSD values were calculated using the DS software.

Finally, a study of lipophilicity along with three drug-like aspects (Lipinski/Veber rules, structural alerts, and synthetic accessibility) was conducted using the SwissADME platform.⁴⁰ Afterwards, the analysis of one more physicochemical property (LogD) along with ADMET parameters was carried out with the best analogs containing bioisosteres as well as with their precursors and best control ligands, using the ADMETlab 2.0 platform.⁴¹ For these purposes, the SMILES codes of both precursor and control ligands were obtained from the PubChem database, while the SMILES codes of all analogs were generated using the OpenBabel tool.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

All precursor ligands were named according to their respective DrugBank identification codes (DrugBank Accession Numbers). In addition to these codes, bioisosteric analogs were named with the suffix “_BI” followed by the numbering “_00X” or “OX” to indicate the number of cumulative bioisosteric replacements. Control ligands were named according to their given names or codes provided by their creators in publications known to the scientific community. In the case of ensitrelvir, two ligands were evaluated because it exists in the form of two tautomers,¹⁴ thereby requiring the addition of the numbers “_1” and “_2” to differentiate the molecular docking results.

Tables 1–3 list the three best results for M^{Pro} active and allosteric sites and for PL^{Pro} active site, along with a promising fourth result for M^{Pro} active site (added to Table 1). For each case, the number of chiral carbons present in the ligands, as well as the score obtained for each molecular docking result, and the predicted K_i were assessed. Furthermore, the bioisosteric changes taking place on all analogs were detailed. In this sense, it is important to mention that the structural changes resulting in a decrease of chiral carbons number fall also into the molecular simplification strategy.⁴²

The results show significant increases in the affinity for SARS-CoV-2 cysteine proteases, particularly those ones involving the DB12355_BI_004 analog against the M^{Pro} active site, listed in Table 1, as well as the DB00549_BI_005 analog against the PL^{Pro} active site, present in Table 3. Moreover, the bioisosteric modification of OH to H in the DB11984_BI_002 analog, described in Table 1, was responsible for favorably eliminating the chirality that was present in its precursor ligand.

During the bioisosteric modifications divulged in Tables 1–3, the aim was not only to increase the affinity for SARS-CoV-2 cysteine proteases, but also to improve lipophilicity in favor of oral absorption and to optimize drug-like properties. Therefore, lipophilicity and three drug-like aspects were predicted for all ligands using the SwissADME platform. Lipophilicity evaluation was based on LogP values, which correlate with a satisfactory intestinal absorption when they are between 1 and 3. This range translates into a drug having a high probability of permeating the intestinal cell membrane through passive diffusion.⁴² The first drug-like property evaluated was Lipinski's Rule

Ligand	Chiral carbons	Bioisosteric changes	Score ^a	K _i ^b
Ensitrelvir_1	0	NA	−10.7	14.2
Ensitrelvir_2	0	NA	−10.6	17.0
Baicalein	0	NA	−8.3/−8.1 ^(*)	823.1/1153.6
DB00549	0	NA	−8.5	587.2
DB00549_BI_005	0	CH ₃ for H (3 x) ^c O for CH ₂ O for NH	−8.9	298.9
DB11984	1	NA	−8.6	496.0
DB11984_BI_002	0	OH for H CH ₂ for NH	−9.1	213.3
DB12355	1	NA	−7.2	5270.1
DB12355_BI_004	1	CH ₃ for H (3 x) ^c CH ₃ for NH ₂	−8.9	298.9
DB12364	0	NA	−8.6	496.0
DB12364_BI_006	0	N for O (on C=N) CH ₃ for H O for NH Cl for H H for F (2 x) ^c	−9.5	108.6

TABLE 1 Molecular aspects, docking results, and predicted K_i values against SARS-CoV-2 M^{PRO} active site (PDB code: 7VU6).

^aUnit in kcal mol^{−1}.

^bUnit in nM.

^c“x” stands for times.

TABLE 2 Molecular aspects, docking results, and predicted K_i values against SARS-CoV-2 M^{PRO} allosteric site (PDB code: 7VU6).

Ligand	Chiral carbons	Bioisosteric changes	Score ^a	K _i ^b
Ensitrelvir_1	0	NA	−8.0	1365.7
Ensitrelvir_2	0	NA	−9.3	152.2
Baicalein	0	NA	−7.9/−7.5/−7.7	1616.8/3176.1/2266.1
AT-7519	1	NA	−7.0	7386.4
DB04868	0	NA	−9.3	152.2
DB04868_BI_002	0	CF ₃ for CH ₃ CH ₃ for H	−9.2	180.2
DB04868_BI_003	0	CF ₃ for CH ₃ CH ₃ for H (2 x) ^c	−9.4	128.5
DB09079	0	NA	−8.2 ^(*)	974.4
DB09079_BI_002	0	O for NH CH ₃ for H	−9.1 ^(*)	213.3
DB12805	0	NA	−8.1	1153.6
DB12805_BI_004	0	Cl for F (2 x) ^c O=S=O for C=O (2 x) ^c	−9.5	108.6

^aUnit in kcal mol^{−1}.

^bUnit in nM.

^c“x” stands for times.

TABLE 3 Molecular aspects, docking results, and predicted K_i values against SARS-CoV-2 PL^{PRO} active site (PDB code: 7JN2).

Ligand	Chiral carbons	Bioisosteric changes	Score ^a	K_i^b
XR8-83	3	NA	-10.5	20.1
Jun9-13-7	1	NA	-6.9 ^(c)	8744.7
DB00549	0	NA	-8.1	1153.6
DB00549_BI_005	0	CH ₃ for H (3 x) ^c O for CH ₂ O for NH	-10.1	39.4
DB04868	0	NA	-9.1	213.3
DB04868_BI_002	0	CF ₃ for CH ₃ CH ₃ for H	-10.2	33.3
DB04868_BI_003	0	CF ₃ for CH ₃ CH ₃ for H (2 x) ^c	-9.6	91.7
DB14929	0	NA	-7.8	1914.1
DB14929_BI_007	0	Br for H Cl for H (2 x) ^c F for H H for F (2 x) ^c O=S=O for C=O	-8.5/-9.0	587.2/252.5

^aUnit in kcal mol⁻¹.^bUnit in nM.^c"x" stands for times.

of Five (2001) and Veber's rules (2002).⁴³⁻⁴⁵ The second drug-like aspect was the identification of structural alerts for molecular fragments that are potentially toxic, chemically reactive, metabolically unstable, or responsible for poor pharmacokinetics. The third and final drug-like property was synthetic accessibility. In this case, values range from 1 to 10, and the lower the result the better is the predicted synthetic feasibility of the molecule under study.⁴⁰ The results are displayed on the following Table 4.

The application of bioisosterism was able to significantly reduce high LogP values exhibited by precursor ligands. In fact, the nonclassical bioisosteric replacements of CF₃ with CH₃ and CH₃ with H at two different positions in the DB04868 precursor decreased its LogP from 4.63 to 3.35 in the DB04868_BI_003 analog. Another significant decrease in LogP values occurred with the DB09079_BI_002 analog, whose change was from 3.50 to 2.8, when compared to its precursor. In addition, the application of classical bioisosterism by replacing N with O (C=N with C=O) in the DB12364 precursor was essential not only to reduce its LogP value from 3.22 to 2.74 in the DB12364_BI_006 analog, but also to eliminate structural alerts owing to the presence of an imine group (N=C/N-C=N). Finally, three nonclassical bioisosteric replacements of CH₃ with H and one of CH₃ with NH₂ led to a LogP decrease in the DB12355_BI_004 analog from 3.17 to 1.35, when compared to its precursor.

In terms of drug-likeness, two classical bioisosteric replacements of O with CH₂ and CH₃ with H in the DB00549_BI_005 analog resulted in the elimination of the Veber's rule violation for the number of rotatable bonds, which must be ≤10. Additionally, a second

violation of Veber's rules (Topological Polar Surface Area or simply TPSA >140 Å) could be eliminated in the DB12805_BI_004 analog. Regarding Lipinski's rules, the bioisosteric replacements resulting in the DB04868_BI_003 and DB12805_BI_004 analogs eliminated their precursor ligands violation of molecular masses above 500 Da. Furthermore, significant improvements in terms of synthetic accessibility were observed in all analogs, except for DB12364_BI_006. The most notable enhancement occurred with the DB11984_BI_002 analog due to the elimination of chirality.

Subsequently, a more detailed physicochemical evaluation was conducted on the best control ligand for each case as well as on all precursor and analog ligands, except for the ones interacting with the PL^{PRO} protease, whose best two analogs and their respective precursor ligands were evaluated. In this analysis, six categories of intermolecular interactions classified by the DS software were taken into consideration.⁴⁶⁻⁵⁸ All hydrogen atoms, including polar ones, such as hydroxyl groups, are omitted in the 2D diagrams generated by DS when they do not participate in intermolecular interactions. Additionally, this software does not indicate on the 2D diagram two conventional H-bonds that are established between the same ligand donor atom and different acceptor atoms of the same amino acid. Concerning the calculation of distances for conventional H-bonds, the DS does not consider the distance of the covalent bond between hydrogen and the atom which it is bonded to (e.g., N and O). Hence, to interpret the distances of H-bonds according to Jeffrey's categorization, approximately 0.95 Å should be added to all tabulated values given in the [Supporting Information](#) section. This approximate value

corresponds to the distance of the covalent bond between N and H, and between O and H.^{59,60}

Based on the data presented in Tables S1, S2 and S3, given in the Supporting Information section, it is noticeable that the ligands' intermolecular interactions with the active and allosteric sites of M^{PRO}, as well as with the active site of PL^{PRO}, apart from the DB12805_BI_004 analog, increased after the use of bioisosterism. The ligands containing bioisosteres interacted through conventional H-bonds with at least one of the two amino acid residues that comprise the M^{PRO} catalytic dyad (His41 and Cys145). Among these results, the most remarkable is the one exhibited by the DB12355_BI_004 analog because of two different reasons. The first motive is its number of conventional H-bonds being greater than the one manifested by ensitrelvir, a M^{PRO} noncovalent inhibitor with the highest biological potency reported in the literature.³³ The number of conventional H-bonds established between DB12355_BI_004 and M^{PRO} active site, which is 8, was four times higher than the one expressed by its precursor ligand (DB12355). The second reason is the fact that the conventional H-bond distance value established with the Cys145 residue was smaller than the distance involving ensitrelvir and Cys145. This observation was also made for the DB00549_BI_005 analog, which exhibited the same number of conventional H-bonds expressed by the tautomer

TABLE 4 Predictions of lipophilicity and drug-like aspects by the SwissADME platform.

Ligand	LogP	Lipinski/Veber (violations)	Structural alerts	Synthetic accessibility
Ensitrelvir	3.05	2/0	1	3.56
Baicalein	2.24	0/0	1	3.02
XR8-83	3.97	1/0	0	4.82
Jun9-13-7	4.10	1/0	0	2.24
DB00549	4.65	1/1	0	4.18
DB00549_BI_005	4.28	1/0	0	3.70
DB04868	4.63	1/0	0	3.81
DB04868_BI_002	3.68	0/0	0	3.60
DB04868_BI_003	3.35	0/0	0	3.41
DB09079	3.50	1/0	1	4.10
DB09079_BI_002	2.81	1/0	1	4.01
DB11984	2.01	0/0	0	4.24
DB11984_BI_002	2.01	0/0	0	3.29
DB12355	3.17	0/0	0	4.81
DB12355_BI_004	1.35	0/1	0	4.50
DB12364	3.22	0/0	2	3.05
DB12364_BI_006	2.74	0/0	0	3.08
DB12805	3.62	1/1	0	3.72
DB12805_BI_004	3.72	0/0	0	3.25
DB12805	3.62	1/1	0	3.72
DB12805_BI_004	3.72	0/0	0	3.25
DB14929	4.98	1/0	0	3.45
DB14929_BI_007	4.05	0/0	0	3.02

1 of ensitrelvir, which is 6. Furthermore, the only ligand that established conventional H-bonds with both His41 and Cys145 was the DB11984_BI_002 analog. Contrasting the ensitrelvir tautomer 2, which showed an unfavorable interaction with the Thr26 residue, the DB00549_BI_005, DB11984_BI_002, and DB12355_BI_004 analogs did not exhibit any alerts in this regard. Lastly, these three molecules containing bioisosteres, as both ensitrelvir tautomers, exhibited intermolecular interactions with amino acid residues from all 4 subsites that compose the SARS-CoV-2 M^{PRO} active site. The subsite S1 encompasses the Phe140, Asn142, Ser144, His163, Glu166, and His172 residues; the S1' includes the catalytic dyad—His41 and Cys145—as well as the Thr25 and Leu27 residues; the S2 comprises the His41, Met49, Tyr54, Met165, and Asp187 residues; and the S4 contains the Met165, Leu167, Phe185, Gln189, and Gln192 residues.^{7,61–64} The following Figure 1 illustrates the conventional H-bonds established between the DB00549_BI_005 analog and the M^{PRO} active site residues from a 3D perspective. The figures generated for the DB11984_BI_002 and DB12355_BI_004 analogs are shown in the Supporting Information section (Figures S1 and S2).

The following Figure 2 evinces the molecular complementarity between the DB00549_BI_005 analog and the M^{PRO} active site as well as this innovative ligand and both tautomers of ensitrelvir in a zoomed image that considers the electrostatic surfaces of the M^{PRO} amino acid residues by differentiating their atoms according to different colors (carbon—gray; hydrogen—white; nitrogen—blue; oxygen—red; sulfur—yellow). Also, atoms that interacted with the catalytic dyad were highlighted in green circles. Both figures generated for the DB11984_BI_002 and DB12355_BI_004 analogs are shown in the Supporting Information section (Figures S3 and S4).

Concerning the M^{PRO} allosteric site, all bioisosteric analogs, as ensitrelvir both tautomers, interact with multiple amino acid residues that compose it. Most of these interactions are apolar, followed by weaker polar interactions, such as nonconventional H-bonds. Based on the results exhibited on the Table S2, given in the Supporting Information section, the only ligand that established conventional H-bonds with more than one of those specific amino acid residues is the DB12805_BI_004 analog (with Gln110 and Phe294). Furthermore, a correlation was perceived between the most favorable score values exhibited by the DB12805_BI_004 and DB04868_BI_003 analogs

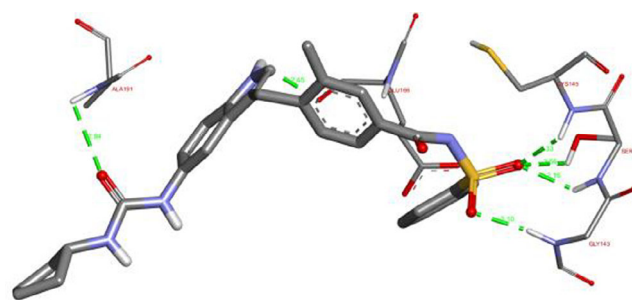


FIGURE 1 Conventional H-bonds and their respective distances between the DB00549_BI_005 analog and amino acid residues from the SARS-CoV-2 M^{PRO} active site.

(respectively, -9.5 kcal mol $^{-1}$ and -9.4 kcal mol $^{-1}$), and the establishment of intermolecular interactions with 6 out of the 7 main amino acid residues that compose the M^{PRO} allosteric site under evaluation, namely Gln110, Asp153, Val202, Ile249, Thr292, and Phe294. Also, the ensitrelvir tautomer 2, which exhibited the best score (-9.3 kcal mol $^{-1}$) among control ligands, interestingly interacted with 5 out of those 7 main amino acid residues.³⁸ Figures illustrating the conventional H-bonds established between the DB12805_BI_004 analog and the M^{PRO} allosteric site from a 3D perspective as well as the molecular complementarity of this ligand and the ensitrelvir tautomer 2 are shown in the [Supporting Information](#) section on the same fashion previously described for the ligands interacting with the M^{PRO} active site (Figures S5 and S6). The zoomed parts aim to highlight the proximity of the DB12805_BI_005 carbonyl oxygens to both Gln110 and Phe294 amide hydrogens.

In 2022, Shen and collaborators reported that molecules exhibiting auspicious activity against SARS-CoV-2 PL^{PRO} enzyme established conventional H-bonds with the Gln49, Arg72, Asp164, Arg166, Glu167, and Gln269 residues. Additionally, the Leu162, Pro248, Gly266, Asn267, Tyr268, and Pro299 residues were very close to those molecules, thereby being susceptible to interactions.³⁶ Based on the results exhibited on the Table S3, given in the [Supporting Information](#) section, it is evident that all ligands designed using the bioisosterism strategy interacted with at least one of the above-mentioned amino acid residues through conventional H-bonds. Regarding the PL^{PRO} catalytic triad, only the XR8-83 control ligand interacted with the Cys111 and His272 residues through van der Waals interactions. However, upon further evaluation of results, it

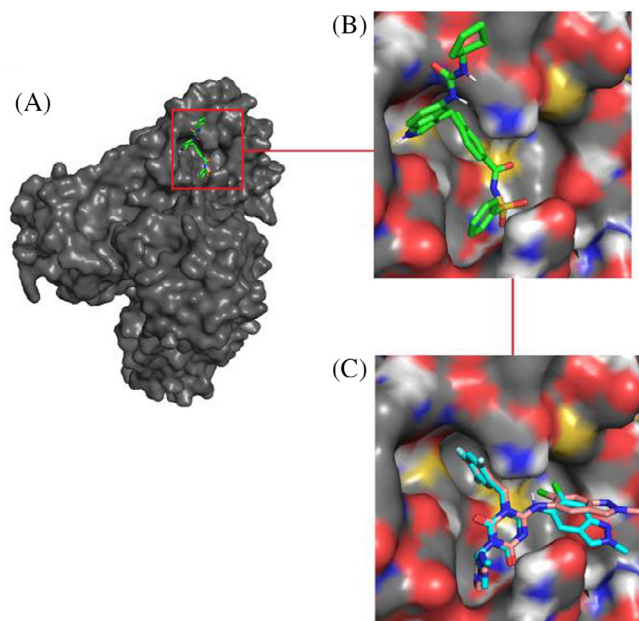


FIGURE 2 (A) DB00549_BI_005 analog, whose carbon atoms are colored in light green, anchored in the SARS-CoV-2 M^{PRO} active site. (B) “A” zoomed. (C) Zoom on ensitrelvir tautomers 1 and 2, whose carbon atoms are colored, respectively, in cyan blue and salmon pink, anchored in the M^{PRO} active site.

was found that the second most stable conformation and orientation (pose) of the DB04868_BI_002 analog, whose score and predicted K_i values are -10 kcal mol $^{-1}$ and 46.7 nM, respectively (compared to -10.2 kcal mol $^{-1}$ and 33.3 nM for its first pose), established an alkyl-type of nonpolar interaction with the Cys111 residue. Similarly, the third most stable pose of the DB04868_BI_003 analog, whose score and predicted K_i values are -9.1 kcal mol $^{-1}$ and 213.3 nM, respectively (compared to -9.6 kcal mol $^{-1}$ and 91.7 nM for its first pose), interacted with the Cys111 residue through a conventional H-bond and with the His272 residue through van der Waals interactions.

The Figure 3 showed below illustrates the 3D results of the DB04868_BI_003 analog's third pose, highlighting the conventional H-bonds established with the PL^{PRO} active site. The figure generated for the DB04868_BI_002 analog's second pose is shown in the [Supporting Information](#) section (Figure S7).

The following Figure 4 reveals the molecular complementarity between the DB04868_BI_003 analog's first and third poses and the PL^{PRO} active site as well as this ligand's poses and the XR8-83 control ligand in a zoomed image on the same fashion previously described for Figure 2. The zoomed parts aim to spotlight the access to the Cys111 residue, which contains a sulfur atom (colored in yellow). The figure created for the DB04868_BI_002 analog's first and second poses is shown in the [Supporting Information](#) section (Figure S8).

Intending to validate the molecular docking protocol,⁶⁵ re-docking was performed, and the obtained RMSD values were 0.3501 and 0.4984 Å for the crystallized ligands complexed with M^{PRO} (7VU6) and PL^{PRO} (7JN2), respectively. The following Figure 5 illustrates the 3D overlay of the original structures obtained through X-ray crystallography and the in-silico results from re-docking.

The final step of the current research predicted one additional physicochemical property (LogD) along with pharmacokinetic (ADMET) parameters for all ligands. Furthermore, nirmatrelvir was concurrently evaluated aiming to compare the in-silico results with the information presented in its medicine (Paxlovid[®]) leaflet. In this

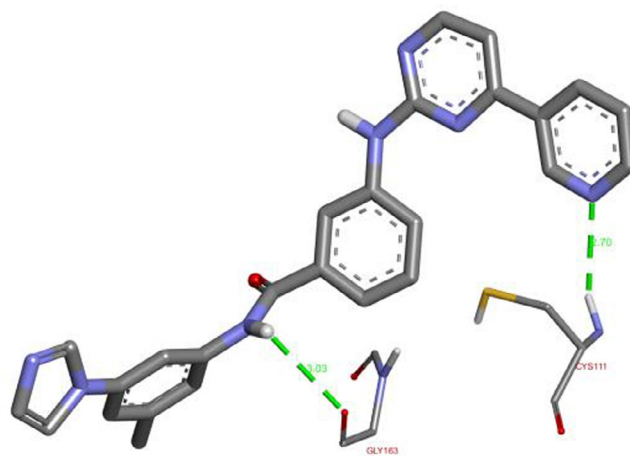


FIGURE 3 Conventional H-bonds and their respective distances between the DB04868_BI_003 analog's third pose and amino acid residues from the SARS-CoV-2 PL^{PRO} active site.

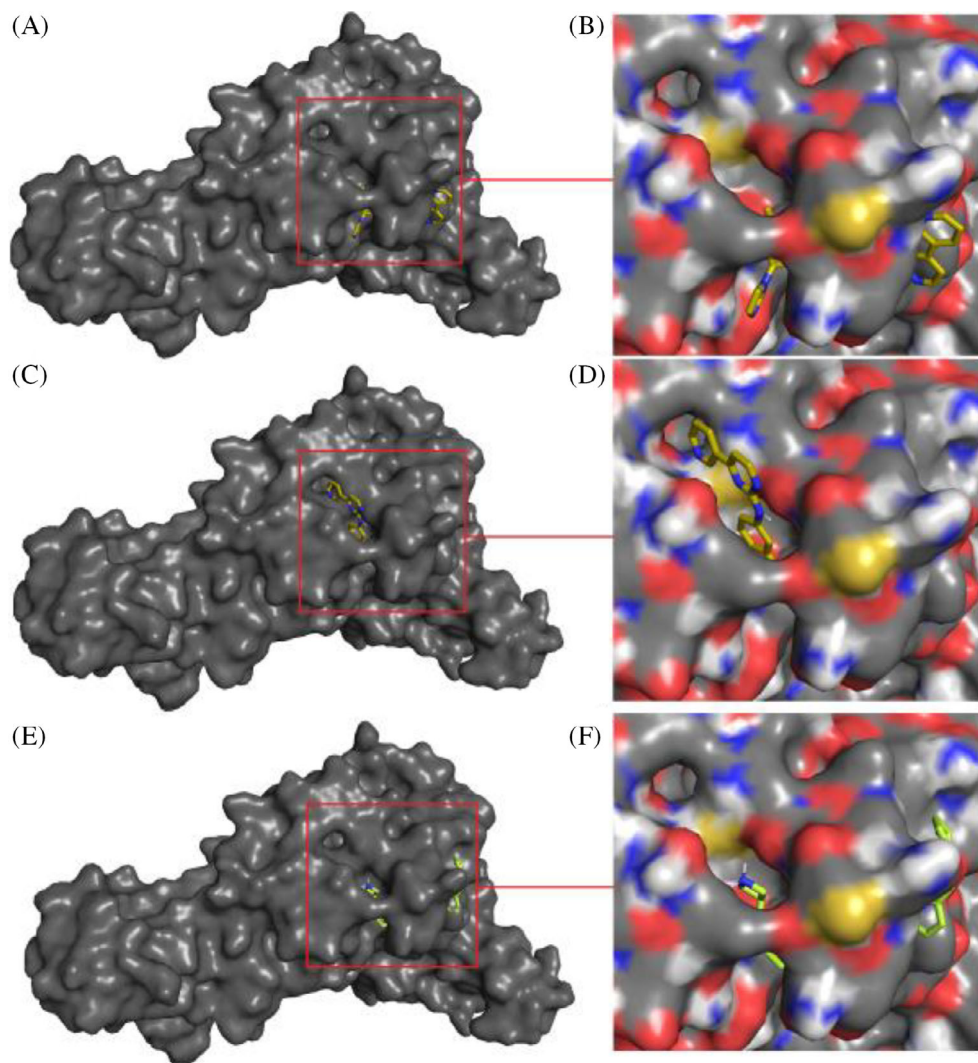


FIGURE 4 (A) Pose 1 of the DB04868_BI_003 analog, whose carbon atoms are colored in dark yellow, anchored in the PL^{pro} active site. (B) “A” zoomed. (C) Pose 3 of the DB04868_BI_003 analog, whose carbon atoms are also colored in dark yellow, anchored in the PL^{pro} active site. (D) “C” zoomed. (E) XR8-83 control ligand, whose carbon atoms are colored in another shade of light green, anchored in the PL^{pro} active site. (F) “E” zoomed.

sense, precursor ligands representing drugs already approved in the pharmaceutical market had their leaflets also considered for comparison.

Log D represents LogP whose partition coefficient is a function of pH 7.4. It is an extremely important property since an orally administered drug must be able to exert the desired therapeutic effect by reaching the site of interest in the target organ after entering the blood stream. The LogD optimal range for a chemical compound to diffuse to the target organ after being absorbed by enterocytes (intestinal cells) is from 1.0 to 3.0.⁴² All ligands showed LogD values between 1.4 and 2.9, apart from XR8-83 (3.2) and Jun9-13-7 (3.8), as well as the DB04868 precursor and its two analogs. In this last case, however, the use of bioisosterism enabled an improvement on Log D values, for the DB04868 precursor value decreased from 3.88 to 3.49 in the DB04868_BI_002 analog and to 3.25 in the DB04969_BI_003 analog.

The absorption (A) parameter evaluated was the ligand's potential to be a P-glycoprotein (P-gp) substrate. This biomacromolecule is an important transmembrane protein responsible for pumping neutral and cationic hydrophobic chemicals, including drugs, back into the

lumen of the gastrointestinal tract after they had been absorbed by the intestinal epithelium. The main negative consequence of P-gp action is to decrease the oral bioavailability of drugs, that is, the amount of a chemical substance administered orally that effectively reaches the systemic circulation.⁴² Results from ADMETlab 2.0 show a low probability (less than 30%) of control ligands and nirmatrelvir to be P-gp substrates. Regarding the precursor ligands, only DB09079 and DB12805 exhibit the same low probability. Concerning all analogs, the bioisosteric changes on the DB12355_BI_004 analog considerably decreased its probability of being a P-gp substrate from 88% to less than 30% when compared to the DB12355 precursor. Also, the DB12805_BI_004 analog favorably maintained the same profile of its respective precursor. Finally, the DB12364 precursor, which exhibited a high probability of being a P-gp substrate, represents betrixaban, a prophylactic anticoagulant drug known to be a P-gp substrate according to its medicine leaflet.⁶⁶

The distribution (D) parameter assessed was the plasma protein binding (PPB) percentage. The extent of PPB has a direct influence on the oral bioavailability of a chemical compound, for the concentration of the drug that is free to reach the target organ is directly affected by

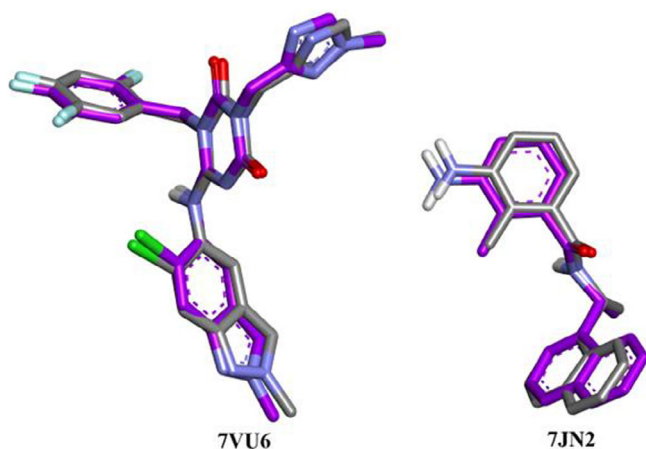


FIGURE 5 Superimpositions of both M^{PRO} (PDB code: 7VU6) and PL^{PRO} (PDB code: 7JN2) original (crystallographic) ligands with the first poses obtained for the same ligands through re-docking. The carbon atoms were changed from gray to purple on the re-docked ligand to distinguish it from the crystallographic one.

the percentage amount of it that binds to plasma proteins.^{42,67} Results from ADMETlab 2.0 reveal that the PPB values decreased in the DB09079_BI_002, DB11984_BI_002, and DB12805_BI_004 analogs when compared to their respective precursors. This positive outcome suggests that if these chemical substances are developed into drugs, their therapeutic index may have increased compared to their respective precursors, thereby resulting in a lower potential of causing toxicity. Also, the predicted PPB values for nirmatrelvir as well as for the DB00549 and DB12364 precursors, representing zafirlukast (an anti-asthmatic drug), and betrixaban, respectively, were very close to the values described in their medicines' leaflets. The comparison between the values calculated by the ADMETlab 2.0 platform and the ones presented in leaflets is as follows: for nirmatrelvir, 43.5% versus 69%; for zafirlukast, 99.4% versus above 99%; and for betrixaban, 75.0% versus 60%.^{66,68,69}

The metabolism (M) evaluation was based on the cytochrome P450 (CYP450), a broad and diverse superfamily of proteins forming a complex with metabolic functionality. Six isoenzymes belonging to CYP450 are responsible for approximately 90% of all oxidative drug metabolism as well as for metabolizing 75% of all drugs on the market.^{42,67} The ADMETlab 2.0 platform predicts the potential of chemical substances to be substrates of five out of the six main CYP450 isoenzymes involved in drug metabolism.⁴¹ Results from ADMETlab 2.0 show a high probability of decreased metabolism by CYP isoenzymes in the DB12364_BI_006 and DB12805_BI_004 analogs. Furthermore, the predictions regarding the isoenzymes for which nirmatrelvir and zafirlukast (DB00549) serve as substrates (3A4 and 3A4 plus 2C9, respectively) were consistent with the metabolism studies described in their respective medicine leaflets.^{68,69}

The excretion (E) parameter assessed was the elimination half-life. Theoretically, the half-life of a drug is the time required to reduce its concentration in plasma by 50% ($t_{1/2}$).^{23,67} Knowing this time allows the physician to determine the frequency of doses necessary to

maintain the drug plasma concentration within the therapeutic window.⁶⁷ The ADMETlab 2.0 platform determines the probability of a chemical substance to have a $t_{1/2}$ value >3 h.⁴¹ In this context, only the DB04868_BI_003 analog exhibit a high probability of having a half-life >3 h. This prolonged half-life could be beneficial in terms of dosing frequency, thereby potentially facilitating patient adherence to pharmacotherapy if a new medicine containing this lead compound is developed.

The toxicity parameters (T) selected for analysis were cardiotoxicity through inhibition of the hERG ("human ether-a-go-go-related gene") protein, hepatotoxicity via drug-induced liver injury (DILI), mutagenicity according to the Ames test, carcinogenesis, and the toxicology in the 21st-century (Tox21).^{41,70,71} Within the scope of Tox21, the ADMETlab 2.0 platform developers have build in-silico models that predict the toxicity of chemicals based on their potential interaction with different biological targets involving five human nuclear receptors (NR)—androgen receptor (AR), aryl hydrocarbon receptor (AhR), estrogen receptor (ER), and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)—as well as four signaling pathways related to human cellular stress responses (SR)—antioxidant response element (ARE), ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5), heat shock factor response element (HSE), and the p53 tumor suppressor protein. The only receptor for which the ADMETlab 2.0 platform specifically determines the inhibition potential is NR-Aromatase. Lastly, an electrochemical parameter involved in human cellular stress responses, the mitochondrial membrane potential (MMP), is also assessed.^{41,70}

Results from ADMETlab 2.0 indicate that the DB12364_BI_006 analog exhibits a drastic decrease in its potential to induce cardiotoxicity when compared to its precursor ligand. Also, the control ligands, apart from XR8-83, and the DB00549_BI_005 and DB11984_BI_002 analogs, as their precursor ligands, show a low probability of causing cardiotoxicity. Moreover, the absence of cardiotoxicity in nirmatrelvir and the confirmed cardiotoxic effect on nilotinib (DB04868), a tyrosine kinase inhibitor used in chemotherapy, were consistent with the information provided in their respective medicine leaflets.^{68,72} Regarding DILI, all control ligands, excepting XR8-83 and nirmatrelvir, as well as all analogs and their respective precursor ligands, have a high probability of triggering this adverse effect. However, in the case of acute pathologies, such as viral infection by SARS-CoV-2, the likelihood of liver damage is improbable.^{23,67} Additionally, the high predicted probabilities of hepatotoxicity for zafirlukast (DB00549) and nilotinib (DB04868) were confirmed in their respective medicine leaflets, and this fact clearly did not prevent their commercialization. In a similar fashion, the very low mutagenic potential evinced by ADMETlab 2.0 for nirmatrelvir and zafirlukast (DB00549) was consistent with the results of the Ames tests described in their respective medicine leaflets.^{68,69} In the case of zafirlukast, the low probability of carcinogenicity was also confirmed.⁶⁹ All the other ligands also show no potential to be either mutagenic or carcinogenic molecules. The only exception, according to ADMETlab 2.0, was, interestingly, ensitrelvir, which has a high probability of being carcinogenic. Finally, on the Tox21 scope, the DB09079_BI_002 and DB11984_BI_002 analogs

exhibit a high potential to interfere with, respectively, only one of the studied nuclear targets (NR-AhR) and with only one of the cellular stress responses under consideration (SR-ARE). Also, the DB00549_BI_005 analog, just as ensitrelvir, has a high probability of interfering with two different Tox21 NRs and/or SRs. The remaining ligands have the potential to interfere with more than three NRs and/or SRs, except for nirmatrelvir, which demonstrate a very low probability of interacting with all Tox21 NRs and SRs under evaluation. Lastly, the bioisosteric changes in the DB00549_BI_005, DB11984_BI_002, DB12355_BI_004, and DB12364_BI_006 analogs resulted in less interference with NRs and SRs of Tox21 when compared to their precursor ligands. Conversely, the bioisosteric replacements taking place in the DB04868_BI_002, DB04868_BI_003 and DB12805_BI_004 analogs increased their potential to interact with more NRs and SRs of Tox21 when compared to their precursor ligands.

Based solely on the predicted K_i values, the most promising bioisosteric analogs are DB12364_BI_006 and DB12805_BI_004 against the M^{Pro} active site (predicted K_i = 108.6 nM), and DB04868_BI_003 and DB00549_BI_005 against the PL^{Pro} active site (predicted K_i = 33.3 and 39.4 nM, respectively). Considering their intermolecular interactions, the predicted inhibition of PL^{Pro} by these two analogs is reinforced. Regarding the M^{Pro} enzyme on the same matter, the best analogs are DB12355_BI_004 and DB00549_BI_005 (predicted K_i = 298.9 nM). Additionally, the only analog that established conventional H-bonds with both His41 and Cys145 residues is the DB11984_BI_002 molecule. Moreover, this compound exhibits favorable physicochemical properties and predicted ADMET parameters. Differently, one disadvantage of the DB12355_BI_004 analog is the presence of a chiral carbon in its chemical structure. As a result, it demands efforts to isolate optical isomers due to the known impact of chirality on enzymatic inhibition, as previously described by Shen and collaborators, who demonstrated different in vitro inhibition profiles of optical isomers against the PL^{Pro} enzyme. Another drawback of the DB12355_BI_004 analog shared with the DB04868_BI_002, DB04868_BI_003, DB12364_BI_006, and DB12805_BI_004 analogs, is the high probability of generating toxic effects through interactions on the Tox21 sphere. Both DB04868_BI_002 and DB04868_BI_003 analogs also raise alerts for its high cardiotoxic potential along with the substantial probability of causing drug interactions, given their likely involvement in the inhibition of five CYP450 isoenzymes. In addition, the DB00549_BI_005, DB04868_BI_002, DB04868_BI_003, and DB12364_BI_006 analogs have a high likelihood of being P-gp substrates, which can negatively affect their bioavailability. Nonetheless, all the above-mentioned drawbacks evinced for these chemical analogs are also presented in their respective precursor ligands, which are the FDA-approved drugs zafirlukast, nilotinib, and betrixaban. Furthermore, the hepatotoxic potential exhibited by all structural analogs is likely reversible, as it is the case of most drug-induced hepatopathies resulting from the treatment of acute infections.⁶⁷ Ultimately, the molecular docking results demonstrate that the DB00549_BI_005 and DB04868_BI_003 analogs have a multi-target mechanism of action against SARS-CoV-2 cysteine

proteases, inhibiting, respectively, M^{Pro} and PL^{Pro} active sites and M^{Pro} allosteric site and PL^{Pro} active site.

4 | CONCLUSIONS

The status of “public health emergency of international concern” involving COVID-19 was revoked by the WHO in early May 2023, just over 3 years after the official statement issued by the same organization stating that the disease at stake had reached pandemic proportions.^{73,74} However, this revocation does not mean that the pandemic is over, since COVID-19 continues to take the life of one person every 3 minutes around the world.⁷³

After all these years, the accumulated scientific knowledge about SARS-CoV-2 expanded horizons, making evident the imperativeness to continue searching for new antiviral drug candidates that work as SARS-CoV-2 essential enzymes selective inhibitors. In this context, innovative molecules are required to tackle future outbreaks as well as to prevent all the available pharmacotherapy from succumbing to the resistance acquired by SARS-CoV-2 new variants. This viral resistance might have already been expressed by subvariants of Omicron, as advocated by Iketani and collaborators through in vitro studies with nirmatrelvir and ensitrelvir.¹³

Based on the aforementioned issue, the results obtained through the current research reveal that molecular docking studies involving bioisosteric replacements in drugs and drug candidates are an excellent initial step toward the creation of a new chemical arsenal against COVID-19. In fact, the bioisosterism strategy was able to improve the affinity of chemical substances for SARS-CoV-2 cysteine proteases while it has structurally simplified some of these molecules and optimized their physicochemical properties, as well as their pharmacokinetic parameters.

It is hoped that the scientific research involving specially the DB00549_BI_005 and DB04868_BI_003 analogs not only continues but also reaches remarkable results after being conducted by a multidisciplinary team toward studies of molecular dynamics followed by empirical tests with the purpose of ratifying the current in-silico evidence. Therefore, the discovery of the synthetic routes of these chemical substances is encouraged so that in vitro and in vivo studies are conducted to determine both the efficacy and the safety of these innovative molecular entities conceived by bioisosterism.

ACKNOWLEDGMENTS

CAPES, the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel in Brazil, for the funding support. *Schrödinger* Platform, for the Pymol v2.5.2 free academic license. ChemAxon, for the MarvinSketch v21.20 free academic license. Dassault Systèmes, for the Discovery Studio Client v21.1.0.20298 free academic license.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that supports the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

ORCID

João Ricardo Bueno de Moraes Borba  <https://orcid.org/0000-0002-8356-2126>

REFERENCES

- [1] K. Mohamed, N. Yazdanpanah, A. Saghadzadeh, N. Rezaei, *Bioorg. Chem.* **2021**, *106*, 104490.
- [2] M. Khan, S. F. Adil, H. Z. Alkhatlan, M. N. Tahir, S. Saif, M. Khan, S. T. Khan, *Molecules.* **2021**, *26*, 39.
- [3] WHO, WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>. Accessed Dec 29, 2022
- [4] Y. Wu, K. Y. Chang, L. Lou, L. G. Edwards, B. K. Doma, Z. Xie, *Inf. Med. Unlocked.* **2020**, *21*, 100461.
- [5] M. Cascella, M. Rajnik, A. Aleem, S. C. Dulebohn, R. D. Napoli, *Features, Evaluation, And Treatment of Coronavirus (COVID-19)*, StatPearls, Treasure Island **2021**.
- [6] M. Rosas-Lemus, G. Minasov, L. Shuvalova, N. Inniss, O. Kiryukhina, J. Brunzelle, K. J. F. Stachell, *Sci. Signaling.* **2020**, *13*, 651.
- [7] Y. Zhao, Y. Zhu, X. Liu, Z. Jin, Y. Duan, Q. Zhang, C. Wu, L. Feng, X. Du, J. Zhao, M. Shao, B. Zhang, X. Yang, L. Wu, X. Ji, L. W. Guddat, K. Yang, Z. Rao, H. Yang, *Biochemistry.* **2022**, *119*, 16.
- [8] S. K. Samrat, J. Xu, X. Xie, E. Gianti, H. Chen, J. Zou, J. G. Pattis, K. Elokely, H. Lee, Z. Li, M. L. Klein, P. Shi, J. Zhou, H. Li, *Antiviral Res.* **2022**, *205*, 105381.
- [9] J. Osipiuk, S. Azizi, S. Dvorkin, M. Endres, R. Jedrzejczak, K. A. Jones, S. Kang, R. S. Kathayat, Y. Kim, V. G. Lisnyak, S. L. Maki, V. Nicolaescu, C. A. Taylor, C. Tesar, Y. Zhang, Z. Zhou, G. Randall, K. Machalska, S. A. Snyder, B. C. Dickinson, A. Joachimiak, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 743.
- [10] R. Arya, S. Kumari, B. Pandey, H. Mistry, S. C. Bihani, A. Das, V. Prashar, G. D. Gupta, L. Panicker, M. Kumar, *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 166725.
- [11] D. R. Owen, C. M. N. Allerton, A. S. Anderson, L. Aschenbrenner, M. Avery, S. Berritt, B. Boras, R. D. Cardin, A. Carlo, K. J. Coffman, A. Dantonio, L. Di, R. Eng, R. Ferre, K. S. Gajiwala, S. A. Gibson, S. E. Greasley, B. L. Hurst, E. P. Kadar, A. S. Kalgutkar, J. C. Lee, J. Lee, W. Liu, S. W. Mason, S. Noell, J. J. Novak, R. S. Obach, K. Ogilvie, N. C. Patel, M. Pettersson, D. K. Rai, M. R. Reese, M. F. Sammons, J. G. Sathish, R. S. P. Singh, C. M. Steppan, A. E. Stewart, J. B. Tuttle, L. Updyke, P. R. Verhoest, L. Wei, Q. Yang, Y. Zhu, *Science.* **2021**, *374*, 1586.
- [12] FDA, Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Oral Antiviral for Treatment of COVID-19. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19>. Accessed May 05, 2022
- [13] S. Iketani, H. Mohri, B. Culbertson, S. J. Hong, Y. Duan, M. I. Luck, M. K. Annavajhala, Y. Guo, Z. Sheng, A. Uhlemann, S. P. Goff, Y. Sabo, H. Yang, A. Chavez, D. D. Ho, *Nature.* **2023**, *613*, 558.
- [14] Y. Unoh, S. Uehara, K. Nakahara, H. Nobori, Y. Yamatsu, S. Yamamoto, Y. Maruyama, Y. Taoda, K. Kasamatsu, T. Suto, K. Kouki, A. Nakahashi, T. Sanaki, S. Toba, K. Uemura, T. Mizutare, S. Ando, M. Sasaki, Y. Orba, H. Sawa, A. Sato, T. Sato, T. Kato, Y. Tachibana, *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 6499.
- [15] SHIONOGI, Xocova[®] (Ensitrelvir Fumaric Acid) Tablets 125mg Approved in Japan for the Treatment of SARS-CoV-2 Infection under the Emergency Regulatory Approval System. <https://www.shionogi.com/global/en/news/2022/11/e20221122.html>. Accessed Feb 10, 2023
- [16] L. M. Lima, J. E. Barreiro, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23.
- [17] L. B. Kier, L. H. Hall, *Chem. Biodiversity.* **2004**, *1*, 138.
- [18] N. J. F. da Silveira, W. F. de Azevedo, R. C. Guedes, L. M. Santos, R. C. Marcelino, P. S. Antunes, T. C. Elias, *Curr. Bioinf.* **2021**, *16*, 1.
- [19] G. Chen, A. J. Seukep, M. Guo, *Mar. Drugs.* **2020**, *18*, 545.
- [20] N. J. F. da Silveira, F. S. S. Pereira, T. C. Elias, T. Henrique, in *Docking Screens for Drug Discovery*, Vol. 2053 (Ed: W. F. Azevedo Jr.), Springer Nature, Switzerland **2019**, p. 221.
- [21] R. B. Best, in *Biomolecular Simulations: Methods and Protocols*, Vol. 2022 (Eds: M. Bonomi, C. Camilloni), Springer Nature, Switzerland **2022**, p. 3.
- [22] O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455.
- [23] L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, B. C. Knollmann, *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*, AMGH Editora Ltda, Porto Alegre, RS **2012**, p. 12.
- [24] T. C. Elias, H. C. B. Oliveira, N. J. F. da Silveira, *J. Comput. Chem.* **2018**, *39*(29), 2481.
- [25] Uniprot, SARS-CoV-2, PODTC1. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/PODTC1/entry#structure>. Accessed Jan 3, 2022
- [26] RCSB, PDB, 7VU6. <https://www.rcsb.org/structure/7VU6>. Accessed Apr 13, 2022
- [27] RCSB, PDB, 7JN2. <https://www.rcsb.org/structure/7JN2>. Accessed Jan 03, 2022
- [28] G. Martínez-Rosell, T. Giorgino, G. D. Fabritius, *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*(7), 1511.
- [29] Playmolecule, ProteinPrepare: a protein preparation app for MD simulations. <https://playmolecule.com/proteinPrepare/>. Accessed Mar 18, 2023
- [30] M. O. Kim, S. E. Nichols, Y. Wang, J. A. McCammon, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2013**, *23*(3), 235.
- [31] Drugbank, Categories. <https://go.drugbank.com/categories>. Accessed Feb 21, 2022
- [32] Pubchem, Explore Chemistry. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed Feb 21, 2022
- [33] J. D. A. Tyndall, *J. Med. Chem.* **2022**, *65*(9), 6496.
- [34] K. Gao, R. Wang, J. Chen, J. J. Tepe, F. Huang, G. Wei, *J. Med. Chem.* **2021**, *64*(23), 16922.
- [35] D. J. Calleja, G. Lessene, D. Komander, *Front. Chem.* **2022**, *10*, 1.
- [36] Z. Shen, K. Ratia, L. Cooper, D. Kong, H. Lee, Y. Kwon, Y. Li, S. Alqarni, F. Huang, O. Dubrovskiy, L. Rong, G. R. J. Thatcher, R. Xiong, *J. Med. Chem.* **2022**, *65*(4), 2940.
- [37] C. Ma, M. D. Sacco, Z. Xia, G. Labrinidis, J. A. Townsend, Y. Hu, X. Meng, T. Szeto, M. Ba, X. Zhang, M. Gongora, F. Zhang, M. T. Marty, Y. Xiang, A. Kolocouris, Y. Chen, J. Wang, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*(7), 1245.
- [38] S. Günther, P. Y. A. Reinke, Y. Fernández-García, J. Lieske, T. J. Lane, H. M. Ginn, F. H. M. Koua, C. Ehrh, W. Ewert, D. Oberthuer, O. Yefanov, S. Meier, K. Lorenzen, B. Krichel, J. Kopicki, L. Gelisio, W. Brehm, I. Dunkel, B. Seychell, H. Gieseler, B. Norton-Baker, B. Escudero-Pérez, M. Domaracky, S. Saouane, A. Tolstikova, T. A. White, A. Hänle, M. Groessler, H. Fleckenstein, F. Trost, M. Galchenkova, Y. Gevorkov, C. Li, S. Awel, A. Peck, M. Barthelmess, F. Schlünzen, P. L. Xavier, N. Werner, H. Andaleeb, N. Ullah, S. Falke, V. Srinivasan, B. A. França, M. Schwinzer, H. Brognaro, C. Rogers, D. Melo, J. J. Zaitseva-Doyle, J. Knoska, G. E. Peña-Murillo, A. R. Mashhour, V. Henicke, P. Fischer, J. Hakanpää, J. Meyer, P. Gribbon, B. Ellinger, M. Kuzikov, M. Wolf, A. R. Beccari, G. Bourenkov, D. von Stetten, G. Pompidor, I. Bento, S. Panneerselvam, I. Karpics, T. R. Schneider, M. M. Garcia-Alai, S. Niebling, C. Günther, C. Schmidt, R. Schubert, H. Han, J. Boger, D. C. F. Monteiro, L. Zhang, X. Sun, J. Pletzer-Zelgert, J. Wollenhaupt, C. G. Feiler, M. S. Weiss, E. Schulz, P. Mehrabi, K. Karničar, A. Usenik, J. Loboda, H. Tidow, A. Chari, R. Hilgenfeld, C. Uetrecht, R. Cox, A. Zaliani, T. Beck, M. Rarey, S. Günther, D. Turk, W. Hinrichs, H. N. Chapman, A. R. Pearson, C. Betzel, A. Meents, *Science.* **2021**, *372*(6542), 642.
- [39] C. L. D. Ortiz, G. C. Completo, R. C. Nacario, R. B. Nellas, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17096.
- [40] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.
- [41] G. Xiong, Z. Wu, J. Yi, L. Fu, Z. Yang, C. Hsieh, M. Yin, X. Zeng, C. Wu, A. Lu, X. Chen, T. Hou, D. Cao, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *1*, 5.

- [42] E. J. Barreiro, C. A. M. Fraga, *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, Vol. 3, Artmed, Porto Alegre **2015**.
- [43] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 46, 3.
- [44] C. A. Lipinski, *Drug Discovery Today: Technol.* **2004**, 1(4), 337.
- [45] D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, 45(12), 2615.
- [46] E. N. Baker, R. E. Hubbard, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1984**, 44(2), 97.
- [47] C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, *J. Med. Chem.* **2010**, 53(14), 5061.
- [48] A. C. Pierce, K. L. Sandretto, G. W. Bemis, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2002**, 49(4), 567.
- [49] G. Wolber, T. Langer, *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, 45(1), 160.
- [50] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *Biochemistry.* **1999**, 43(277), 40816.
- [51] C. Biot, E. Buisine, J. Kwasigroch, M. Rooman, *J. Biol. Chem.* **2002**, 43(277), 40816.
- [52] A. Frotera, P. Gamez, M. Mascal, T. J. Mooibroek, J. Reedijk, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50(41), 9564.
- [53] G. B. McGaughey, M. Gagné, A. K. Rappé, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273(25), 15458.
- [54] J. B. O. Mitchell, C. L. Nandi, I. K. McDonald, J. M. Thornton, S. L. Price, *J. Mol. Biol.* **1994**, 239(2), 315.
- [55] T. Ozawa, E. Tsuji, M. Ozawa, C. Handa, H. Mukaiyama, T. Nishimura, S. Kobayashi, K. Okazaki, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16(24), 10311.
- [56] K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, *Science.* **2007**, 317(5846), 1881.
- [57] P. Auffinger, F. A. Hays, E. Westhof, P. S. Ho, *Biophys. Comp. Biol.* **2004**, 101(48), 16789.
- [58] A. L. Ringer, A. Senenko, C. D. Sherrill, *Protein Sci.* **2007**, 16(10), 2216.
- [59] G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, USA **1997**, p. 1.
- [60] P. A. Frey, *Science.* **1995**, 268(5208), 189.
- [61] Z. Jin, X. Du, Y. Xu, Y. Deng, M. Liu, Y. Zhao, B. Zhang, X. Li, L. Zhang, C. Peng, Y. Duan, J. Yu, L. Wang, K. Yang, F. Liu, R. Jiang, X. Yang, T. You, X. Liu, X. Yang, F. Bai, H. Kiu, X. Liu, L. W. Guddat, W. Xu, G. Xiao, C. Qin, Z. Shi, H. Jiang, Z. Rao, H. Yang, *Nature.* **2020**, 582, 289.
- [62] W. Cui, K. Yang, H. Yang, *Front. Mol. Biosci.* **2020**, 7, 616341.
- [63] Z. Wang, Y. Zhao, Q. Wang, Y. Xing, L. Feng, J. Kong, C. Peng, L. Zhang, H. Yang, M. Lu, *Signal Transduction Targeted Ther.* **2021**, 6, 214.
- [64] H. Wang, R. Pei, X. Li, W. Deng, S. Xing, Y. Xiang, C. Zhang, S. He, H. Sun, S. Xiao, J. Xiong, Y. Zhang, X. Chen, Y. Wang, Y. Guo, B. Zhang, L. Shang, *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 238, 114458.
- [65] G. Bitencourt-Ferreira, W. F. de Azevedo Jr., in *Docking Screens for Drug Discovery*, Vol. 2053 (Ed: W. F. de Azevedo Jr.), Springer Nature, Switzerland **2019**, p. 35.
- [66] Bevyxxa. Betrixaban. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208383s000lbl.pdf. Accessed May 12, 2023
- [67] D. Gloan, In *Princípios de Farmacologia-A Base Fisiopatológica da Farmacologia*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro **2014**, p. 3.
- [68] Paxlovid. Nirmatrelvir, Ritonavir. <https://www.pfizer.com.br/bulas/Paxlovid>. Accessed May 12, 2023
- [69] Accolate, Zafirluscast. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/020547s033lbl.pdf. Accessed May 12, 2023
- [70] Admetlab2.0. Explanation. <https://admetmesh.scbdd.com/explanation/index>. Accessed Nov 18, 2022
- [71] S. Sakamuru, R. Huang, M. Xia, *Front. Pharmacol.* **2022**, 13, 1.
- [72] Tassigna. Nilotinib. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/022068s026lbl.pdf. Accessed May 12, 2023
- [73] P. Nogueira, Fim da emergência de saúde pública para covid-19 decretado pela OMS não implica término da pandemia, alerta pesquisadora da Unesp. <https://jornal.unesp.br/2023/05/09/fim-da-emergencia-de-saude-publica-para-a-covid-19-decretado-pela-oms-nao-implica-termino-da-pandemia-alerta-pesquisadora-da-unesp/>. Accessed May 9, 2023
- [74] K. Kupferschmidt, M. Wadman, *Science.* **2023**, 380(6645), 566.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: J. R. B. de M. Borba, L. P. de Araújo, M. P. Veloso, N. J. F. da Silveira, *J. Comput. Chem.* **2023**, 1. <https://doi.org/10.1002/jcc.27217>